



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.175.859.083:577.171.7

КАЛЬЦИТОНИН: СВОЙСТВА И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ

*Мышкина Л. А., Коротав Г. К., Давидович Ю. А.***Всесоюзный научно-исследовательский институт
биотехнологии, Москва;*** Институт элементоорганических соединений им. А. И. Несмеянова
Академии наук СССР, Москва*

Обсуждены строение и биологическая активность кальцитонина, пути его образования, а также методы получения: выделение из природного сырья, химический синтез и генно-инженерные методы.

Известно, что специфичность внутриклеточных связей в отдельных органах и между органами определяется множеством гормональных сигналов. Один из таких биологически важных гормональных сигналов обеспечивает кальцитонин — гормональный биорегулятор обмена кальция и фосфора в организме. Биологической характеристике и роли этого гормона посвящен недавно опубликованный обзор [1]. Однако возрастающее значение кальцитонина как препарата, используемого в медицинской практике, ставит на повестку дня проблему разработки и освоения новых методов его получения. Это обстоятельство побудило нас вернуться к проблеме кальцитонина с тем, чтобы вкратце систематизировать литературные данные, касающиеся способов его получения, выделения и очистки. Наряду с этим мы постарались отразить в обзоре имеющиеся сведения о химическом строении кальцитонина, знание которых необходимо как для понимания механизма его биологической активности, так и для разработки способов его получения.

1. Строение кальцитонина и его биологическая активность

Кальцитонин — однопептидный полипептид с молекулярной массой ~3600 Да [2–5]. До настоящего времени выделены и установлены последовательности более 10 различных форм кальцитонина пяти видов животных и человека. Среди них кальцитонин человека, угря, свиньи и лосося, которые в настоящее время доступны для терапевтического применения. Общие структурные признаки всех кальцитонинов — наличие полипептидной цепи из 32 аминокислот с N-концевым остатком цистеина и C-концевым амидом пролина, дисульфидный мостик между остатками цистеина в положениях 1 и 7, склонность к образованию димерных форм [2, 3, 6, 7]. Хотя видовые различия характерны для природных кальцитонинов, в некоторых случаях они невелики и состоят в заменах отдельных аминокислотных остатков на остатки близкой химической природы.

В частности, в кальцитонинах, выделенных из различных источников, встречаются варианты замены некоторых гидрофильных аминокислот (аспарагин — глутамин), ароматических (тирозин — фенилаланин), неполярных (валин — метионин) (например, рис. 1). Одновременно с этим остается достаточное число общих аминокислотных остатков; кальцитонины человека и крысы имеют 30 (из 32) общих остатков, кальцитонин челове-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<u>II-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met</u> -Leu-Gly-Thr-										
2	- Ser - - - - -	Val	-	Ser	Ala						
3	- - - - -	Val	-	-	-	Lys					
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	-Tyr-Thr-Gln- <u>Asp-Phe</u> -Asn-Lys- <u>Phe</u> -Hys-Thr- <u>Phe</u> -										
2	- Trp Arg -	<u>Leu</u>	-	Asn	-	-	Arg	-			
3	Leu <u>Ser</u> -	<u>Glu</u>	<u>Leu</u>	Hys	-	<u>Leu</u>	Gln	-	<u>Tyr</u>		
	25	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
1	-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH ₂										
2	Ser Gly Met Gly Phe Glu Pro Glu Thr -										
3	- Arg -	Asn	Thr	-	Ser	-	Thr	-			

Рис. 1. Структура кальцитонина человека (1), свиньи (2) и лосося (3) [2]. В структурах (2) и (3) указаны только отличающиеся и родственные (подчеркнуты) аминокислоты. Одинаковые со структурой (1) аминокислоты обозначены дефисами

ка отличается от кальцитонинов овцы и быка 9, а от кальцитонинов лосося и угря — 15 аминокислотными остатками.

Кальцитонин участвует в регуляции жизненно важных физиологических процессов, обеспечивающих относительно постоянный уровень кальция в крови (8,8—10,4 мг%). Необходимость кальциевого гомеостаза в организме обусловлена тем, что кальций вовлечен в клеточные процессы, определяющие возбудимость нервов, способность мышц к сокращению, активность ферментов, секрецию гормонов, высвобождение медиаторов из нервных окончаний, проницаемость мембран, коагуляцию крови [1, 3]. Кальциевый гомеостаз обеспечивается сдвигом равновесия процесса обмена кальция между кровью и костной тканью, изменением интенсивности всасывания кальция в кишечнике и выведением его почками. Названные процессы регулируются рядом гормонов, из которых важнейшую роль играет кальцитонин. Интенсивность секреции кальцитонина в первую очередь определяется концентрацией кальция в крови. Повышение уровня кальция в крови стимулирует секрецию кальцитонина, и, напротив, при гипокальциемии поступление в кровь кальцитонина уменьшается [4]. Гормон обладает широким спектром действия, но наиболее полно изучено его влияние на обмен кальция в костной ткани.

Все три кальцитонина, структуры которых приведены на рис. 1, очень близки по спектру биологического действия, но различаются по активности (от 100 до 4000 МЕ), продолжительности гипокальциемического действия (наиболее пролонгирован эффект кальцитонина лосося, что хорошо согласуется со скоростью его метаболизма) и иммунологическим свойствам. Биологическая активность кальцитонина оценивается на молодых растущих крысах по гипокальциемическому действию в сравнении с аналогичным действием стандартного препарата и выражается в единицах MRC (Medical Research Council) или интернациональных единицах (МЕ) [1].

Авторы работы [8] утверждают, что за кальциемическую активность кальцитонинов ответствен лептидный фрагмент, соответствующий 2/3 аминокислотной последовательности полипептида — с 11-го по 32-й остаток, а носителем иммунологических свойств является аминокислотная последовательность фрагмента 10—32.

Однако имеется мнение, что для проявления биологической активности кальцитонинов необходимы все 32 аминокислотных остатка [9].

В предложенной модели молекула кальцитонина разделена на три в равной степени важные структурные области: семичленный циклический сегмент 1—7 и 2 α -спиральных участка: амфифильная область от 8-го аминокислотного остатка до излома на пролине в положении 23 и сегмент от 23-го аминокислотного остатка до С-концевого амида пролина. Наиболее вариабелен (в отдельных случаях у разных видов до 33% замес) фрагмент 8—22.

При оценке активности гормона необходимо учитывать не только сходство пептидной молекулы к рецепторам в тканях-мишенях, но и резистентность гормона к метаболической деструкции [8]. Принято считать, что кальцитонин активен лишь в нативном состоянии. Однако имеются сведения о том, что делеции аминокислотных остатков в положениях 2 и 8 не снижают в значительной степени активности гормона [10]. Существенно и состояние кальцитонина в крови. Хотя в крови обнаружены димерные и олигомерные формы кальцитонина, физиологически активен только мономер [11].

