

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

Грегірчак Н.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2020 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2020 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Біотехнологія»

на тему: Одержання інсуліну культивуванням *Escherichia coli*

Виконав: здобувач IV курсу, групи 1

Ткачова Владислава Ігорівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Скроцька Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти Клименко О.М.
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній
роботі немає запозичень із праць
інших авторів без відповідних
посилань.

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2020 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь бакалавр
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(шифр і назва)
Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.

«17» березня 2020 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Ткачової Владислави Ігорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання інсуліну культивуванням *Escherichia coli*

керівник роботи Скороцька О.І., к.б.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом вищого навчального закладу від «16» березня 2020 року № 227-к

2. Строк подання здобувачем роботи 01 червня 2020 року

3. Вихідні дані до роботи *Escherichia coli*, інсулін

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Обґрунтування біологічного агента
Техніко-економічне обґрунтування
Параметри культивування біологічного агента
Спосіб виділення цільового продукту
Контроль виробництва та готової продукції

5. Перелік графічного матеріалу

Схема біосинтезу цільового продукту (додаток, А3)
Технологічна схема (2 листа А1)
Апаратурна схема (1 лист А2, 2 листа А1)
Схема ділянки автоматизації виробництва (1 лист А3)

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
11	Клименко Олег Миколайович доцент, к.т.н., кафедра автоматизації та комп'ютерних технологій систем управління	23.03.2020	24.03.2020

7. Дата видачі завдання «17» березня 2020 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Опис цільового продукту	20.03.2020	
2	Обґрунтування вибору біологічного агента	25.03.2020	
3	Характеристика біологічного агента <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1	27.03.2020	
4	Техніко-економічне обґрунтування	01.04.2020	
5	Біосинтез цільового продукту	05.04.2020	
6	Обґрунтування вибору технологічної схеми	15.04.2020	
7	Продуктовий розрахунок, розрахунок технологічного обладнання, матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу	25.04.2020	
8	Технологічна схема	05.05.2020	
9	Опис технологічної схеми одержання інсуліну	10.05.2020	
10	Апаратурна схема та специфікація обладнання	20.05.2020	
11	Контроль виробництва	26.05.2020	
12	Автоматизація ділянки виробництва інсуліну	28.05.2020	
13	Список використаної літератури	29.05.2020	
14	Вступ. Реферат. Зміст	31.05.2020	

Здобувач

підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи

(підпис)

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційний проект присвячений розробці способу виробництва інсуліну при культивуванні *Escherichia coli* 20 IBA 1.

Інсулін - гормон, що використовується для лікування цукрового діабету першого типу. Розрахована потужність виробництва 12,84 кг за 60 робочих днів. Особливостями культивування є: температура 37°C, pH 6,9±0,5, перемішування 200 об/хв, необхідність додавання підживлюючих розчинів глюкози та проліну. Проліну початкова концентрація складає 0 г/л, загальна – 149,9 г/л. Початкова концентрація глюкози становить 8 г/л, загальна – 109,42 г/л, внесення глюкози в середовище різне протягом всього процесу виробничого біосинтезу. Особливостями очищення є: руйнування бактеріальних клітин для відділення тілець включення, розчинення та ренатурація, ферментативна конверсія, очищення використанням двох типів хроматографії, ліофільне висушування та гама-стерилізація готового запакованого продукту.

Для виробництва необхідне обладнання для підготовки очищеного повітря, насоси, збірники, ферментер, високошвидкісні проточні центрифуги з охолодженням, гомогенізатор високого тиску, фільтрувальні системи, хроматографічні системи: для іонообмінної та високошвидкісної рідинної хроматографій, ліофільна сушарка та електронно-променевий стерилізатор.

Технологічний процес включає проведення контролю споживання джерела вуглецю – глюкози та джерела азоту – проліну – методом високоефективної рідинної хроматографії, біомаси – спектрофотометричним методом, інсуліну – методом ультра-високоефективної рідинної хроматографії та контролю якості готового продукту – технологічний, фізико-хімічний та біологічний.

Кваліфікаційний проект складається з вступу, одинадцяти розділів, списку використаних джерел (51 найменування), двох листів технологічної схеми (формат A1), трьох листів апаратурної схеми (формат A2 та A1), схеми біосинтезу цільового продукту (формат A3) та схеми автоматизації ділянки виробництва (формат A3). Загальний обсяг роботи – 195 сторінок, 27 рисунків, 42 таблиці.

Ключові слова: *Escherichia coli* 20 IBA 1, створення рекомбінантного інсуліну, цукровий діабет, інсулін.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОПИС ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	11
1.1. Загальна характеристика цільового продукту.....	11
1.2. Будова молекули інсуліну.....	15
1.3. Фізико-хімічні властивості інсуліну.....	17
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	19
2.1.Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування.....	19
2.2.Розрахунок складу поживного середовища.....	26
РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1.....	30
3.1. Морфолого-культуральні ознаки <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1.....	30
3.2. Фізіолого-біохімічні ознаки <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1.....	31
3.3. Таксономічний статус <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1.....	32
3.4.Особливості метаболізму <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1.....	33
3.5. Характеристика етапів конструювання біологічного агента <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1.....	34
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	36
4.1. Потреба у цільовому продукті.....	36
4.2. Розрахунок потужності виробництва інсуліну.....	38
4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера.....	38
4.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	39
РОЗДІЛ 5. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ.....	41
5.1. Шлях катаболізму ростового субстрату в <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1.....	41
5.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	43
5.3.Спрощена схема біосинтезу цільового продукту.....	47
РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	48
6.1. Обґрунтування способу культивування <i>Escherichia coli</i> 20 ІВА 1.....	48

6.2. Обґрунтування типу ферментера.....	49
6.3.Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, обладнання і комунікацій.....	50
6.4.Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів.....	54
6.5.Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря.....	57
6.6.Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища.....	58
6.7. Обґрунтування способу виділення та очищення інсуліну з продуценту <i>Escherichia coli</i> 20 IBA 1.....	66
6.7.1. Обґрунтування стадії відділення біомаси.....	69
6.7.2. Обґрунтування стадії руйнування клітин <i>Escherichia coli</i> 20 IBA 1.....	71
6.7.3. Обґрунтування стадії розчинення тілець включення та ренатурації.....	76
6.7.4. Обґрунтування стадій очищення інсуліну.....	78
6.7.5. Обґрунтування стадії сушіння інсуліну.....	90
6.7.6. Обґрунтування стадії фасування порошку інсуліну.....	92

РОЗДІЛ 7. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДИН ЦИКЛ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ 97

7.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів).....	99
7.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу.....	99
7.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу.....	99
7.2.2. Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу....	99
7.2.3. Приготування та стерилізація мікроелементів для стадій підготовки посівного матеріалу та для виробничого біосинтезу.....	100
7.2.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері геометричним об'ємом 100 л..	101

7.2.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 10 л.....	104
7.2.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці.....	106
7.3. Розрахунок напівпродуктів і баластних речовин в культуральній рідині після виробничого біосинтезу.....	108
7.4. Розрахунок стадії відділення біомаси центрифугуванням.....	109
7.5. Розрахунок стадій руйнування клітин <i>Escherichia coli</i> 20 IBA 1.....	110
7.6. Розрахунок стадій розчинення тілець включення та ренатурації.....	112
7.7. Розрахунок стадії ферментативної конверсії.....	113
7.7.1. Розчинення в буферному розчині та ферментативна конверсія...	113
7.7.2. Осадження інсуліну.....	113
7.8. Розрахунок стадій хроматографічної очистки інсуліну.....	114
7.9. Розрахунок стадії сушіння в сублімаційній сушарці.....	116
7.10. Розрахунок стадії ПМВ.....	116
7.11. Розрахунок матеріального балансу.....	117
7.12. Розрахунок технологічного обладнання.....	123
РОЗДІЛ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	131
РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІНСУЛІНУ.....	136
РОЗДІЛ 10. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	158
10.1. Карта контрольних точок виробництва інсуліну	158
10.2. Контроль процесу виробництва інсуліну.....	171
10.2.1. Технологічний контроль.....	171
10.2.2. Мікробіологічний контроль.....	171
10.2.3. Показники росту і синтезу цільового продукту.....	172
10.3. Контроль готового продукту.....	175
10.3.1. Технологічний контроль.....	175
10.3.2. Фізико-хімічний контроль.....	175
10.3.3. Біологічний контроль.....	176
РОЗДІЛ 11. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ІНСУЛІНУ.....	179

11.1.	Опис апаратурно-технологічної схеми виробничої ділянки.....	180
11.2.	Опис функціональної схеми автоматизації.....	186
11.3.	Специфікація засобів автоматизації.....	187

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	190
-------------------------------------	-----

ДОДАТКИ

ВСТУП

Цукровий діабет є одним з найрозповсюдженіших захворювань в Україні. З кожним роком все більше людей захворюють на цю хворобу. Цукровий діабет не лікується повністю, але при дотриманні спеціальної дієти та постійному прийманні необхідних ліків можна уникнути симптомів та загострення хвороби. Основним лікарським препаратом для підтримання життєздатності організму хворого є препарати інсуліну, який більшості хворих необхідно колоти по декілька разів на добу. При недотриманні такої умови можуть бути навіть летальні наслідки [1, 2].

Інсулін постачають закордонні виробники «Ново Нордіск» (Данія) та «Біотон С.А.» (Польща), а також українські заводи ПрАТ «Індар» та ПАО «Фармак». Оскільки препарати інсуліну є життєво необхідними для діабетиків, держава кожен рік робить замовлення згідно потреби за державні кошти. Для цього виставляється тендер, в якому приймають участь українські та закордонні виробники, які мають всі необхідні сертифікати, що затверджують якість та дають право на реалізацію. Для отримання тендеру важливим є не тільки ціна та якість препарату, а також сумісність його для пацієнтів. Це зумовлено тим, що пацієнти можуть використовувати лише певні препарати відповідно до форми захворювання та особистої схильності. Іноземні препарати мають високу якість та часто є універсальними, проте вони дорогі. Вітчизняні препарати коштують набагато дешевше, але їх використання хворими часто супроводжується відторженням, алергічними реакціями та побічними ефектами (одним з найрозповсюджених є втрата зору). На даний час держава закуповує препарат «Актрапід» компанії «Ново Нордіск» [2].

Потреба в препаратах інсуліну, яку визначає держава, не показує справжнього положення. Крім того, з постійним збільшенням кількості хворих, бюджет на ліки кожен рік зменшують. Останнім часом замовлення препарату здійснюють на регіональному рівні. Бюджет окремих регіонів дуже незначний, тому вони не можуть

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Ткачова В. І.			ВСТУП			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Скροцька О. І.								8	3
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т. П.									

закупити інсулін. Отже, велика частина діабетиків залишається без ліків [2].

Для подолання цієї проблеми є необхідним удосконалення методів отримання вітчизняного інсуліну, що дасть змогу підвищити його якість та знизити вартість. Таким чином держава зможе за ті ж кошти купувати більше препарату та забезпечити ним більше хворих.

Інсулін був першим отриманим штучно гормоном, тому на даний час існує багато різних методів синтезу інсуліну за допомогою генетично модифікованих культур клітин – бактеріальних, дріжджових, рослинних та тваринних. Раніше препарати інсуліну для лікування цукрового діабету отримували зі свинячого або бичачого гормону, оскільки вони є найближчими до людського за будовою. Але виробництво їх є складним, дороговартісним, а такі препарати підходять меншій частині хворих, тому шукали способи вдосконалення технології [3].

З розвитком генної інженерії стало можливим використання рекомбінантних штамів бактерій та дріжджів, в які вбудовано ген продукування людиноподібного проінсуліну, на чому і базується сучасний процес розробки препаратів інсуліну. Використання таких мікроорганізмів має багато переваг – синтез людиноподібного гормону, який підходить всім хворим; порівняно дешеві середовища; можливість керування процесом біосинтезу; в більшості випадків висока швидкість зростання; порівняно високі рівні експресії. Найбільш широко використовуваними штамми для експресії є *E. coli* JM109 та *E. coli* BL21, а також різні штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та *Pichia pastoris*. Досі пропонуються нові технології виробництва рекомбінантного інсуліну, які направлені на спрощення та подешевшання процесу при використанні різних продуцентів та векторів експресії, а також на збільшення виходу продукту біосинтезу – проінсуліну [3-6].

Мета роботи: проектування виробництва субстанції інсуліну, що буде якомога дешевим, максимально чистим та безпечним для застосування, розробка технологічної та апаратурної схем виробництва, а також забезпечення екологічної безпеки виробництва.

Актуальність роботи: недостатня кількість препарату для лікування всіх хворих; використання тваринного білку, що супроводжується несумісністю; погана очистка інсуліну, що викликає побічні реакції; малі обсяги вітчизняного виробництва, що вимагає завезення дороговартісних закордонних препаратів [1, 2].

Новизна роботи: використання рекомбінантного штаму *E. coli* 20 IBA 1, що синтезує цільовий продукт (інсулін) у концентрації 14,5 г/л, що майже в 5 разів більше ніж при використанні традиційних генно-інженерних продуцентів, а саме *E. coli* JM109, що продукує 3 г/л інсуліну, та *Pichia pastoris* GS115his⁻/pPIC9K, що синтезує 3,08 г/л гормону. Оптимізовано виділення інсуліну, що дозволяє спростити та прискорити процес, а також знизити його вартість. Вибір способу очищення інсуліну дозволяє скоротити час очищення більш ніж в два рази та отримати максимально чистий продукт – 98-99%, в той час як інші методи дають чистоту 96% та ~98% [4-7].

РОЗДІЛ 1. ОПИС ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

1.1. Загальна характеристика цільового продукту

Інсулін – гормон білкової природи, що виробляється β -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози. Регулює обмін вуглеводів та білків, бере участь у реакціях обміну речовин та підсилює транспорт амінокислот крізь мембрани. Однією з основних функцій є зниження рівня глюкози в крові, що відбувається завдяки забезпеченню інсуліном проникності клітинних мембран для цього моносахариду [8].

В організмі інсулін гідролізується протеолітичними ферментами – трипсином, хімотрипсином, пепсином – тканинними протеазами а пептидазами, а також печінковим ферментом інсуліназою [9].

Фізіологічно в організмі інсулін регулює обмін речовин. В регуляції вуглеводного метаболізму інсулін зменшує концентрацію глюкози в крові:

1. збільшує проникність мембран клітин для глюкози, що полегшує її вхід у клітини;
2. сприяє утворенню з глюкози глікогену в клітинах м'язів, печінки і одночасно пригнічує глікогеноліз шляхом інгібування ферментів глікогенфосфорилази та глюкозо-6-фосфатази;
3. зменшує глюконеогенез [10].

Для жирового обміну нсулін зменшує концентрацію жирних кислот і кетонів у крові:

1. збільшує транспорт глюкози в жирові клітини;
2. стимулює в жирових тканинах синтез жирних кислот, гліцерофосфатів, тригліцеридів, пригнічує ліполіз;
3. зменшує утворення кетонів шляхом гальмування деградації жирних кислот у

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Ткачова В. І.			РОЗДІЛ 1. ОПИС ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ			Лім.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Скροцька О. І.								101	8
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т. П.									

печінці [10].

Для білкового метаболізму інсулін зменшує концентрацію амінокислот у крові:

1. стимулює вхід амінокислот у клітини;
2. збільшує синтез білків;
3. пригнічує катаболізм білків;
4. зменшує окислення амінокислот [10].

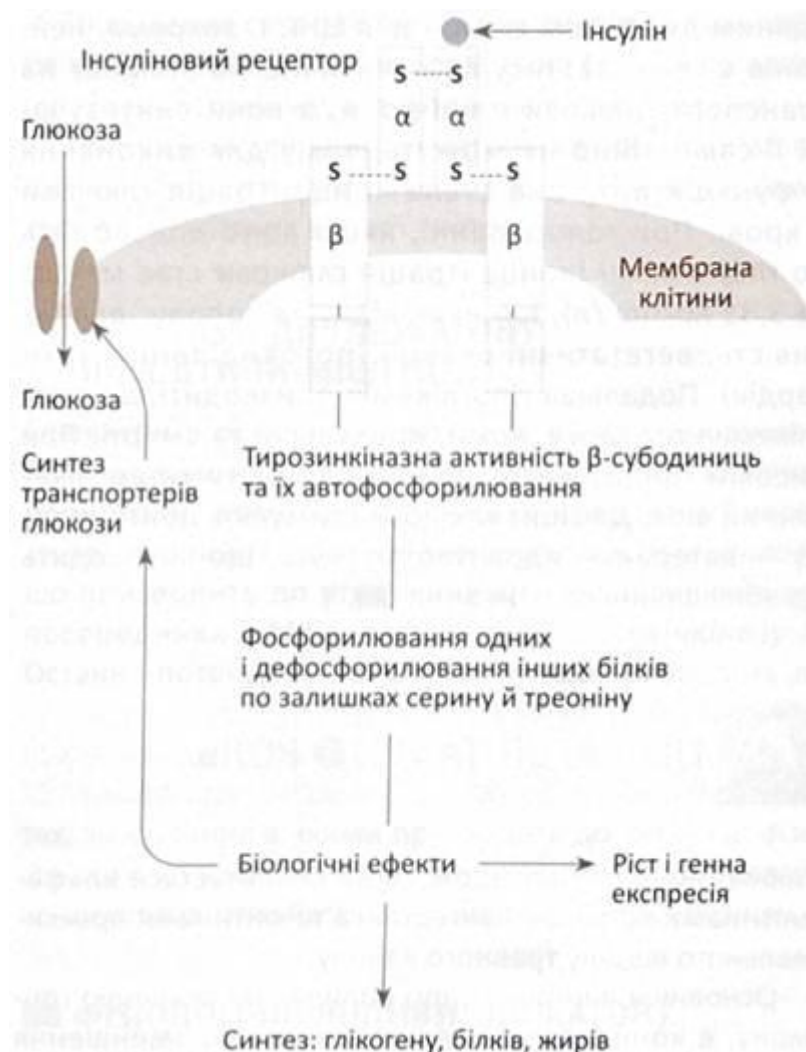


Рис. 1.1. Будова інсулінового рецептора та біологічних ефектів в клітинах-мішенях

Крім того, інсулін зменшує концентрацію іонів K^+ в крові завдяки стимуляції їх входу в клітини. Механізм цього процесу зв'язаний з активацією інсуліном натрій-калієвої АТФ-ази натрій-калієвих мембранних насосів у клітинах печінки та м'язах. Інсулін володіє антинатрійуретичним впливом, зменшує проникність мембрани для

іонів Na^+ і K^+ , проте більше для іонів Na^+ , наслідком чого є розвиток гіперполяризації м'язових волокон [10].

Сумарна інтегрована дія інсуліну

Швидка фаза дії інсуліну протягом секунд призводить до збільшення транспорту глюкози, амінокислот, іонів калію в клітини-мішені. Проміжна фаза триває хвилини: інсулін стимулює у клітинах-мішенях синтез білків і пригнічує їх катаболізм, активує гліколітичні ферменти та глікогенсинтетази, гальмує глюконеогенез. Пролонгована фаза триває години і пов'язана з процесами транскрипції генів, трансляції мРНК, синтезом білків, ростом клітин під впливом інсуліну [10].

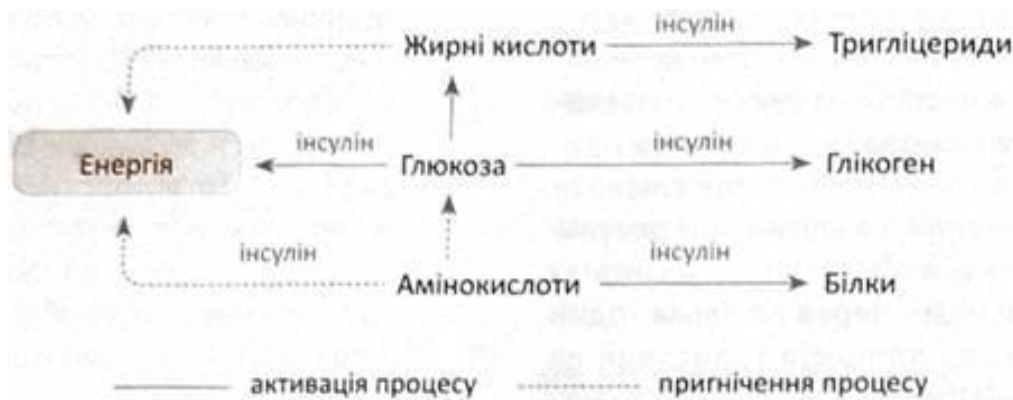


Рис. 1.2. Роль інсуліну в регуляції синтезу й використання енергетичних субстратів

При нестачі інсуліну в організмі відбувається різке збільшення кількості глюкози в крові, що призводить до виділення глюкози разом з сечею. Також порушується синтез білків і жирів. При дуже великих кількостях гормону концентрація глюкози в крові падає, що також порушує синтез компонентів клітин. І в першому, і в другому випадках дуже сильні відхилення можуть призвести до смерті [9].