При сопоставлении физических и биологических свойств природных и модельных синтетических кальцитонинов [9, 12—15], имеющих существенные замены во фрагменте 8—22, но сохраняющих активность, близкую к активности природных кальцитонинов, был сделан ряд ценных наблюдений. В частности, установлено, что нарушение амфифильности пептида в результате усиления гидрофобных взаимодействий между молекулами кальцитонина снижает устойчивость мономерной формы. Для предотвращения такого типа взаимодействий на гидрофобной поверхности α -спирального участка, необходимого для связывания природных кальцитонинов с рецептором, имеются (в положении 15) гидрофильные остатки. Однако отмечается, что для проявления высокой биологической активности гормона наличие таких остатков необязательно.

Для проявления биологической активности, безусловно, необходимо сохранение α -спирального участка и всей третичной структуры гормона, причем наличие α -спирального участка более существенно, чем длина цепи [12].

Биологическая активность кальцитонина в значительной степени зависит и от его устойчивости в организме [16, 17]. Установлено, что кальцитонин лабилен при контакте с различными тканями. Гормон расщепляется под действием протеолитических ферментов, обнаруженных в цитозольных фракциях щитовидной железы, печени, почек, головного мозга с образованием низкомолекулярных пептидных фрагментов. Степень и характер деградации кальцитонина зависят от природы ткани и времени инкубации. Считается, что фрагментация гормона в щитовидной железе может быть ответственна за множественность иммунореактивных форм кальцитонина в крови [18].

Сравнение нативного кальцитонина и его дезамидированной формы свидетельствует о том, что для проявления биологической активности гормона необходимо наличие амидной группы на С-концевом участке, причем удлинение полипептидной цепи дезамидированной формы кальцитонина с С-конца на один остаток глицина не приводит к восстановлению биологической активности [19—21]. С другой стороны, удлинение полипептидной цепи с С-конца на несколько основных аминокислотных остатков вызывает терапевтический эффект, сравнимый с эффектом нативного гормона [22]. Кальцитонин с С-удлиненной полипептидной цепью расщепляется и модифицируется под действием ферментов, находящихся в тканях организма, подобно природному предшественнику кальцитонина.

2. Биосинтез кальцитонина

По происхождению кальцитонин разделяют на два типа: кальцитонин, продуцируемый ультимобронхиальными тельцами рыб, птиц и земноводных [23—26], и кальцитонин млекопитающих, включая человека, который синтезируется и секретируется щитовидной железой [27—30]. В свою очередь, секрецию кальцитонина регулируют глюкагон (гормон поджелу-

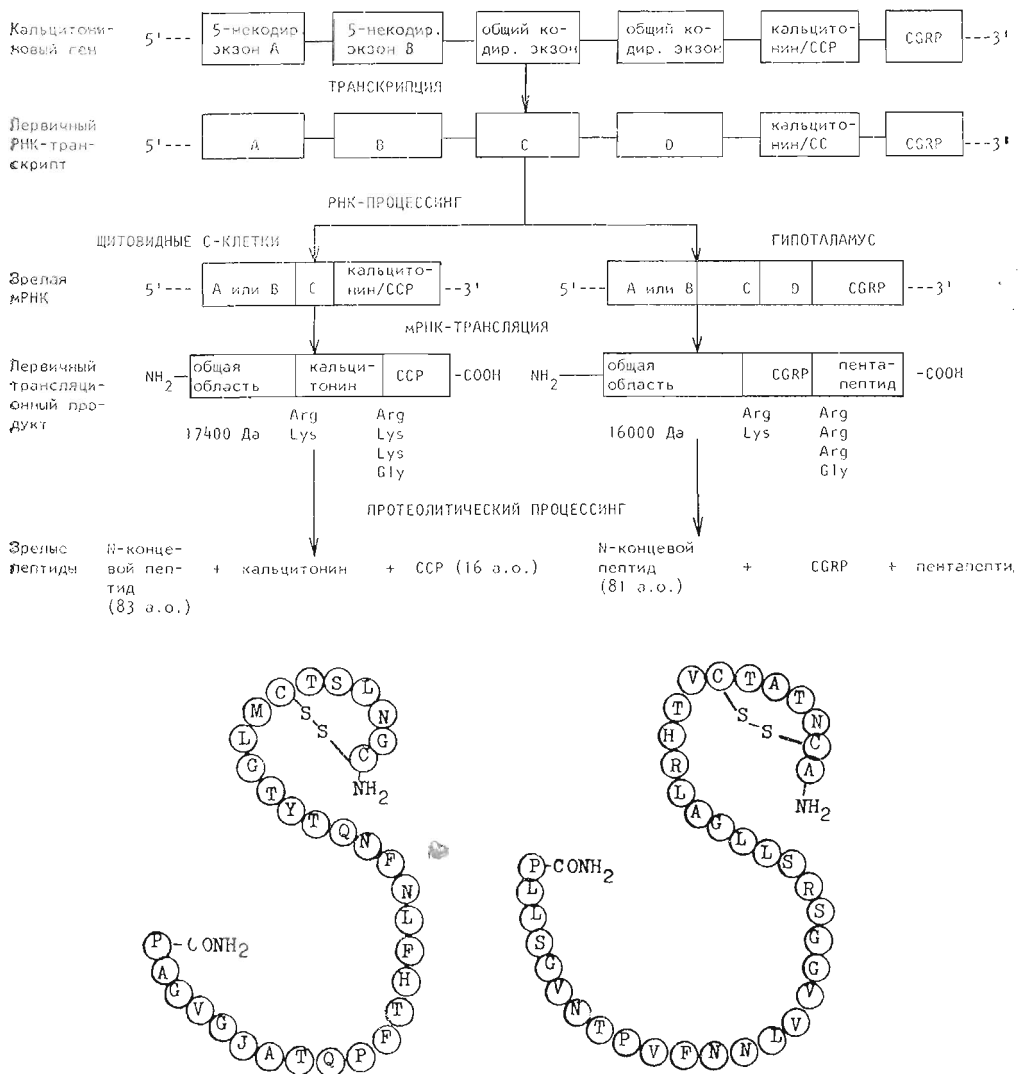


Рис. 2. Схема продуцирования кальцитонина и гипоталамусного нейропептида (CGRP) (по работе [31]). Аминокислоты даны в двобуквенном коде

дочной железы), гастрин (гормон желудочно-кишечного тракта) [3], соматостатин [1].