Є багато способів отримання гормону для медичних цілей. Його отримують з підшлункової залози тварин (свині, велика рогата худоба та ін.), синтезують повністю хімічним способом, або трансформують інсулін тварин в людиноподібний інсулін, а також здійснено отримання інсуліну людини із застосуванням методів генетичної інженерії – за допомогою мікроорганізмів, в які вбудовують ген, що відповідає за синтез людиноподібного інсуліну та використовують дріжджі [3].

Захворювання, що супроводжує нестачу або відсутність інсуліну в організмі людини – цукровий діабет. В більшості випадків єдиним засобом для підтримання життя і працездатності хворих на цукровий діабет є постійний комплексний прийом антидіабетичних препаратів, діючою речовиною яких виступає штучний людиноподібний гормон інсулін [9].

Згідно АТС класифікації препарати інсуліну відносять до засобів, що впливають на травну систему та метаболізм (А), а саме антидіабетичних препаратів (А10). Інсулін та його аналоги відносять до групи А. Таким чином повна АТС приналежність інсулінових препаратів – **A10A**. Препарати короткої дії відносять до групи B01. До них відноситься і субстанція інсуліну. Фармакологічна група субстанції інсуліну людського за АТС – **A10AB01** [11].

Препарати інсуліну для лікування цукрового діабету можуть бути короткої дії, середньо-тривалої та пролонгованої. Препаратами інсуліну короткої дії, які містять людиноподібний інсулін, є: «Актрапід», «Фармасулін» та «Хумулін». Препаратом середньо-тривалої дії є «Протафан», а пролонгованої дії - «Лантус». Препарат «Хумодар», який виготовляє завод Індар, містить людиноподібний інсулін та може бути швидкої, середньо-тривалої та пролонгованої дії. На даний час найбільше використовуються препарати короткої дії, ефект настає вже через 30 хвилин і досягає максимального рівня через 1-2 години після підшкірного введення препарату. Залежно від дозування ефект триває протягом 5-7 годин [12, 13].

Цукрознижувальний ефект препаратів інсуліну полягає у сприянні поглинанню глюкози тканинами після зв'язування інсуліну з рецепторами м'язових і жирових клітин, а також в одночасному пригніченні виділення глюкози з печінки [13].

В даному проекті йдеться про розробку субстанції інсуліну, що є основою для виробництва ін'єкційних препаратів. Відповідно до реєстраційного посвідчення ЛСР-002806/10 від 02.04.2010 торгова назва субстанції «Insulin human recombinant» або ж «Інсулін людський рекомбінантний» [14].

Фармакодинаміка. Утворює інсулінрецепторний комплекс, взаємодіючи зі специфічним рецептором зовнішньої мембрани клітин. Підвищуючи синтез цАМФ (в жирових клітинах і клітинах печінки) або безпосередньо проникаючи в клітину

(м'язи), інсулінрецепторний комплекс стимулює внутрішньоклітинні процеси, в тому числі синтез ряду ключових ферментів (гексокінази, піруваткіназа, глікогенсинтетази та ін.). Зниження концентрації глюкози в крові обумовлено підвищенням її внутрішньоклітинного транспорту, посиленням поглинання та засвоєння тканинами, стимуляцією ліпогенезу, глікогеногенезу, синтезу білка, зниження швидкості продукції глюкози печінкою, зниження розпаду глікогену. Після ін'єкції дія настає протягом 20-30 хв, досягає максимуму через 1-3 год і триває, в залежності від дози, 5-8 год [14].

Фармакокінетика. Повнота всмоктування залежить від способу введення (п/к, в/м), місця введення (живіт, стегно, сідниці), дози, концентрації інсуліну в препараті. Розподіляється в тканинах нерівномірно. Не проникає через плацентарний бар'єр і в грудне молоко. Руйнується інсуліназою, в основному в печінці та нирках. $T_{1/2}$ - від декількох до 10 хв. Виводиться нирками (30-80%) [14].

1.2. Будова молекули інсуліну

Інсулін є невеликим білком, молекулярна маса складає лише 5,8 кДа.

Молекула інсуліну утворена двома поліпептидними ланцюгами, що містять 51 амінокислотний залишок: А-ланцюг складається з 21 амінокислотного залишку, В-ланцюг утворений 30 амінокислотними залишками. Поліпептидні ланцюги з'єднуються двома дисульфідними містками через залишки цистеїну (*рис. 1.3*) [8].

Первинна структура інсуліну в різних видів організмів трохи розрізняється, що залежить від обміну вуглеводів [8].

Деякі зміни в структурі не впливають на біологічну активність гормону, але є певні ділянки, які мають бути стійкого визначеного складу:

- Положення трьох дисульфідних містків;
- Гідрофобні залишки (Phe) в С-кінцевій частині В-ланцюга;
- С- та N-кінцеві частині А-ланцюга [8].

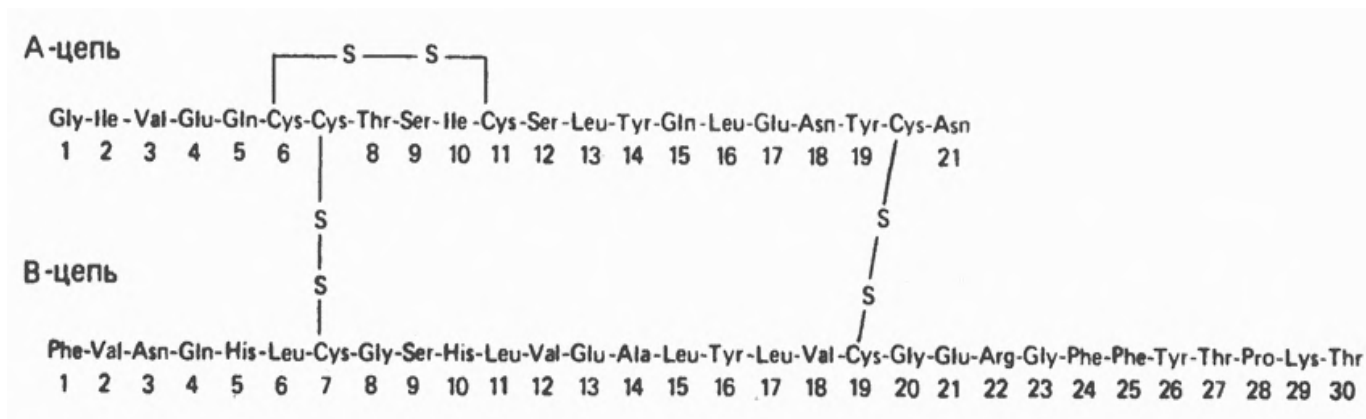


Рис. 1.3. Ковалентна структура інсуліну людини

Через таку особливість, як препарат можна використовувати лише деякі форми інсуліну і важко переводити хворих з одного інсуліну на інший [8].

Найближчий за амінокислотним складом до людського інсулін великої рогатої худоби. Відмінності спостерігають у 8, 9 та 10 положеннях ланцюга А та 30 положенні ланцюга В. Порівняльна характеристика наведена в таблиці [9]:

Таблиця 1.1

Відмінності в будові ланцюгів молекул інсуліну деяких видів ссавців

Вид	Положення амінокислотних залишків			
	А-ланцюг			В-ланцюг
	8	9	10	30
<i>Людина</i>	<i>Треонін</i>	<i>Серин</i>	<i>Ізолейцин</i>	<i>Треонін</i>
Свиня	Треонін	Серин	Ізолейцин	Аланін
Корова	Аланін	Серин	Валін	Аланін
Вівця	Аланін	Гліцин	Валін	Аланін
Кінь	Треонін	Гліцин	Ізолейцин	Аланін

Інсулін людини містить наступні амінокислоти: гліцин, ізолейцин, валін, глутамін, глутамінову кислоту, цистеїн, треонін, серин, пролін, лізин, лейцин, тирозин, фенілаланін, аспарагін, гістидин, аргінін та аланін. Не містить – гідроксипролін, триптофан, метіонін та гідроксилізин [8].

Просторовий вигляд білку, представлений на *рис. 1.4*, має значення для перетворення проінсуліну на інсулін під час виділення.

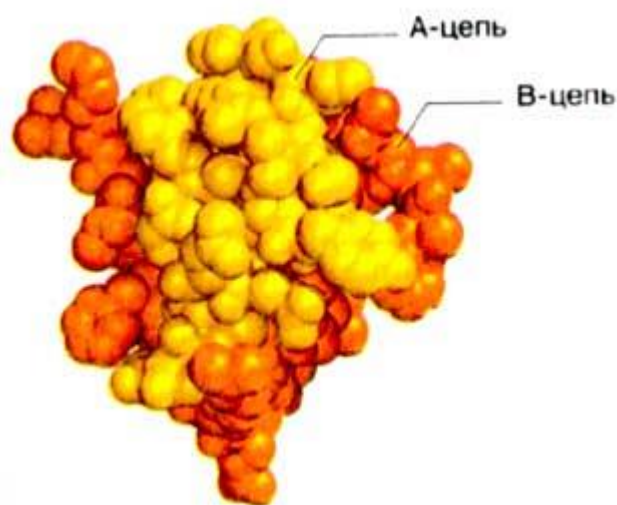


Рис. 1.4. Просторова модель інсуліну людини

1.3. Фізико-хімічні властивості інсуліну

Інсулін має всі властивості білків, тому дає характерні для білків кольорові реакції – біуретову, нінгідринову, ксантопротеїнову та ін. [9].

Активність інсуліну визначають біологічними методами за зниженням вмісту цукру в крові у кроликів. За одиницю активності приймають активність 0,04082 мг міжнародного стандартного препарату інсулін [9].

У водних розчинах інсулін утворює кристалічні сполуки. З'єднується з іонами двовалентних металів, особливо з Zn^{2+} . Аморфні препарати інсуліну, звільненого від Zn^{2+} , зберігають свою біологічну активність [9].

Гормон володіє кислими властивостями, має ізоелектричну точку в $pH = 5,35$, стійкий до кислих середовищ. Інсулін є погано розчинним у воді, але добре розчиняється в лугах, розбавлених кислотах та у водно-спиртових розчинах. Є стійким до дії різних органічних розчинників, в тому числі до денатуруючої дії [12].

Описана вище будова інсуліну є активною формою гормону. При розриві дисульфідних зв'язків, інсулін інактивується. Таку дію спричиняють відновлювачі та окислювачі. Крім того, інсулін може вступати в реакцію з основними білками, що є важливим для збереження активності гормону. Сполуки інсуліну з білками мають

більш тривалу дію. При підвищенні температури вище кімнатної інактивація білку прискорюється, що є небажаним, тому зберігають препарати або субстанцію при температурі 2-8°C [8, 9].

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

На сьогодні стало дуже розповсюдженим відтворення білків людини за допомогою генетично модифікованих культур клітин різних організмів: бактерій, дріжджів, рослин, тварин [3].

Вибір біологічного агента – продуцента проінсуліну має важливе значення. Необхідно враховувати переваги та недоліки використання різних біологічних агентів [3].

Так, перевагами використання *E. coli* є:

- Високі рівні експресії;
- Низька вартість;
- Швидкий ріст;
- Простота умов культивування;
- Відсутність ендотоксинів;
- Можливість зміни параметрів культивування [3].

Переваги використання дріжджів *P. pastoris*:

- Високі рівні експресії;
- Відсутність ендотоксинів;
- Можливість вибору між внутрішньоклітинною експресією та секрецією;
- Економічна доступність;
- Відносно швидкий ріст;
- Простий спосіб очистки білка та ін. [3].

Крім переваг ці біологічні агенти мають і недоліки, але використання

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Ткачова В. І.			РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Лім.	Арк.
Перевір.		Скороцька О. І.					159
Реценз.						Кафедра БТМ	
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т. П.					
							11

рослинних та тваринних клітин все одно не є вигідним на їх фоні. Раніше інсулін тварин, особливо свиней, використовувався як основа препаратів. Але з розвитком генетичної інженерії його згодом перестали використовувати [3].

Основними недоліками використання рослинних та тваринних клітин для виробництва інсуліну є:

- Дороге поживне середовище;
- Висока собівартість продукту;
- Важкі способи очищення продукту;
- Складні умови культивування;
- Складність контролю;
- Порівняно невисокі рівні біосинтезу продукту [3].

Тож нині найбільш використовуваними продуцентами для отримання людиноподібного інсуліну є *E. coli* та *P. pastoris*. Для остаточного рішення щодо біологічного агента порівнюємо різних продуцентів проінсуліну з метою вибору найкращого (табл. 2.1):

Таблиця 2.1

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Вихід цільового продукту, г/л	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Escherichia coli</i> 20 IBA 1	Глюкоза – 109,42; Глутамінова кислота – 1,0; Манітол - 10,0; K ₂ HPO ₄ - 1,0; MgSO ₄ • 7H ₂ O - 0,2; CaCl ₂ - 0,04; Пролін – 149,9; Мікроелементи: FeCl ₃ • 6H ₂ O - 0,0025; H ₃ BO ₃ - 0,00001; ZnSO ₄ • 7H ₂ O - 0,00001; CoCl ₂ • 6H ₂ O - 0,00001; CuSO ₄ • 5H ₂ O - 0,00001; MnCl ₂ - 0,001; Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O - 0,00001; Біотин - 0,00001; Тіамін - 0,0001.	19-21	14,5	37°C, pH 6,9±0,5, перемішування, перші 15-16 год рівень глюкози підтримується 0,7-1,2 г/л, після досягнення OD=25-35 подачу глюкози припиняють до повного вичерпання, далі подача глюкози регулюється pH-stat-ом, рівень до кінця культивування (OD=50-60) 0,3-0,5 г/л.	Marcin Zieliński Agnieszka Romanik-Chruścielewska Diana Mikiewicz Natalia Łukasiewicz Iwona Sokołowska Jarosław Antosik Agnieszka Sobolewska-Ruta Anna Bierczyńska-Krzysik Piotr Zaleski Andrzej Plucienniczak Expression and purification of recombinant human insulin from E. coli 20 strain // Elsevier. – 2019. – Vol. 157. – P. 63-69.
<i>Escherichia coli</i> JM109/pPINS 07	Гідролізат казеїну соляно-кислотного - 20; Глюкоза - 10; Екстракт пекарських дріжджів - 14; K ₂ HPO ₄ - 6; KH ₂ PO ₄ - 3;	34	3	24-37°C, pH 7,0, рівень розчиненого кисню 50%, після досягнення OD=7,5 (через 6 год експоненційного росту), додають 70 см ³ р-ну з 2,6 г	Спосіб получения рекомбинантного инсулина человека / Калинин Ю.Т., Ураков Н.Н., Иванов В.Т., Степанов А.В., и др. – Опубл. 25.05.1999. Грант.

	MgSO ₄ - 0,5; Натрій хлористий - 5; Ампіциліну натрієва сіль - 0,05.			ізопропілтіо-бета-D-галактопіранозида.	
<i>Pichia pastoris</i> GS115his ⁻ /pPIC9K	Гліцерин - 62,5; H ₃ PO ₄ - 26,7 мл/л; CaSO ₄ x 2H ₂ O - 0,93; K ₂ SO ₄ – 18,2; MgSO ₄ • 7H ₂ O – 14,9; KOH – 4,13; PMT1 – 8,16 мл; Біотин (0,2 г/л) – 4,21 мл; Метанол – 3,8.	179	3,08	30°C, рН 5,0, рівень розчиненого кисню 35%, після використання внесеного гліцерину протягом 6 год подають р-н гліцерину (50%) з біотином та PMT1 зі швидкістю 15 мл/л*год. Потім до кінця культивування подають р-н метанолу (99,2%) з біотином та PMT1 зі швидкістю 1,1 мл/л*год перші 6 год, далі 6,6 мл/л*год.	Polez S., Origi D., Zahariev S., Guarnaccia C., Tisminetzky SG., Skoko N., et al. A Simplified and Efficient Process for Insulin Production in <i>Pichia pastoris</i> // PLoS ONE. – 2016. – 11(12): e0167207. doi:10.1371/journal.pone.0167207 – 15 с.

Дані, отримані при порівнянні трьох різних продуцентів інсуліну, засвідчують, що біосинтез проінсуліну для всіх штамів здійснюється напівбезперервним культивуванням. Тривалість культивування *Escherichia coli* 20 IBA 1 складає 21 год, що на 13 год швидше за культивування штаму *Escherichia coli* JM109/pPINS07 та на 158 год швидше від культивування *Pichia pastoris* GS115his⁻/pPIC9K. Крім того, *E. coli* 20 IBA 1 синтезує в 4,8 разів більше інсуліну (14,5 г/л) порівняно з обома іншими продуцентами.

Така характеристика технологічного процесу є недостатньою для вибору продуцента, тому порівнюємо вартість поживних середовищ для всіх біологічних агентів (табл. 2.2):

Таблиця 2.2

Біологічний агент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента, грн/л серед.	Джерело інформації *
<i>Escherichia coli</i> 20 IBA 1	Глюкоза – 109,42;	19,5	2,134	1
	Глутамінова кислота – 1,0;	145	0,145	2
	Манітол - 10,0;	247,5	2,475	2
	K ₂ HPO ₄ - 1,0;	106,4	0,1	3
	MgSO ₄ • 7H ₂ O - 0,2;	9,66	0,00195	2
	CaCl ₂ - 0,04;	12	0,00048	2
	Пролін – 149,9;	179	26,8321	2
	FeCl ₃ • 6H ₂ O - 0,0025;	90	0,000225	2
	H ₃ BO ₃ - 0,00001;	26,5	0,000000265	2
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O - 0,00001;	36,63	0,0000004	2
	CuSO ₄ • 5H ₂ O - 0,00001;	69	0,00000069	2
	MnCl ₂ - 0,001;	118	0,000118	2
	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O - 0,00001;	260	0,0000026	3
	Біотин - 0,00001;	320000	0,0032	2
	Тіамін - 0,0001.	2500	0,00025	2
	Вартість 1 л середовища – 31,69 грн			

<i>Escherichia coli</i> JM109/pPINS 07	Гідролізат казеїну - 20;	1728	34,56	7
	Екст. пекар. дріжджів -14;	1958,66	27,42	6
	K ₂ HPO ₄ - 6;	106,4	0,64	3
	KH ₂ PO ₄ - 3;	42	0,13	5
	MgSO ₄ - 0,5;	7,5	0,00375	2
	Натрій хлористий - 5;	21	0,11	4
	Глюкоза - 10;	19,5	0,195	1
	Ампіц. натрієва сіль -0,05.	57000	2,85	8
	Вартість 1 л середовища - 65,95 грн			
<i>Pichia pastoris</i> GS115his ⁻ /pPIC9K	Гліцерин - 62,68;	46	2,883	2
	H ₃ PO ₄ - 26,7 мл/л;	50	1,335	2
	CaSO ₄ x 2H ₂ O - 0,93;	4	0,00372	2
	K ₂ SO ₄ - 18,2;	26	0,473	2
	MgSO ₄ • 7H ₂ O - 14,9;	9,66	0,14	2
	KOH - 4,13;	42	0,173	2
	Метанол - 3,8;	24	0,091	2
	Біотин 0,2 г/л - 4,21 мл/л;	320000	10,856	2
	PMT1 - 8,16 мл/л;	2,744	0,0224	
	CuSO ₄ • 5H ₂ O - 6;	69	0,414	2
	KI - 0,08;	840	0,067	2
	MnSO ₄ • H ₂ O - 3;	39,5	0,119	2
	H ₃ BO ₃ - 0,02;	26,5	0,00053	2
	CaSO ₄ • 2H ₂ O - 0,5;	4	0,002	2
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O - 35,59;	36,63	1,304	2
	H ₂ SO ₄ - 5 мл/л;	80	0,4	2
	FeSO ₄ • 7H ₂ O - 65;	5,04	0,328	2
	CoCl • 6H ₂ O - 0,5;	52	0,026	3
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O - 0,2.	600	0,12	3
	Вартість 1 л середовища - 15,98 грн			

Примітка. * Ціни наведено станом на квітень 2019 р. 1-www.ceberka.in.ua 2-<https://kiev.prom.ua> 3-<https://russian.alibaba.com> 4-<https://himport.net> 5-<https://www.systopt.com.ua> 6-<https://shop.hlr.ua> 7-<http://agar.com.ua> 8- <https://compendium.com.ua>

Найменше коштує середовище для культивування *Pichia pastoris* GS115his⁻/pPIC9K – 15,98 грн/л, що в 4,1 разів менше від вартості середовища для культивування *Escherichia coli* JM109/pPINS07 та в 2 рази дешевше від вартості середовища для культивування *Escherichia coli* 20 IBA 1. Це зумовлено тим, що при культивуванні *E. coli* 20 IBA 1 використовується дуже велика кількість проліну, що й становить основну вартість середовища. Для остаточного вибору біологічного агента розраховуємо умовну вартість цільового продукту та продуктивність культивування (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Узагальнення вибору біологічного агента та поживного середовища для культивування

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Вихід цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного проінсуліну за годину, г/год*л
<i>E. coli</i> 20 IBA 1	31,69	14,5	2,19	19-21	0,69-0,76
<i>E. coli</i> JM109/pPINS 07	65,95	3	21,98	34	0,09
<i>P. pastoris</i> GS115his ⁻ /pPIC9K	15,98	3,08	5,19	179	0,017

Обґрунтувавши переваги та недоліки використання різних продуцентів, обираємо продуцент інсуліну – *Escherichia coli* 20 IBA 1. Вихід цільового продукту в цього штаму 14,5 г/л, що в 4,8 разів більше в порівнянні з іншими біологічними агентами. Також, умовна вартість цільового продукту складає 2,19 грн/г, що на 3 грн/г менше ніж в *P. pastoris* GS115his⁻/pPIC9K, але на 20 грн/г менше ніж в *E. coli*

JM109/pPINS07. З боку вартості середовища має перевагу *Pichia pastoris* GS115his⁻/pPIC9K, в якого поживне середовище коштує найменше – 15,98 грн/л. Проте тривалість культивування складає майже 180 годин, в той час, як для *E. coli* 20 IBA 1 це 20 годин (в 9 разів менше), тому й ефективність культивування сильно відрізняється. Кількість утворюваного інсуліну при використанні *E. coli* 20 IBA 1 складає 0,68-0,76 г/год*л, що в 45 разів більше за кількість утворюваного інсуліну дріжджами *Pichia pastoris* GS115his⁻/pPIC9K. Через все це вважаємо доцільним обрати *E. coli* 20 IBA 1 як найбільш вигідного біологічного агента.