Биосинтез кальцитонина человека и млекопитающих осуществляется в С-клетках щитовидной железы. Непосредственно перед секретированием зрелого гормона в этих клетках происходит посттрансляционный процессинг первичного полипептида — белка-предшественника кальцитонина с молекулярной массой 17 400 Да [31—37]. В свою очередь, первичный полипептид образуется в результате трансляции с тиреоидной мРНК — продукта процессинга первичного РНК-транскрипта, синтезируемого на гене кальцитонина (рис. 2). Этот же транскрипт синтезируется на том же гене и в клетках гипоталамуса. Однако в этих клетках сплайсинг протекает по-иному, в результате чего продуцируется специфическая для клеток гипоталамуса мРНК, кодирующая соответствующий полипептид с молекулярной массой 16 000 Да, который дает отрицательную иммунную реакцию на кальцитонин (рис. 2). Протеолитический процессинг этого полипептида с одновременным amidированием приводит к образованию гипоталамусного нейропептида (CGRP), состоящего из 37 аминокислотных остатков с С-концевым амидом фенилаланина и двух пептидов: N-концевого полипептида, состоящего из 81 аминокислотного остатка (причем пер-

вые 76 остатков идентичны лидерной N-концевой последовательности предшественника кальцитонина) и C-кошцевого пентапептида [31, 38—44].

По данным анализа нуклеотидной последовательности, кодирующей предшественник кальцитонина, установлено, что структурный фрагмент кальцитонина находится у карбоксиконца полипротеина (17 400) и флап-кируется у амино- и карбоксиконцов пептидными последовательностями, включающими основные аминокислотные остатки (с N-конца — Arg-Lys, а с C-конца — Gly-Lys-Lys-Arg) [31]. Наличие последних обеспечивает полипротеину конформацию, благоприятствующую строго упорядоченному процессингу внутри секреторных путей — протеолитическому расщеплению и ферментативному амидированию [45—48]. В результате процессинга [31] отщепляется лидерная N-концевая последовательность с 83 остатками аминокислот, C-концевая последовательность с 16 остатками аминокислот (пептид ССР) [44, 48, 49] и вырезается кальцитонин с C-кошцевым амидом пролина (рис. 2). Наличие остатка глицина, непосредственно примыкающего к C-кошцевому пролину в предшественнике кальцитонина, является сигналом для амидирования в полностью процессированном кальцитонине. Аналогичный сигнал амидирования присущ и другим пептидам, например мелитину, α -MSH-петельному пептиду, гастрину, холецистокинину, окситоцину, вазопрессину и др. [50].

Начальные стадии биосинтеза кальцитонина человека осуществляются также и в опухолевых клетках легких. Об этом свидетельствует наличие единственного иммунореактивного продукта с молекулярной массой 17 000 Да, который транскрибируется в бесклеточной системе на поли-A-содержащей РНК, выделенной из карциномы бронхов. Этот продукт аналогичен продукту трансляции в этой же системе на мРНК, выделенной из медуллярной карциномы щитовидной железы. Однако опухолевые клетки бронхов человека неспособны осуществлять протеолитическое расщепление высокомолекулярного прогормона, поэтому сам кальцитонин в названных клетках не образуется [51].

3. Выделение кальцитонина из эндокринного сырья

Кальцитонин был впервые обнаружен в организме сравнительно недавно — в 1962 г. [52]. Первоначально были получены экстракты с выраженным гипокальциемическим действием из щитовидных желез животных, а позднее из тканей медуллярной карциномы щитовидной железы человека был выделен сам кальцитонин [7]. Экстракция кальцитонина из животного эндокринного сырья до настоящего времени остается одним из основных способов его получения для терапевтического использования. В качестве сырья наряду с щитовидными железами млекопитающих (преимущественно свиней) используют также ультимобронхальные тела ца лососевых рыб.

Один из широко практикуемых методов выделения кальцитонина из щитовидной железы свиньи [53—56] включает в себя следующие операции. Предварительно гомогенизованную ткань обезжиривают при низкой температуре липофильным растворителем — эфиром, ацетоном (преимущественно) или их смесью, а затем при 0—25° С подвергают экстракции одной или несколькими системами растворителей в отсутствие кислорода воздуха. В качестве экстрагента используют либо водно-спиртовую систему (с применением низких спиртов) при рН 1—6 (кислотность достигается добавлением неорганических кислот (соляной, серной), органических кислот (муравьиной, уксусной) или кислых буферов (ацетатного, цитратного)) с содержанием воды от 5 до 30%, либо водно-органическую систему (рН 1—2) со спиртом или без него (органическим компонентом может быть ацетон или органические основания (морфолин, шпридин)), иногда с добавлением хлористого натрия. Из экстракта сырой активный препарат осаждают ацетоном при низкой температуре. Гормон-сырец очищают от балластных примесей растворением в 0,025 М соляной кислоте или 70% спирте при рН 5—6 с последующим удалением нерастворимой неактивной части материала центрифугированием. Активное ве-

щество выделяют из сульфата осажждением трихлоруксусной кислотой. Выпавший осадок центрифугируют и лиофилизуют. При необходимости кальцитонин можно дополнительно очистить другими способами, например гель-хроматографией на биогеле 6Р. Более полная очистка гормона сопровождается разделением его на два активных компонента: α - и β -кальцитонин. Последний представляет собой сульфоксидное производное α -кальцитонина и обладает гипокальциемической активностью, близкой к активности α -формы [53].

По другому методу кальцитонин выделяют из сырого материала с помощью противоточного распределения в аппарате Крейга с применением системы *n*-бутанол — CH_3COOH — H_2O , 4 : 1 : 5, и последующей лиофилизацией [53].

Предложен также метод [56] выделения кальцитонина из цитовидной железы свиньи, включающий в себя четыре стадии: экстракцию гормона подкисленным водным ацетоном при pH 0,8–1,5, осаждение активного вещества повышением содержания ацетона в смеси до 90%, растворение кальцитонина-сырца в системе *n*-бутанол — CH_3COOH — H_2O , 75 : 7,5 : 21, и отделение балластных веществ при pH 6,5 в водно-спиртовом растворе. Окончательной очистки гормона достигают гель-хроматографией на сефадексе G-25 в 1 М уксусной кислоте. Существенное преимущество последнего метода — возможность комплексного использования дефицитного сырья: наряду с кальцитонином получают тиреоидин, извлекаемый из жмыха после отделения кальцитонина.

Методы выделения кальцитонина человека принципиально не отличаются от методов выделения кальцитонина млекопитающих. Кальцитонин человека выделяют из С-клеток медуллярной карциномы цитовидной железы или С-клеток метастазных тканей экстракцией системой растворителей, чаще всего системой CH_3OH — CHCl_3 — 25% аммиак, 41 : 4 : 18. Экстракты концентрируют и выделяют неочищенный гормон высушиванием или осаждением [57, 58]. Далее гормон либо хроматографируют на сефадексе G-50 или биогеле 6Р, либо подвергают ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой C_{18} -Silasorb [59]. Эффективность очистки гормона контролируется биологическими тестами [1], ТСХ на окиси алюминия, силикагеле или сефадексе, высоковольтным электрофорезом на целлюлозе при pH 1,9 в буфере уксусная кислота — муравьиная кислота — вода, 95 : 26,5 : : 980, при 140 В или аминокислотным анализом с использованием трипсинового протеолиза [53, 56, 59].