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

У промислових масштабах важливим показником є концентрація виходу цільового продукту. Тому поживне середовище необхідно підбирати таким чином, щоб компоненти разом давали змогу підвищити продуктивність. Вміст компонентів поживного середовища має бути достатнім для синтезу певної кількості біомаси та цільового продукту. Вміст джерел вуглецю та азоту зазвичай різний під час отримання посівного матеріалу та під час біосинтезу. Для перевірки відповідності середовища поставленому виходу цільового продукту, проводимо розрахунок джерел вуглецю та азоту, оскільки вони визначають рівень біомаси та концентрацію продукту біосинтезу [15].

Тривалість культивування 19-21 год ~ 20 год, концентрація біомаси – 56 г/л, концентрація інсуліну у вигляді тілець включення – 14,5 г/л [4].

Розрахунок вмісту джерела вуглецю:

1. Потреби для синтезу інсуліну.

Як джерело вуглецю використовуються глюкоза, пролін та манітол. У 180 г глюкозі міститься 72 г вуглецю (40%).

Молекулярна маса інсуліну 5 800. Вміст вуглецю в інсуліні $245 \cdot 12 = 2\,940$ г. В 100 г інсуліну буде міститись 50,69 г вуглецю. Така кількість вуглецю буде міститись в $(50,69 \cdot 100) / 40 = 126,73$ г глюкози. Враховуючи, що 40% глюкози піде для

одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму, необхідна кількість глюкози буде $(126,73 \cdot 0,4) + 126,73 = 177,5$ г/л.

2. Потреби для синтезу біомаси.

Оскільки інсулін міститься у вигляді тілець включення, то кількість саме біомаси становить $56 - 14,5 = 41,5$ г. У біомасі міститься 50% вуглецю, отже, 20,75 г становить вуглець. Така кількість вуглецю міститься в $(20,75 \cdot 180) / 72 = 51,9$ г глюкози. Враховуючи 40% витрат на холосте окиснення необхідно внести в середовище $(0,4 \cdot 51,9) + 51,9 = 72,65$ г/л глюкози.

Отже, загальна кількість глюкози, яку необхідно внести в середовище, становить $72,65 + 177,5 = 250,15$ г/л $\sim 25\%$.

Необхідно також враховувати, що в середовищі є манітол, пролін та глутамінова кислота, які також є джерелами вуглецю. В 147 г глутамінової кислоти міститься 60 г вуглецю, в 115 г проліну – 60 г вуглецю, в 182 г манітолу – 72 г. В 1 г глутамінової кислоти буде 0,4 г вуглецю (0,16 г – на енергію), в 10 г манітолу – 4 г (1,6 г – на енергію), в 149,9 г проліну – 78,2 г (40,664 г – на енергію). Загалом в середовище має бути внесено $50,69 + 20,75 = 71,44$ г/л вуглецю. Враховуючи всі джерела вуглецю, на глюкозу припадає $71,44 - 0,24 - 2,4 - 37,536 = 31,264$ г/л. Тоді необхідна кількість глюкози буде $(78,16 \cdot 0,4) + 78,16 = 109,42$ г/л $\sim 11\%$. Внесення такої концентрації глюкози має бути дробним, тобто підживленням. Розрахунок складу підживлюючого розчину наведено нижче.

Розрахунок вмісту джерела азоту:

1. Потреби для синтезу біомаси.

В біомасі знаходиться 10% азоту, тобто це 4,15 г з 41,5 г біомаси. Основним джерелом азоту є пролін. В 115 г проліну міститься 14 г азоту, тоді 4,15 г азоту буде міститись в $(115 \cdot 4,15) / 14 = 34$ г проліну.

2. Потреби для синтезу інсуліну.

В 5 800 г інсуліну міститься $59 \cdot 14 = 826$ г азоту. А в 100 г інсуліну буде 14,2 г азоту. Така кількість азоту буде міститись в $(115 \cdot 14,2) / 14 = 116,65$ г проліну.

Загальна кількість проліну, що має бути внесена в середовище – $116,65 + 34 = 150,65$ г/л $\sim 15\%$.

Необхідно враховувати, що глютамінова кислота також є джерелом азоту, в 1 г міститься 0,1 г азоту. Має бути внесено $4,15 + 14,2 = 18,35$ г/л азоту в середовище. З урахуванням глютамінової кислоти буде 18,25 г/л. Тоді проліну необхідно внести 149,9 г/л $\sim 15\%$. Така кількість проліну вноситься дробно, розрахунок підживлюючого розчину наведено нижче.

В середовищі присутні також всі мікроелементи, які необхідні клітині в дуже малих кількостях. Джерелами елементів є як органічні, так і неорганічні сполуки.

Розрахунок підживлюючого розчину:

У вигляді підживлюючого розчину необхідно внести в середовище 109,42 г/л глюкози та 149,9 г/л проліну. Культивування триває 20 год. При цьому пролін додається по 12 г/л в одній порції протягом перших 15 год культивування, тобто підживлення відбувається 12 порціями, через кожні 1 год 15 хв. Для ефективного процесу накопичення біомаси та, відповідно, цільового продукту, глюкозу підтримують на рівні 8 г/л. Така кількість глюкози додається на початку культивування. Наступне додавання глюкози протягом перших 15 годин культивування здійснюється експоненційно для підтримання рівня глюкози. Далі на одну годину подачу глюкози припиняють, потім додають для підтримання на рівні 3 г/л протягом останніх 4 год. Розрахунок кожної порції підживлення наведено в *підпункті 6.6 розділу 6*.

Результати розрахунків наводимо в таблиці:

Таблиця 2.4

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л			
	Сумарний	Початковий	В підживлю- вальному розчині	В одній порції підживлення
Глюкоза	109,42	8	101,42	експоненційно (підтримання на рівні

				8 г/л); підтримання на рівні 3 г/л
Глутамінова кислота	1,0	1,0	-	-
Манітол	10,0	10,0	-	-
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0	-	-
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2	0,2	-	-
CaCl ₂	0,04	0,04	-	-
Пролін	149,9	-	149,9	12
FeCl ₃ • 6H ₂ O	0,0025	0,0025	-	-
H ₃ BO	0,00001	0,00001	-	-
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,00001	0,00001	-	-
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,00001	0,00001	-	-
MnCl ₂	0,001	0,001	-	-
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,00001	0,00001	-	-
Біотин	0,00001	0,00001	-	-
Тіамін	0,0001	0,0001	-	-

РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА *Escherichia coli* 20 ІВА 1

3.1. Морфолого-культуральні ознаки *Escherichia coli* 20 ІВА 1

Штам *Escherichia coli* 20 ІВА 1 є похідним штамом від лабораторного штаму *Escherichia coli* CSH50R [4].

Морфологічно *Escherichia coli* 20 ІВА 1 володіє всіма властивостями, притаманними виду *E. coli*. Мікроорганізми мають вигляд прямої палички із закругленими кінцями 1,1-1,5 x 2,0-6,0 мкм, розташовуються палички поодинокі або парами (рис. 3.1). *E. coli* 20 ІВА 1 можуть бути рухомі і не рухомі, рухаються за допомогою перетрихціальних джгутиків. Ендоспор не утворюють. За Грамом забарвлюються в червоний колір, тобто є грамнегативними [4, 5].

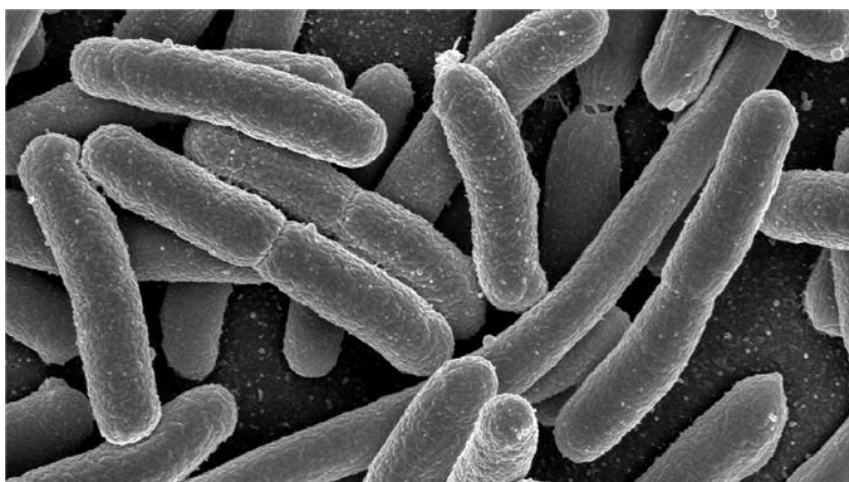


Рис. 3.1 Вигляд клітин *Escherichia coli* 20 ІВА 1

Одним з важливих моментів щодо використання *E. coli* є те, що цей мікроорганізм може рости на різних поживних середовищах, що дає змогу вибрати найоптимальніший варіант культивування відносно вартості та виходу продукту. На рідкому середовищі LB росте у вигляді однорідної суспензії. Росте також на мінімальному середовищі з додаванням тіаміну в кількості 2 мг/л та L-проліну в кількості 50-200 мг/л. На щільному середовищі TSA утворює круглі плоскі колонії з

					НАЗ НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ						
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Ткачова В. І.			РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА Escherichia coli 20 ІВА 1			Лім.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Скροцька О. І.								30	6
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Пирог Т. П.									