4. Химический синтез кальцитонина

Большое терапевтическое значение кальцитонина в качестве эффективного лекарственного средства предопределяет необходимость расширения его производства. Однако промышленное получение кальцитонина сдерживается дефицитом эндокринного сырья. В связи с этим разработаны многочисленные варианты химического синтеза как кальцитонина, так и его модифицированных аналогов. В настоящее время многие фирмы США, Швейцарии, Англии и других стран производят препараты кальцитонина в промышленном масштабе с использованием методов химического синтеза в растворе [60–68] или на твердом носителе [11, 15, 69–84].

Существенное значение в синтезе кальцитонина, так же как и других полипептидов, имеют защитные группы. Как правило, для блокирования аминогруппы цистеина используют Вос-группу, для аминофункций других аминокислот — Tr- и VzI-группы или их производные; для аминогрупп пептидов — Вос- или 2-(*n*-дифенил)изопропилкарбонильную защиту. Карбоксигруппы аминокислот защищают амидированием или этерификацией *трет*-бутиловым, бензиловым или низшим спиртами. Гидроксигруппы серина, тирозина и треонина защищают VzI, Tr- и алкильными группами. Для защиты сульфгидрильных функций обычно используют Tr- и VzI-группы. Наконец, иминогруппы гистидина могут быть блокированы бензилкарбонильной группировкой, хотя необходимость в этом часто отсутствует.

Обычно синтез кальцитонина осуществляют путем направленной сшивки предварительно синтезированных блоков ди-, три- и тетрапептидов.

Для конденсации используют азидный метод (в этом случае защита гидроксигруппы не обязательна) [60, 63], метод смешанных ангидридов, метод активированных эфиров (*n*-нитрофениловый, *N*-гидроксисукцинимидный и другие эфиры) [63, 65], метод Вейгенда — Вюнна с использованием *N*-карбоксиянгидридов или *N*-тиокарбоксиянгидридов в присутствии *N*-гидроксисукцинимида [65, 66]. Иногда вместо карбоксигруппы активируют аминогруппы, используя реактив Вудворда. Возможно использование *N,N*-дициклогексилкарбодимида (DCC) и его аналогов [60, 63, 65]. Последний способ не пригоден для аспарагина и глутамина, а также содержащих эти аминокислоты пептидов, поскольку в присутствии DCC амидная группа легко превращается в нитрильную.

После завершения синтеза пептидного продукта следует стадия его полного деблокирования. Снятия защиты с тиоловых групп проводят в последнюю очередь из-за способности этих групп к окислению кислородом воздуха. Образование дисульфидного мостика между остатками цистеина в положениях 1 и 7 полипептидной цепи кальцитонина осуществляют в присутствии мягкого окислителя: действием пероксида водорода в метаноле или уксусной кислоте [65], перекисью водорода в водном аммиаке [63] или феррицианидом калия в воде [14]. Полученный таким образом кальцитонин подвергают хроматографической очистке.

В последнее время приобрел широкое распространение твердофазный синтез кальцитонина [85—87]. При этом используются в основном те же методы конденсации и защитные группы, что и при синтезе в растворе. Однако твердофазный синтез имеет определенные преимущества, связанные с возможностью автоматизации процесса, быстротой протекания реакций, удалением побочных продуктов реакций сочетания и деблокирования простым фильтрованием и промывкой растворителем и отсутствием необходимости выделения продуктов сочетания на каждой стадии синтеза в чистом виде. Успех твердофазного синтеза во многом определяется свойствами используемой нерастворимой полимерной матрицы [88].

Специфической стадией в твердофазном синтезе кальцитонина является отделение полностью синтезированного полипептида от матрицы. Это достигается применением жидкого фтористого водорода с добавками аммиака [67, 71, 87]. В такой среде наряду с отделением кальцитонина от матрицы происходит деблокирование всех функциональных групп.

В синтезированном описанным выше способом полипептиде дисульфидный мостик образуют окислением кислородом воздуха в водном аммиаке [67, 71]. Полученный препарат очищают гель-фильтрацией на сефадексе G-25 и либо хроматографируют на ионообменной смоле, либо рехроматографируют на сефадексе G-25. Иногда используют ВЭЖХ. Очистку кальцитонина контролируют ТСХ, аминокислотным анализом, спектрами КД или определением молекулярной массы седиментационным методом.

В последнее время все большее распространение приобретают методы распределительной хроматографии для очистки природных и синтетических кальцитонинов [89—91], при этом в качестве элюента используют водную смесь, содержащую бутанол до 20—50% и различные спирты, или ту же самую смесь с добавками уксусной кислоты и ацетата аммония.

Классическим и твердофазным методами синтеза получены разнообразные аналоги кальцитонина с точечными заменами отдельных аминокислотных остатков [66], укороченной [76, 80] или удлинённой [75] полипептидной цепью, а также с изменённым C-концом полипептидной цепи [67] или заменой остатков *L*-аминокислот на *D*-аминокислоты [74].

5. Микробиологический способ получения кальцитонина

В связи с тем что длительное лечение парашушения метаболизма костной ткани кальцитонином животного происхождения вызывает иммунологические реакции, обусловленные видовой специфичностью гормона, в медицинской практике предпочтительней использование кальцитонина челове-

ка. Пути получения этого гормона из природного сырья по понятным причинам ограничены. Синтез же кальцитонина сопряжен с рядом трудностей, перечисленных выше. Наиболее перспективно получение этого гормона микробиологическим методом с использованием техники культивирования клеток карциномы щитовидной железы, обладающей гиперсекрецией кальцитонина. Этот подход описан в недавно появившихся сообщениях [92, 93]. Конкретно он осуществляется следующим образом: в лимфобластоидные клетки человека предварительно внедряют генный материал из человеческих клеток, содержащих ген кальцитонина (опухольные клетки щитовидной железы, легкого), с помощью вируса *Sendai*, методов генетической рекомбинации или используя методы сшивания полиэтиленгликолем. После клонирования гибридных клеток их трансплантируют в организм теплокровных животных или суспендируют в диффузионной камере (камера вводится в организм животного внутривентриально), в которую поступает питательная среда из организма животного, кормление которого производится обычным способом. Описанный метод более надежен и требует намного меньше питательной среды по сравнению с методом размножения клеток в тканевой культуре *in vitro* [94]. Кроме того, продуцирование гормона в клетках, согласно описанному методу, протекает с большей скоростью и с более высоким выходом.