гладенькими краями [4].

На поживному агарі з ампіциліном до 16 - 18-ї години культивування утворює слабовипуклі колонії 1,5-2,0 мм в діаметрі, гладенькі, з блискучою поверхнею, з рівним краєм, сіруватого кольору (рис. 3.2) [5].



Рис. 3.2. Вигляд колоній *Escherichia coli* 20 IBA 1

3.2. Фізіолого-біохімічні ознаки *Escherichia coli* 20 IBA 1

Escherichia coli 20 IBA 1 є факультативними анаеробами. В анаеробних умовах *E. coli* 20 IBA 1 утворюють лактат, сукцинат, етанол, ацетат і вуглекислий газ як продукти своєї життєдіяльності [4, 5].

Оптимальна температура для культивування *Escherichia coli* 20 IBA 1 складає 37°C, pH – 7,0. *Escherichia coli* 20 IBA 1 ростуть на середовищах з нейтральним pH 5,8-7,8. За оптимального pH клітини ростуть в межах від 4 до 45°C [4].

З сахарів *E. coli* 20 IBA 1 зброджують до кислоти глюкозу, мальтозу, маніт та манозу. Також до кислоти можуть зброджувати гліцерин. *E. coli* 20 IBA 1 не розріджують желатин, не утворюють індол та не виявляють уреазної активності. Відновлюють нітрати до нітритів [5].

Біологічний агент має вбудований ген синтезу проінсуліну pIBAINS, делецію в опероні «пролін-лактоза». Має мутацію в гені *grsL*, що кодує рибосомальний білок S12, пов'язану зі стійкістю до стрептоміцину. Це дозволяє їм рости за кінцевої

концентрації стрептоміцину в середовищі 50 г/л. Крім того, має мутацію в гені *cytR*, який кодує регулятор транскрипції, котрий відповідає за зв'язування з ДНК [4].

3.3. Таксономічний статус *Escherichia coli* 20 IBA 1

Таксономічний статус біологічного агента наведено згідно двох видань Бергі, які істотно відрізняються між собою за принципом розділення:

Таблиця 3.1

Видання	Перше видання Бергі	Друге видання Бергі
Реалізовано систематику	Фенотипову	Філогенетичну
Ознаки, за якими аналізували	Морфологічні	Аналіз нуклеотидної послідовності 16S рРНК
Вищий таксон	Царство	Домен (У другому видавництві Бергі було запропоновано виділити три домени, положення яких є вищим щодо царства, для того, щоб підкреслити поділ світу на три частини.)
Поділ згідно до аналізованих ознак	4 відділи, 35 груп	11 груп
Домен	-	<i>Bacteria</i>
Царство	<i>Procaryotae</i>	-
Відділ	<i>Gracilicutes</i> – прокаріоти зі складною будовою клітинної стінки – грамнегативні бактерії	Відділ С – <i>Proteobacteria</i>
Клас	<i>Scotobacteria</i> , який об'єднує чотирнадцять груп	

Група	П'ята група «Факультативно анаеробні грамнегативні палички»	одинадцята група – грамнегативні бактерії, підгрупа «альфа»
Родина	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Рід	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>
Вид	<i>coli</i>	<i>coli</i>
Штам	20 IBA 1	20 IBA 1

3.4. Особливості метаболізму *Escherichia coli* 20 IBA 1

Метаболізм *Escherichia coli* 20 IBA 1 не має якихось певних особливостей порівняно з іншими штамми, що й пояснює таку універсальність використання кишкової палички.

Основними субстратами, які споживають *E. coli* 20 IBA 1 є вуглеводи (глюкоза, фруктоза, лактоза) та всі амінокислоти (дріжжовий екстракт, окремі амінокислоти). Тому для культивування *Escherichia coli* 20 IBA 1 можна використовувати прості мінеральні середовища [5, 7, 15].

Катаболізм вуглеводів *E. coli* 20 IBA 1 здійснюється за гліколітичним шляхом. Катаболізм глюконату здійснюється через КДФГ-шлях [15].

Особливості бродіння *E. coli* 20 IBA 1:

1. Розщеплення пірувату на ацетил-КоА та форміат;
2. Розкладання форміату на CO₂ та H₂O;
3. Утворення сукцинату як продукту фумаратного дихання;
4. Відновлення ацетил-КоА до етанолу;
5. Відсутність здатності утворювати з пірувату ацетоїн та бутандіол [15].

3.5. Характеристика етапів конструювання біологічного агента *Escherichia coli* 20 IBA 1

Вид *E. coli* є універсальним з точки зору умов зберігання та культивування, а час розмноження (20 хв) дуже коротким. Такі властивості мікроорганізмів призвели до того, що на даний час саме *E. coli* є найбільш вивченим біологічним агентом і його найчастіше використовують для створення рекомбінантних штамів.

Виробництво інсуліну засновано на використанні рекомбінантних штамів, оскільки в природі бактерії не продукують цього білку. Одним з перших рекомбінантних штамів був *E. coli* JM109/pPINS07, що продукував проінсулін внутрішньоклітинно у вигляді тілець включення. У 1999 році змогли досягти на той час великої продуктивності – 3 г/л. Проте, на даний час виробництво інсуліну в такій кількості не є достатнім через постійне збільшення кількості хворих на цукровий діабет. Тому **метою** створення нового штаму стало підвищення виходу кількості тілець включення (а для цього – біомаси) за той самий час культивування для масштабування виробництва та забезпечення хворих достатньою кількістю препарату.

Вихідним штамом для створення рекомбінантного мікроорганізму, що синтезує проінсулін, є *Escherichia coli* 20, вихідною плазмідною є pBR322 [4].

Етапи конструювання штаму *Escherichia coli* 20 IBA 1:

1. Плазмиду pIBAINS отримували з pBR322 [ATCC: 31344] лігуванням двох фрагментів *HindIII* / *SmaI* та ампліфікуванням їх за допомогою ПЛР на вихідну плазмиду.
2. Методом ПЛР 63 нуклеотиди з короткими молекулярними сайтами клонування та синтетичним термінатором транскрипції *trpA* вставляли в плазмиду.
3. Зі штаму *E. coli* K12 ампліфікували промотор *deoP1P2* на основі нуклеотидної послідовності з бази даних генів [GenBank: AP009048].
4. Рестрикційними ферментами *EcoRI* / *NdeI* розщепляли отриману плазмиду та лігували, попередньо розщеплений тими ж ферментами, фрагмент, що містив промотор *deoP1P2*, за часовою стрілкою.

5. Отриману плазмиду додатково обробляли NdeI / XbaI та лігували вставкою гібридного білка SOD_INS. Після цього кодони гена гібридного білка оптимізовували для експресії в *E. coli* 20.
6. Методом теплового шоку з CaCl₂ проводили експресію сконструйованої плазмиди pIBAINS в *E. coli* 20 [4].

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

4.1. Потреба у цільовому продукті

Одним з найбільш розповсюджених захворювань в Україні є цукровий діабет. Це хронічне захворювання, яке потребує постійного прийому препаратів інсуліну в середньому по 3 рази на день. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) загальний щорічний приріст хворих на цукровий діабет становить приблизно 15%. Лише за період з 1990 по 2014 роки загальна кількість хворих на цукровий діабет збільшилася втричі і за прогнозами експертів у 2030 році досягне 552 млн. осіб [1].

В Україні щороку реєструється зростання кількості хворих на цукровий діабет в середньому на 9,8 — 11%. За даними Центру статистики Міністерства охорони здоров'я України в країні зареєстровано 204 526 хворих на цукровий діабет 1 типу, які постійно приймають препарати інсуліну. З них 195 872 осіб дорослого населення та 8 654 дітей. Всі хворі потребують введення екзогенного інсуліну [1, лист МОЗ України, додаток 1].

Відомі наступні способи його отримання:

1. екстрагування з підшлункової залози великої рогатої худоби або свиней;
2. хімічний синтез;
3. біотехнологічне отримання з використанням рекомбінантних штамів мікроорганізмів.

Нині препарати інсуліну отримують біотехнологічним способом. Препарати, зареєстровані в Україні представлені у *табл. 4.1 та 4.2*:

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ		
Розроб.		Ткачова В. І.					
Перевір.		Скороцька О. І.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т. П.					
					Лім.	Арк.	Акрушіє
						36	5
					Кафедра БТМ		

Таблиця 4.1

Українські виробники інсуліну

Препарат	Виробник	Форма випуску	Ціна, грн*
Фармасулін Н	Фармак	5 картриджів по 3 мл	650
Хумодар Р100Р	Індар	5 картриджів по 3 мл	602

Примітка: дозування 100 МО/мл, ціна станом на жовтень 2019 року згідно www.tabletki.ua

Таблиця 4.2

Іноземні виробники інсуліну

Препарат	Виробник	Країна	Форма випуску	Ціна, грн*
Актрапід НМ	Novo Nordisk	Данія	1 флакон 10 мл	350
Актрапід НМ Пенфіл			5 картриджів по 3 мл	679
Генсулін Р	Біотон	Польща	5 картриджів по 3 мл	580

Примітка: дозування 100 МО/мл, ціна станом на жовтень 2019 року згідно www.tabletki.ua

Річна потреба в препаратах інсуліну для хворих на цукровий діабет 1 типу в Україні:

Таблиця 4.3

Категорії хворих	Кількість інсуліну на добу на 1 людину, мг *	Загальна кількість інсуліну (в г/рік) на 1 людину *	Кількість хворих в Україні на 2019 рік **	Загальна кількість інсуліну для всіх хворих на рік, г
Дорослі та вагітні	1,735	0,633	195 872	123 987
Діти (до 18 років)	1,388	0,507	8 654	4 387,5
Разом:				128 374,5

Примітка. *Доза препарату на добу для дорослої людини 50 МО, для дитини – 40 МО [1].

Дозування 100 МО інсуліну на 1 мл препарату. У перерахунку 1 МО = 34,7 мкг [16].

****Кількість хворих наведена згідно даних Міжнародної діабетичної асоціації України та МОЗ України [лист МОЗ України, додаток 1].**

4.2. Розрахунок потужності виробництва інсуліну

Згідно з даними зареєстрованих в Україні препаратів інсуліну на 2019 рік (*табл. 4.1 та 4.2*), більшість з них є імпортними. З урахуванням того, що немає даних щодо кількості інсуліну, який виробляється та кількості проданого інсуліну, робимо приблизний розрахунок.