Развитие генной инженерии привело к появлению возможности получения штаммов-продуцентов микроорганизмов, способных синтезировать определенные полипептиды в больших количествах [95—98]. Известны продуценты соматостатина [99, 100], инсулина [101], кальцитонина [19—21, 22]. Структурный ген кальцитонина человека, нуклеотидная последовательность которого установлена Крейгом [34], получают чаще всего методом обратной транскрипции мРНК, размер которой составляет $1000 \pm \pm 100$ нуклеотидных оснований. Структурный ген кальцитонина получают также сшивкой фрагментов олигонуклеотидов [20], синтезируемых химическим путем с использованием разработанного Кораной фосфоэфирного метода [102]. Этот метод более трудоемок, чем предыдущий, тем более что после каждой стадии синтеза гена необходимо контрольное секвенирование нуклеотидной последовательности. Однако химический синтез гена обладает и важным преимуществом — допускает введение различных точечных замен в кодирующую последовательность. Эти замены могут не сказываться на иммунологических свойствах и биологической активности полипептида, но позволяют значительно расширить возможности последующего конструирования различных вариантов структурного гена кальцитонина человека [45, 103].

Структурный (природный или синтетический) модельный ген кальцитонина содержит только ту последовательность, которая необходима для синтеза полипептидной цепи кальцитонина, но не имеет системы регуляторов экспрессии. Для обеспечения эффективной экспрессии в плазмиду, содержащую структурный ген кальцитонина, встраивают синтетический триптофановый промотор-оператор и последовательность, служащую сигналом терминации транскрипции. Конструирование рекомбинантных плазмид-векторов проводят по схеме: циклический вектор рАН153 гидролизуют эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI, после чего рядом с регуляторными участками, содержащими триптофановый промотор-оператор, при помощи фермента ДНК-лигазы T4 пришивают последовательность структурного гена кальцитонина человека, у которого имеются комплементарные концы, и снова замыкают плазмиду в кольцо при помощи той же ДНК-лигазы [45]. В качестве клетки-хозяина чаще всего используют клетки *Escherichia coli*, реже — *Bacillus subtilis* и клетки некоторых дрожжевых культур. Для предохранения образовавшегося в клетках *E. coli* кальцитонина от протеолитической деградаци в состав рекомбинантной плазмиды включают также структурный ген белка *trp-E* [45].

Сконструированная таким образом плазида рСТ12 направляет эффективный синтез белка, включающего аминокислотную последовательность кальцитонина человека. Вырезание гормона из выделенного из клетки гибридного белка *trp-E*-кальцитонина осуществляется с помощью трипсиона,

который отщепляет кальцитонин по аргининовому остатку, предшествующему N-концевому остатку Cys кальцитонина в гибридном белке. Необходимо отметить, что собственно кальцитонин не содержит аргининовых остатков, однако во избежание расщепления цепи по остатку Lys-18 его предварительно защищают ацилированием цитраконовым ангидридом [20, 45].

Другой метод конструирования плазмиды, включающей в себя структурный синтетический ген кальцитонина, состоит в том, что в вектор pBR322 встраивают синтетический модельный фрагмент ДНК, кодирующий кальцитонин человека [19], в положении 8 которого метионинный остаток заменен на остаток валина — образуется плазида pCT30 [104—106]. При этом структура синтетического гена кальцитонина включает также иницирующий кодон и два терминирующих кодона. Экспрессия же структурного гена кальцитонина обеспечивает плазида pCT12, которую получают гидролизом плазмиды pCT30 под действием рестриктазы *EcoRI* с последующим встраиванием гена β -галактозидазы *E. coli*. Плазмидой pCT12 трансформируют выбранный штамм, клетки высевают на питательную среду, отбирают клон, продуцирующий большие количества гибридного белка. Полученный микробиологическим путем белок — продукт экспрессии гибридного гена плазмиды pCT12 — содержит аминокислотную последовательность кальцитонина. Последнее подтверждено положительной реакцией белка с антителами к кальцитонину человека. Упомянутая выше замена метионинного остатка на валиновый обусловлена тем, что при условии присоединения β -галактозидазы к последовательности кальцитонина через метионин вырезание гормона из гибридного белка с помощью бромциана невозможно. Замена же метионина-8 на валин такую возможность обеспечивает.

Необходимо отметить, что гибридные плазмиды можно сконструировать так, чтобы они в случае необходимости продуцировали аминокислотную последовательность кальцитонина с дополнительным остатком аминокислоты или дополнительным пептидным фрагментом [20, 45].

Ген кальцитонина можно присоединить и к другим генам, направляющим синтез второго полипептида, например β -лактамазы [107]. В работе [108] для предотвращения разрушения продуцируемого кальцитонина бактериальными протеиназами ген кальцитонина, содержащий остаток Val-8, олигомеризуют и полученные мультимерные генные блоки экспрессируют под контролем сильного синтетического промотора и соответствующих кодонов. Трансформанты отбирают по устойчивости к тетрациклину и ампициллину. Олигомерные гены кодируют мультимерный кальцитонин (до 132 аминокислотных остатков), который обработкой бромцианом превращают в мономерные формы кальцитонинов: кальцитонин с дополнительным метионинным остатком на N-конце и концевой COOH-группой, а также кальцитонин с дополнительным серином, пришитым к концевому пролину, имеющий в положении 8 вместо метионина остаток валина. Кальцитонин выделяют из рекомбинантных бактерий озвучиванием и экстракцией 2 М уксусной кислотой и очищают ТСХ на силикагеле. Биологическую активность тестируют по гипокальциемическому эффекту бактериальных экстрактов, который сравнивают с аналогичным эффектом синтетического кальцитонина [108].

В качестве составной части гибридного гена, продуцирующего кальцитонинсодержащий белок, используют также ген хлорамфениколацетила-трансферазы (CAT₁) [108]. В этом случае используют сконструированные гибридные плазмиды pCT2024 и pCT2026, кодирующие два варианта белков: нерастворимый CAT₁-Lys-Arg-кальцитонин-Gly и растворимый CAT₁-Gln-кальцитонин-Gly. Соответствующие им гибридные плазмиды вводят в клетки *E. coli*, культивирование трансформированных клеток осуществляют в ферментере в минеральной среде в присутствии хлорамфеникола. Белок CAT₁-Lys-Arg-кальцитонин-Gly выделяют следующим образом: клетки осаждают центрифугированием, суспендируют в трис-HCl-буфере, pH 8, содержащем EDTA, последовательно добавляют раствор фенолметилсульфонилфторида в спирте, лизоцим, раствор дезоксихолата и

ДНКазу, инкубируют до значительного понижения вязкости, после чего отделяют центрифугированием осадок, который промывают тритонсодержащим буфером. Чистоту белка проверяют электрофорезом на ПААГ. Выделенный таким образом гибридный белок расщепляют кlostрипаином и отделяют центрифугированием кислый супернатант, содержащий кальцитонин-Gly. Последний очищают ВЭЖХ на колонке Synchropak RP-P, используя в качестве элюента смесь, содержащую от 30 до 45 об.% ацетонитрила и 0,4 об.% трифторуксусной кислоты.

Для извлечения и первичной очистки растворимого белка CAT₁-Gln-кальцитонин-Gly применяют аффинную хроматографию с иммобилизованным на сорбенте субстратом для CAT₁. Адсорбированный гибридный белок элюируют трис-HCl-буфером, pH 7, 8, содержащим EDTA, NaCl, хлорамфеникол. Элюцию белка контролируют по ацетилирующей активности элюируемых фракций в отношении хлорамфеникола. Чистоту белка определяют электрофорезом в ПААГ, а наличие кальцитонинового фрагмента подтверждают радиоиммунологическим анализом с использованием антител к кальцитонину человека. Очищенный гибридный белок диализуют и расщепляют стафилококковой протеиназой, в результате чего образуется полипептид кальцитонин-Gly, который очищают полупрепаративной ВЭЖХ. Кальцитонины, полученные из обоих гибридных белков, идентичны [19].

На С-конце кальцитонина, выделенного из продуктов микробиологического синтеза, в отличие от нативного кальцитонина может располагаться либо Pro [20, 42], либо Pro-Gly [19, 21], либо Pro-Gly-трипептид (основной) [22]. В связи с тем, что дезамидированная форма кальцитонина обладает пониженной биологической активностью, возникает проблема модифицирования С-конца кальцитонина с образованием пролинамидной формы. Превращение карбоксигруппы С-концевого пролина в рекомбинантном кальцитонине непосредственным амидированием возможно только химическим путем: либо реакцией свободной карбоксильной группы полипептида с аммиаком в присутствии DCC или другого водоотнимающего агента, либо аммонолизом сложного эфира кальцитонина, как это принято в пептидной химии [109]. Следует отметить и тот факт, что в результате амидирования кроме Pro-NH₂ возможно образование дополнительной амидной группы у аспарагиновой кислоты в положении 15 полипептидной цепи; влияние амидной группы в положении 15 на биологическую активность кальцитонина в литературе не установлено.

Модифицирование С-конца рекомбинантного гормона в форме кальцитонин-Gly возможно с использованием ферментного метода. Пептидил-глицил- α -амидирующая монооксигеназа (РАМ), выделенная из гипофиза или гипоталамуса млекопитающих, способна осуществлять реакцию амидирования пептидил-глицина [110-112]. Амидирующей способностью обладает широкая фракция белка, содержащая фермент (молекулярная масса от 60 000 до 100 000 Да). При использовании чистого фермента выход амида достигал ~40%. Специфичность фермента изучена на ряде синтетических трипептидов [113, 114], в результате показано, что необходимым условием ферментативного амидирования является наличие глицинового или лейцинового остатков на С-конце пептида.

Как было отмечено выше, кальцитонин, полученный микробиологическим способом в виде полипептида, состоящего из 32 аминокислотных остатков и связанного через остаток глицина с ди- или трипептидом основного характера, обладает гипокальциемическим эффектом подобно нативному кальцитонину и не требует дополнительной модификации.

Необходимо отметить, что до последнего времени в качестве организма-хозяина для клонирования и экспрессии гена полипептида в основном использовали *E. coli*. Однако промышленное применение этой бактерии ограничивается по ряду причин. Важнейшая из них — это то, что *E. coli* не выделяет в среду продуцируемого белка. Таким образом, проблема микроорганизма-хозяина остается одной из главных проблем в рекомбинантных методах при получении кальцитонина.

Рассмотренные в настоящем обзоре способы получения кальцитонина демонстрируют довольно широкий спектр возможностей достижения желаемой цели. Однако, как следует из изложенного, каждый из способов включает серьезные производственные трудности. Быстрые темпы роста, которые набирает в настоящее время биотехнология, свидетельствуют, что наибольшие перспективы имеет кальцитонин, полученный микробиологическими методами. Однако не менее значительный прогресс в пептидном синтезе не дает права полностью исключать перспективу получения и синтетического кальцитонина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альтшулер Р. А., Коротаев Г. К. // Хим.-фармакол. журн. 1985. Т. 19. № 5. С. 627-635.
2. Уайт А., Хендлер Ф., Смир Э., Хилл Р., Леман И. Основы биохимии. Т. 3. М.: Мир, 1981. С. 1570-1574.
3. Биохимия гормонов и гормональной регуляции/Ред. Афиногенов С. А. М.: Наука, 1976. С. 132-144.
4. Алешин Б. В. // Успехи соврем. биол. 1969. Т. 67. Вып. 1. С. 79-98.
5. Milhaud G. // Biomed. Pharmacother. 1984. V. 38. № 5. P. 227-229.
6. Riniker B., Neher R., Maier R., Kahnt F. W., Bufield P. G. H., Gudmundsson T. V., Galante L., MacIntyre I. // Helv. chim. acta. 1968. V. 51. № 7. P. 1738-1742.
7. Neher R., Riniker B., Rittel W., Zuber H. // Helv. chim. acta. 1968. V. 51. № 8. P. 1900-1905.
8. Dietrich F. M., Rittel W. // Nature. 1970. V. 225. P. 75-76.
9. Moe G. R., Kaiser E. T. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 8. P. 1971-1976.
10. Schwaris K. E., Orłowski R. C., Marcur R. // Endocrinology. 1981. V. 108. № 3. P. 831-835.
11. Austin L., Heath H. // New Engl. J. Med. 1981. V. 304. № 5. P. 269-278.
12. Findlay D. M., Michelangeli V. P., Martin T. J., Orłowski R. C., Seyler J. K. // Endocrinology. 1985. V. 117. № 3. P. 801-805.
13. Merle M., Lefevre G., Milhaud G. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. V. 89. № 2. P. 455-460.
14. Tobler P. H., Joehl A., Born W., Maier R., Fischer J. A. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 107. № 1. P. 59-65.
15. Moe G. R., Miller R. G., Kaiser E. T. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 12. P. 4100-4102.
16. Baylin S. B., Bailey A. L., Hsu T. H., Foster G. V. // Metabolism. clin. Exp. 1977. V. 26. № 12. P. 1346-1354.
17. Pento J. T. // Mol. Cell Endocrinol. 1978. V. 12. № 1. P. 31-40.
18. Nwankwoala R. P., Pento J. T. // Hormone Res. 1981. V. 15. № 3. P. 198-206.
19. Bennett A. D., Rhind S. K., Lowe P. A., Hentschel C. C. G. PCT Int. WO 84 04756 // C. A. 102; 216306b.
20. Craig R. K. Eur. pat. EP. 70186 GB // C. A. 99:1101q.
21. Bennett A. D., Rhind S. K., Lowe P. A., Hentschel C. C. G. Eur. pat. EP. 131363 // C. A. 102; 216306b.
22. Tanaka S., Ohsuye K., Kubota J., Ohnuma N., Noguchi T. Eur. pat. EP. 95351 // C. A. 100; 115836c.
23. Orimo H., Shiraki M., Yamauchi H., Hirano T. // Endocrinol. Proc. Int. Congr. Endocrinol., 6th. 1980. P. 340-343. C. A. 94:62142x.
24. Perez-Cano R., Girgis S. I., Galan G. F., MacIntyre I. // J. Endocrinol. 1982. V. 92. № 3. P. 351-355.
25. Milhaud G., Bolis L., Benson A. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 11. P. 6935-6936.
26. Perez-Cano R., Galan F., Girgis S. I., Arnett T. R., MacIntyre I. // Experientia. 1981. V. 37. № 10. P. 1116-1118.
27. Dermody W. C., Rosen M. R., Ananthaswamy R., McCormick W. M., Levy A. G. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1981. V. 52. № 6. P. 1090-1098.
28. Foster G. V., MacIntyre I., Pearse G. E. // Nature. 1964. V. 203. № 4949. P. 1029-1030.
29. Lenz H. J., Rivier J. E., Brown M. R. // Regul. Pept. 1985. V. 12. № 2. P. 81-84. C. A. 103:207251y.
30. Foster G. V., Baghdiantz A., Kumar M. A., Clack E., Soliman H. A., MacIntyre I. // Nature. 1964. V. 202. № 4939. P. 1303-1305.
31. Amara S. G., Jonas V., Rosenfeld M. G., Ong E. S., Evans R. M. // Nature. 1982. V. 298. № 5871. P. 240-244.
32. Amara S. G., Jonas V., O'Neil J. A., Vale W., Rivier J., Roos B. A., Evans R. M., Rosenfeld M. G. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 5. P. 2129-2132.
33. Goodman R. H., Jacobs J. W., Hebener J. F. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1979. V. 91. № 3. P. 932-938.
34. Allison J., Hall L., MacIntyre I., Craig R. K. // Biochem. J. 1981. V. 199. № 3. P. 725-731.
35. Craig R. K., Hall L., Edbrooke M. R., Allison J., MacIntyre I. // Nature. 1982. V. 295. № 5847. P. 345-347.