Оскільки на ринку представлено багато препаратів, які на даний час забезпечують хворих інсуліном, а збільшення захворюваності складає 10% на рік, приймаємо, що новий препарат буде забезпечувати 10% хворих на цукровий діабет 1 типу.

Тоді, необхідна кількість інсуліну:

$$G_{\text{ін}} = 128\,374,5 \times 0,1 = 12\,837,45 \text{ г.}$$

Враховуючи, що продуцент рекомбінантного інсуліну *Escherichia coli* 20 IBA 1 синтезує 14,5 г/л інсуліну [4], для синтезу 12 837,45 г необхідно:

$$V = 12\,837,45 / 14,5 = 885,34 \text{ л культуральної рідини.}$$

Враховуючи втрати під час виділення та очищення інсуліну, що загалом становлять 40%, необхідно отримати культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 885,34 / 0,6 = 1475,57 \text{ л.}$$

4.3. Розрахунок кількості виробничих циклів та об'єму ферментера

Отже, для забезпечення 10% хворих на цукровий діабет 1 типу впродовж року в Україні, необхідно 1475,57 л культуральної рідини ($V_{\text{кр}}$).

Для розрахунку кількості стадій підготовки посівного матеріалу необхідно поррахувати необхідність в культуральній рідині за один цикл роботи.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 60, в інший час обладнання буде використовуватись для виготовлення інших препаратів.

Тож кількість отриманого продукту за добу ($V_{\text{д}}$) буде:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 1475,57 / 60 = 24,6 \text{ л.}$$

Кількість продукту за цикл:

$$V_{\text{ц}} = (K_1 \times V_{\text{д}} \times T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 \times 24,6 \times 47) / 24 = 53 \text{ л/цикл},$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, це час, необхідний на виділення та очищення продукту – 47 год, оскільки цей процес буде більш тривалим за виробничий біосинтез (20 год) та підготовку ферментера (10 год), K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (прийнято 1,1).

Геометричний об'єм ферментера для отримання 59 л/цикл має становити:

$$V_{\text{р}} = V_{\text{ц}} / K_{\text{зап}} = 53 / 0,6 = 88,33 \text{ л}, \text{ де } K_{\text{зап}} \text{ – коефіцієнт заповнення ферментера,} = 0,6.$$

Найближчий за розміром ферментер становить $V_{\text{ф}} = 100 \text{ л}$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення: $K_{\text{зап}} = V_{\text{ц}} / V_{\text{ф}} = 53 / 100 = 0,53$, це не перевищує заданого значення.

4.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 53 \text{ л}$ культуральної рідини.

При одержанні культуральної рідини потрібно врахувати її втрати в результаті крапливиносу через колектор відпрацьованого повітря, які приймаємо 10%.

Отже, кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 53 / (1 - 0,1) = 58,9 \text{ л}, \text{ де } E_{\text{ф}} \text{ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.}$$

Виробничий біосинтез здійснюємо у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 58,9 \text{ л}$.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$), що становить $V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1}} / K_{\text{зап}} = 58,9 / 0,6 = 98,2 \text{ л}$.

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 100 \text{ л}$, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 58,9 / 100 = 0,59.$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу (доза) для ферментера становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1+X_{\text{ф}}) = 58,9 / (1+0,1) = 53,55$ л, де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу $V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 58,9 - 53,55 = 5,35$ л.

Таку кількість посівного матеріалу можна отримати в інокуляторі.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ розраховуємо можливий геометричний об'єм інокулятора ($V_{\text{ф}}$), що становить $V_{\text{ф}} = V_{\text{роб.1г}} / K_{\text{зап}} = 5,35 / 0,6 = 8,92$ л.

Приймаємо найближчий за об'ємом ферментер $V_{\text{сф}} = 10$ л, та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення.

$K_{\text{зап1}} = V_{\text{роб.1}} / V_{\text{сф}} = 5,35 / 10 = 0,54$.

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах, отже геометричний об'єм ферментера обрано вірно.

Кількість посівного матеріалу для інокулятора становить 10 % від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища в інокуляторі буде становити:

$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} / (1+X_{\text{ф}}) = 5,35 / (1+0,1) = 4,86$ л, де $X_{\text{ф}} = 0,1$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу $V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 5,35 - 4,86 = 0,49$ л, або 490 мл.

Кількість інокуляту для засіву інокулятора $V_{\text{пм1}} = 490$ мл можна одержати культивуванням бактерій у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Тоді кількість колб для отримання посівного матеріалу становитиме $N_{\text{колб}} = V_{\text{пм1}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 490 / (750 \times 0,2) = 3,27 = 4$ колб.

РОЗДІЛ 5. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

5.1. Шлях катаболізму ростового субстрату в *Escherichia coli* 20 ІВА 1

Основними ростовими субстратами при культивуванні *E. coli* 20 ІВА 1 з метою одержання інсуліну є глюкоза та пролін. Наводимо катаболізм глюкози, оскільки пролін додається як джерело азоту. Згідно KEGG, катаболізм глюкози відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), про що свідчить наявність ключового ферменту 6-фосфоглюкокінази 2 (КФ.2.7.1.11). Наводимо схему перетворення глюкози (рис. 5.1) [Цикл трикарбонових кислот в *E. coli*, додаток].

Особливості катаболізму шляхом гліколізу в *E. coli* 20 ІВА 1 полягають у використанні цим мікроорганізмів певних ферментів, що зазначаю далі.

Взаємне перетворення α -D-глюкозо-1-фосфат на α -D-глюкозо-6-фосфат каталізується ферментом фосфоглюкомутазою (КФ.5.4.2.2), α -D-глюкозо-6-фосфату та β -D-фруктозо-6-фосфату за допомогою глюкозо-6-фосфатізомеразою (КФ.5.3.1.9). Перетворення β -D-фруктозо-6-фосфату на β -D-фруктозо-1,6-дифосфат активує 6-фосфоглюкокіназу 2 (КФ.2.7.1.11), а обернене - фруктозо-1,6-бісфосфатаза 2 (КФ.3.1.3.11).

Далі β -D-фруктозо-1,6-дифосфат перетворюється на дві сполуки: гліцеральдегід-3-фосфат та дигідроксиацетонфосфат за допомогою фруктозо-бісфосфат-альдолази 1 класу (КФ.4.1.2.13), після чого дигідроксиацетонфосфат перетворюється на гліцеральдегід-3-фосфат під дією триосефосфат-ізомераз (КФ.5.3.1.1).

Фермент гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ.1.2.1.12) активує перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на 1,3-дифосфогліцерат, який під дією фосфогліцераткінази (КФ.2.7.2.3) перетворюється на 3-фосфогліцерат.

Ферменти фосфогліцеромутаза 3 (КФ.5.4.2.12) та фосфогліцеромутаза 1 (КФ.5.4.2.11) каталізують перетворення 3-фосфогліцерату на 2-фосфогліцерат, який

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ		
Розроб.		Ткачова В. І.					
Перевір.		Скороцька О. І.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т. П.					
					Літ.	Арк.	Акрушів
						438	7
					Кафедра БТМ		

за активації енолазою (КФ.4.2.1.11) перетворюється на фосфоенолпіруват.

Останньою реакцією гліколізу є перетворення фосфоенолпірувату на піруват за активації піруваткіназою (КФ.2.7.1.40). Далі піруват залучається до метаболізму за участі піруватдегідрогенази Е1 (КФ.1.2.4.1) та піруватдегідрогенази Е2 (КФ.2.3.1.12).

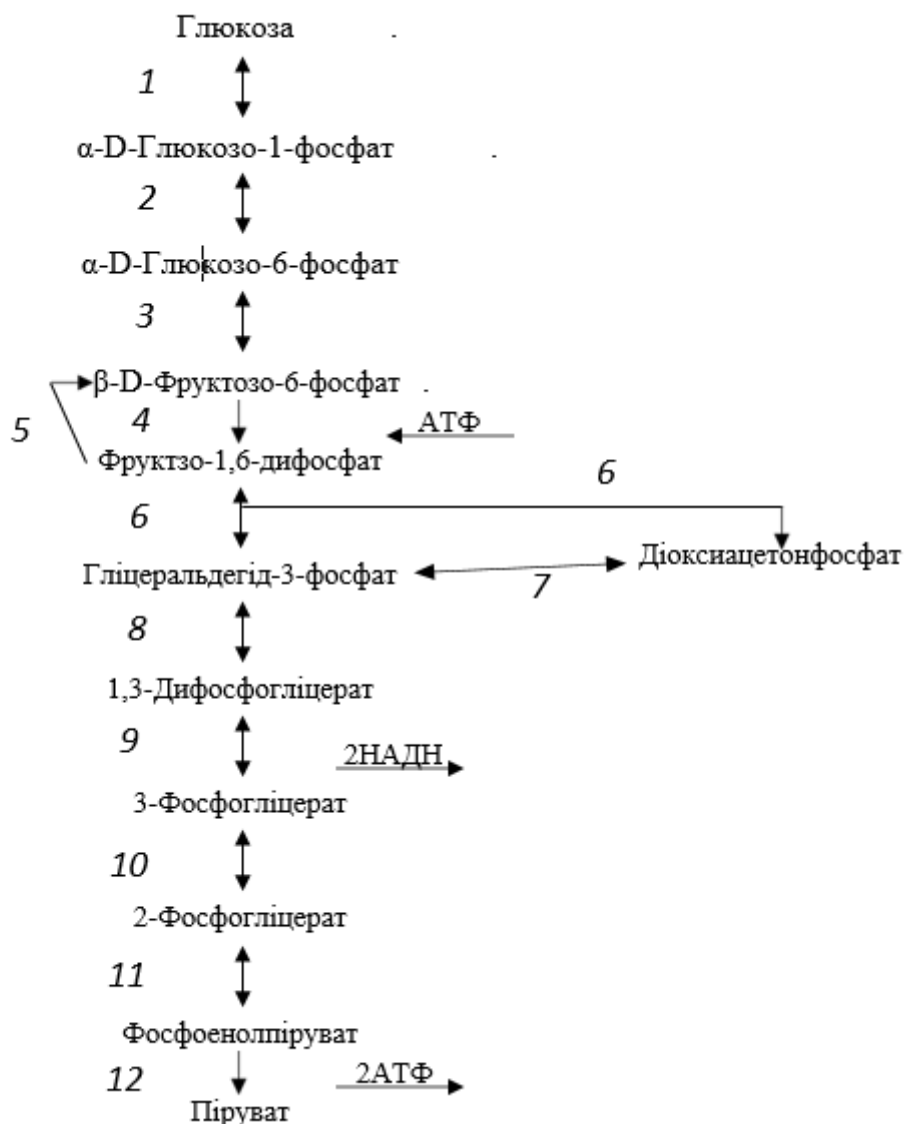


Рис. 5.1. Катаболізм глюкози в *E. coli* 20 IBA 1

Ферменти: 1 – гексокіназа (КФ.2.7.1.1); 2 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 3 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9.); 4 – 6-фосфофруктокіназа 2 (КФ.2.7.1.11); 5 – фруктозо-1,6-біфосфатаза 2 (КФ.3.1.3.11); 6 – фруктозо-бісфосфат-альдолаза 1 класу (КФ.4.1.2.13); 7 – триосефосфат-ізомераза (КФ.5.3.1.1); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 9 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 10 – фосфогліцеромутаза 3 (КФ.5.4.2.12) та фосфогліцератмутаза 1 (КФ.5.4.2.12); 11 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40).