36. *Rosenfeld M. G., Amara S. G., Jonas V., Evans R. M.* // J. Cell. Biochem., Suppl. 1982. № 6. P. 116–118.
37. *Rosenfeld M. G., Amara S. G., Roos B. A., Ong E. S., Evans R. M.* // Nature. 1981. V. 290. № 5801. P. 63–65.
38. *Fisher L. A., Kikkawa D. O., Rivier J. E., Amara S. G., Evans R. M., Rosenfeld M. G., Vale W. W., Brown M. R.* // Nature. 1983. V. 305. № 5934. P. 534–538.
39. *Craig R. K., Edbrooke M. R.* PCT Int. WO 85 00643. GB // C. A. 102:198971h.
40. *MacIntyre I.* PCT Int. WO 85 01658 GB // C. A. 103:215812x.
41. *Roos B. A., Brinbaum R. S.* // Int. Congr. Ser.-Excerpta. Med. 1985. V. 663. P. 17–21. C. A. 104:46100b.
42. *Roos B. A., O'Neil J. A., Muszynski M., Brinbaum R. S.* // Int. Congr. Ser.-Excerpta Med. 1984. V. 619. P. 169–175. C. A. 102:106833p.
43. *Sabate M. I., Stolarsky L. S., Polak J. M., Bloom S. R., Varndell I. M., Ghatei M. A., Evans R. M., Rosenfeld M. R.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 5. P. 2589–2592.
44. *Brinbaum R. S., O'Neil J. A., Muszynski M., Aron D. C., Roos B. A.* // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 1. P. 241–244.
45. *Craig R. K., MacIntyre I.* Eur. pat. EP 70675 GB // C. A. 99:37102e.
46. *Jacobs J. W., Goodmann R. H., Chin W. W., Dee P. C., Habener J. F., Bell N. H., Rotts J. T.* // Science. 1981. V. 213. № 4506. P. 457–459.
47. *Ziff E. B.* // Nature. 1980. V. 287. № 5782. P. 491–499.
48. *Amara S. G., David D. N., Rosenfeld M. R., Roos B. A., Evans R. M.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 8. P. 4444–4448.
49. *Craig R. K.* PCT Int. WO 8300346 // C. A. 99:1101 q.
50. *Mains R. E., Eipper B. A., Glembotski C. C., Doros R. M.* // Trends Neurosci. 1983. № 6. P. 229–235.
51. *Zajac J. D., Martin T. J., Hudson P., Niall H., Jacobs J. W.* // Endocrinology. 1985. V. 116. № 2. P. 749–755.
52. *Coop D. H., Cameron E. C., Cheney B. A., Davidson A. C. T., Henze R. G.* // Endocrinology. 1962. V. 70. № 4. P. 638–641.
53. *Neher R., Kahnt F.* Pat. 4041022 US.
54. *Arnau C. D., Minn R.* Pat. 3775394 US // C. A. 72:125057s.
55. *Orlowski R. C., Groginsky C. M., Seyler J. K.* Pat. 4336187 US // C. A. 97:182875x.
56. *Королев Г. К., Гафурова Н. Д., Стальмакова А. Л., Гамазина Е. В., Кочергин П. М., Гендролис А.* Способ получения кальцитонина. А. с. № 727197 СССР // Б. И. 1980. № 14.
57. *Neher R., Riniker B.* Pat. 4347242 US // C. A. 98:78130k.
58. *Li C. M., Ho W. Ch., Ma P. Ch.* // Ko'Hsueh T'Hung Pao. 1981. V. 26. № 9. P. 576. C. A. 95:38297b.
59. *Lambert P. W., Roos B. A.* // J. Chromatogr. 1980. V. 198. № 3. P. 293–299.
60. *Sieber P., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Rittel W.* // Helv. chim. acta. 1968. V. 51. № 8. P. 2057–2061.
61. *Nakagawa Y., Morikawa T., Sakakibara S.* // Peptide Chemistry. 1977. V. 15. P. 189–194.
62. *Guttman St., Pless J., Huguenin R. L., Sandrin Ed., Bossert H., Zehnder K.* // Helv. chim. acta. 1969. V. 52. № 7. P. 1789–1795.
63. *Guttman S., Pless J.* Pat. 3749703 US // C. A. 73:131312h.
64. *Brugger M., Riniker B., Rittel W.* Pat. 3798203 US // C. A. 75:36697v.
65. *Rittel W., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Reinach P., Greven H.* Pat. 3849388. US // C. A. 73:25879p.
66. *Rittel W., Brugger M., Kamber B., Riniker B., Sieber P., Greven H.* Pat. 3934008 US // C. A. 73:110136p.
67. *Orlowski R. C., Seyler J. K.* Pat. 4495097 US // C. A. 102:2212209b.
68. *Rittel W., Brugger M., Kamber B., Sieber P., Greven H.* Pat. 4159981 US // C. A. 73:110136p.
69. *Orlowski R. S., Seyler J. K.* Pat. 2521553 Fr // C. A. 100:7166a.
70. *Orlowski R. C., Seyler J. K.* Pat. 4414149 US // C. A. 100:52023n.
71. *Stahl G. L., Orlowski R. C.* Pat. 4444681 US // C. A. 101:73111a.
72. *Orlowski R. C., Seyler J. K.* Pat. 4451395 US // C. A. 101:111411h.
73. *Orlowski R. C., Stahl G. L., Colescott R. L.* Pat. 4528132 US // C. A. 103:160864h.
74. *Orlowski R. C., Seyler J. K.* Pat. 4469632 US // C. A. 102:7097v.
75. *Hughes J. L., Liu R. C., Seyler J. K.* Pat. 4239680 US // C. A. 95:62720e.
76. *Orlowski R. C., Seyler J. K.* Pat. 4391747 US // C. A. 99:140412e.
77. *Hughes J. L., Liu R. C., Seyler J. K.* Pat. 4212795 US // C. A. 94:66084c.
78. *Hughes J. L., Seyler J. K., Liu R. C.* Pat. 4033940 US // C. A. 87:152557w.
79. *Hughes J. L., Seyler J. K., Liu R. C.* Pat. 4062815 US.
80. *Hughes J. L., Liu R. C., Seyler J. K.* Pat. 4217268 US // C. A. 93:239956y.
81. *Orlowski R. C., Seyler J. K.* Pat. 4388235 US // C. A. 99:140408h.
82. *Hughes J. L., Liu R. C., Seyler J. K.* Pat. 4239680 US // C. A. 95:62720e.
83. *Merrifield R. B.* // Angew. Chem. 1985. B. 97. № 10. S. 801–812.
84. *Alhadeff M.* // Med. Actual. 1978. V. 14. № 4. P. 137–142. C. A. 89:71160a.
85. *Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I.* // Anal. Biochem. 1970. V. 34. № 2. P. 595–598.
86. *Sarin V. K., Kent S. B. II., Tam J. P., Merrifield R. B.* // Anal. Biochem. 1981. V. 117. № 1. P. 147–157.
87. *Yamashiro D., Li C. H.* // J. Amer. Chem. Soc. 1978. V. 100. № 16. P. 5174–5179.
88. *Дюга Г., Пенни К.* Биорган. химия. М.: Мир, 1983. С. 67–68.

89. *Kartinos N. J.* Pat. 4336157 US // C. A. 97:88248g.
90. *Orlowski R. C., Groginsky C. M., Seyler J. K.* Pat. 4422967 US // C. A. 100:117486.
91. *Maier R., Bruqger M., Brueckner H., Kamber B., Biniker B., Rittel W.* // *Acta Endocrinol.* 1977. V. 85. № 1. P. 102-108.
92. *Sugimoto K.* Pat. 2497100 Fr // C. A. 97:168889y.
93. *Sugimoto K.* Pat. 2092157 GB // C. A. 97:168889y.
94. *Lamberts S. W. J., Hackeng W. H. L., Visser T. J.* // *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1982. V. 18. № 3. P. 253-260.
95. Биотехнология/Отв. ред. Баев А. А. М.: Наука, 1984. С. 155-160.
96. *Воробьев В. А., Ключарев Л. А., Лапина Г. Ф.* // *Успехи соврем. биохимии.* 1985. Т. 92. Вып. 2. С. 167-179.
97. *Баев А. А.* // *Вестн. АН СССР.* 1982. № 4. С. 22-23.
98. *Овчинников Ю. А.* // *Вестн. АН СССР.* 1982. № 4. С. 4-17.
99. *Goeddel D. V., Heyneker H. L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Vansura D. G., Ross M. J., Miozzari G., Crea R., Seeburg P. H.* // *Nature.* 1979. V. 281. № 5732. P. 544-548.
100. *Ohisuka E., Ikehara M., Söll D.* // *Nucl. Acids Res.* 1982. V. 10. № 19. P. 6553-6570.
101. *Goeddel D. V., Kleid D. G., Bolivar F., Heyneker H. L., Vansura D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A. D.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 1. P. 106-110.
102. *Sgaramella V., Van de Sande J. H., Khorana H. G.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1970. V. 67. № 3. P. 1468-1475.
103. *Emlage J., Hentschel C., Stephens P.* Pat. PCT Int. WO 84 0380 // C. A. 100:186691n.
104. *Рубцов П. М., Чернов Б. К., Горбулев В. Г., Парсаданян А. Ш., Свердлов П. С., Чупеева В. В., Голова Ю. Б., Батчикова Н. В., Жвирблис Г. С., Скрыбин К. Г., Баев А. А.* // *Молекулярн. биол.* 1985. Т. 19. № 1. С. 267-277.
105. *Рубцов П. М., Батчикова Н. В., Голова Ю. Б., Свердлов П. С., Чупеева В. В., Чернов Б. К., Скрыбин К. Г., Баев А. А.* // *Докл. АН СССР.* 1985. Т. 283. № 6. С. 1507-1509.
106. *Голова Ю. Б., Чернов Б. К., Баев А. А.* // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 277. № 5. С. 1258-1260.
107. *Lau E., Suggs S.* PCT Int. WO 83 04028 // C. A. 101:1833g.
108. *Ivanov J., Jay C.* // *Biotechnology. Bioindustry.* 1985. № 2. P. 6-13.
109. *Мазуров А. А., Антоненко С. В., Андрианов С. А.* // *Химия природных соедин.* 1986. № 2. С. 224-225.
110. *Bradbury A. F., Finnie M. D. A., Smyth D. G.* // *Nature.* 1982. V. 298. № 5875. P. 686-688.
111. *Emeson R. B.* // *J. Neuroscience.* 1984. V. 4. № 10. P. 2604-2613.
112. *May V., Eipper B. A.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 30. P. 16224-16231.
113. *Bradbury A. F., Smyth D. G.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 112. № 2. P. 372-375.
114. *Glembotski C. C., Eipper B. A., Mains R. E.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 10. P. 6385-6392.

Поступила в редакцию
22.III.1989

После доработки
15.IV.1989

CALCITONIN : PRODUCTION, ISOLATION AND PURIFICATION

MYSHKINA L. A., KOROTAEV G. K., DAVIDOVITSH Yu. A*.

All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow;

**A. N. Nesmeyanov Institute of Elementoorganic Compounds,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Calcitonin structure, biological activity, formation in organism and methods of production including isolation from natural sources, chemical synthesis and genetic engineering methods are reviewed.