5.2. Біотрансформація ростового субстрату в цільовий продукт

Необхідним є біосинтез людського гормону білкової природи – інсуліну. Оскільки в KEGG немає інформації щодо синтезу такого гормону, використовуємо інформацію про синтез попередників інсуліну. Попередниками інсуліну є деякі амінокислоти, а саме: гліцин, ізолейцин, валін, глютамінова кислота, глютамін, цистеїн, аланін, серин, лейцин, тирозин, аспарагін, фенілаланін, гістидин, аргінін, треонін, пролін, лізин. Після синтезу всіх необхідних амінокислот, вони полімеризуються з утворенням інсуліну [Синтез амінокислот в *E. coli*, додаток 2].

Як зазначалось раніше, вихідним субстратом для біосинтезу інсуліну є глюкоза. В процесі гліколізу вона перетворюється на піруват, що залучається до подальшого метаболізму перетворенням на Ацетил-КоА та входженням в цикл трикарбонових кислот. В усіх цих процесах синтезують сполуки, що є субстратами для синтезу амінокислот – піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат, 5-рибозил-пірофосфат. Піруват є попередником для синтезу аланіну, валіну, лейцину; Оксалоацетат - аспарагіну, лізину, треоніну, ізолейцину; 2-Оксоглутарат - глютаміну, глютамінової кислоти, аргініну, проліну; 3-Фосфогліцерат - серину, гліцину, цистеїну; Фосфоенолпіруват, Еритрозо-4-фосфат - фенілаланіну, тирозину; 5-Фосфорибозил-1-пірофосфат + АТФ – гістидину.

Аланін синтезується з пірувату трансамінуванням з використанням глютаму як донора аміногрупи. Під дією чотирьох ферментів піруват перетворюється на валін, а проміжний продукт синтезу валіну служить попередником в утворенні лейцину. Серин, гліцин і цистеїн синтезуються з 3-Фосфогліцерату. Проміжними продуктами синтезу фенілаланіну та тирозину є Шикілат, Хоризмат, а далі, Префенова кислота.

У циклі трикарбонових кислот синтезуються два попередники амінокислот – Оксалоацетат та 2-Оксоглутарат. З Оксалоацетату утворюється аспартат, який є попередником аспарагіну, треоніну та лізину. Дезамінування треоніну приводить до утворення 2-оксобутирату, який в результаті послідовної дії чотирьох ферментів перетворюється на ізолейцин. Лізин утворюється через діамінопімелінову кислоту.

2-Оксоглутарат під дією аспартат-аміотрансферази (КФ.2.6.1.1) перетворюється на глутамат, що є попередником глутаміну, проліну та аргініну. Глутамін утворюється за допомогою глутамінсинтази (КФ.6.3.1.2) безпосередньо з глутамату.

Пролін утворюється через проміжні сполуки: L-глутаміл-5-фосфат, чий синтез каталізується глутамат 5-кіназою (КФ.2.7.2.11); каталізованою глутамат-5-семіальдегіддегідрогеназою (КФ.1.2.1.41) L-глутамат-5-семіальдегід, який далі перетворюється на L-1-пірролін-5-карбоксилат – за допомогою фермента пірролін-5-карбоксилат редуктази (КФ.1.5.1.2).

Під час синтезу аргініну глутамат спочатку перетворюється на N-ацетил-L-глутамат за допомогою амінокислоти N-ацетилтрансферази (КФ.2.3.1.1), далі під дією ацетилглутамат кінази (КФ.2.7.2.8) синтезується N-ацетил-L-глутамат-5-фосфат. Його перетворення на 2-Ацетамідо-5-оксопентаноат каталізується N-ацетил-гамма-глутаміл-фосфат-редуктазою (КФ.1.2.1.38). Подальшим трансформантом є N-ацетилорнітин, якому допомагає ацетилорнітин трансаміназа (КФ.2.6.1.11), після чого утворюється орнітин (ацетилорнітиндеацетилаза (КФ.3.5.1.16)). Наступним синтезується L-цитрулін за допомогою орнітин карбамоїлтрансферази (КФ.2.1.3.3) та при поєднанні орнітину й карбамоїл фосфату. Він перетворюється на L-аргініносукцинат під дією аргіносукцинатсинтази (КФ.6.3.4.5), а далі каталізацією аргініносукцинат ліазою (КФ.4.3.2.1) сполука перетворюється на аргінін.

Схема біосинтезу цільового продукту – інсуліну – наведена в додатку 3. Нижче в цьому розділі наведено спрощену схему без зазначення ферментів.

Ферменти до схеми біосинтезу цільового продукту (додаток):

1 – гексокіназа (КФ.2.7.1.1); 2 – фосфоглюкомутаза (КФ.5.4.2.2); 3 – глюкозо-6-фосфатізомераза (КФ.5.3.1.9); 4 – 6-фосфофруктокіназа 2 (КФ.2.7.1.11); 5 – фруктозо-1,6-біфосфатаза 2 (КФ.3.1.3.11); 6 – фруктозо-бісфосфат-альдолаза 1 класу (КФ.4.1.2.13); 7 – триосефосфат-ізомераза (КФ.5.3.1.1); 8 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 9 – фосфогліцераткіназа (КФ.2.7.2.3); 10 – фосфогліцеромутаза 3 (КФ.5.4.2.12) та фосфогліцератмутаза 1 (КФ.5.4.2.12); 11 – енолаза (КФ.4.2.1.11); 12 – піруваткіназа (КФ.2.7.1.40); 13 – піруватдегідрогеназа E1 (КФ.1.2.4.1) та піруватдегідрогеназа E2 (КФ.2.3.1.12); 14 – цитрат-синтаза (КФ.2.3.3.1); 15 – аконітат гідратаза (КФ.4.2.1.3); 16 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ.1.1.1.42); 17 – Компонент 2-

оксоглутаратдегідрогенази E2 (КФ.2.3.1.61); 18 - субодиниця бета-сукциніл-КоА-синтетази (КФ.6.2.1.5); 19 - сукцинатдегідрогенази (КФ.1.3.5.4 та КФ.1.3.5.1); 20 - фумарат-гідратаза, клас II (КФ.4.2.1.2); 21 - малатдегідрогеназа (хінон) (КФ.1.1.5.4) або малатдегідрогеназа (КФ.1.1.1.37); 22 - трапнскетолаза 2 (КФ.2.2.1.1); 23 - рибулозо-фосфат 3-епімераза (КФ.5.1.3.1); 24 - рибоза 5-фосфат-ізомераза А (КФ.5.3.1.6); 25 - трансальдолаза (КФ.2.2.1.2); 26 - аспартат-аміотрансфераза (КФ.2.6.1.1); 27 - глутамат 5-кіназа (КФ.2.7.2.11); 28 - глутамат-5-семіальдегіддегідрогеназа (КФ.1.2.1.41); 29 - пірролін-5-карбоксилат редуктаза (КФ.1.5.1.2); 30 - глутамінсинтаза (КФ.6.3.1.2); 31 - амінокислота N-ацетилтрансферази (КФ.2.3.1.1); 32 - ацетилглутамат кіназа (КФ.2.7.2.8); 33 - N-ацетил-гамма-глутаміл-фосфат-редуктаза (КФ.1.2.1.38); 34 - ацетилорнітин трансаміназа (КФ.2.6.1.11); 35 - ацетилорнітиндеацетилаза (КФ.3.5.1.16); 36 - орнітин карбамоїлтрансфераза (КФ.2.1.3.3); 37 - аргіносущинатсинтаза (КФ.6.3.4.5); 38 - аргініносущинат ліаза (КФ.4.3.2.1); 39 - аспартатаміотрансфераза (КФ.2.6.1.1); 40 - біфункціональна аспартокіназа / гомосериндегідрогеназа 1 (КФ.2.7.2.4 / КФ.1.1.1.3); 41 - аспартат-семіальдегіддегідрогеназа (КФ.1.2.1.11); 42 - аспарагін синтаза (КФ.6.3.5.4); 43 - 4-гідрокси-тетрагідродіпіколінат-синтаза (КФ.4.3.3.7); 44 - 4-гідрокси-тетрагідродіпіколінат редуктаза (КФ.1.17.1.8); 45 - 2,3,4,5-тетрагідропірідин-2,6-дикарбоксилат N-сукцинілтрансфераза (КФ.2.3.1.117); 46 - ацетилорнітин трансаміназа (КФ.2.6.1.11); 47 - сукциніл-діамінопімелат десущиназа (КФ.3.5.1.18); 48 - діамінопімелата епімераза (КФ.5.1.1.7); 49 - діамінопімелат декарбоксилаза (КФ.4.1.1.20); 50 - біфункціональна аспартокіназа / гомосериндегідрогеназа 1 (КФ.2.7.2.4 / КФ.1.1.1.3); 51 - гомосеринкіназа (КФ.2.7.1.39); 52 - треонінсинтаза (КФ.4.2.3.1); 53 - дегідратаза треоніну (КФ.4.3.1.19); 54 - велика субодиниця ацетолактатсинтази I/II/III (КФ.2.2.1.6); 55 - редуктоізомераза кетолової кислоти (КФ.1.1.1.86); 56 - дегідратаза дегідроксикислоти (КФ.4.2.1.9); 57 - аміотрансферази амінокислот з розгалуженою ланцюгом (КФ.2.6.1.42); 58 - азарин, синтезуючий аланін (КФ.2.6.1.66 та КФ.2.6.1.2); 59 - велика субодиниця ацетолактатсинтази I/II/III (КФ.2.2.1.6); 60 - редуктоізомераза кетолової кислоти (КФ.1.1.1.86); 61 - дегідратаза дегідроксикислоти (КФ.4.2.1.9); 62 - 2-ізопропілмалатсинтаза (КФ.2.3.3.13); 63 - 3-ізопропілмалат / (R) -2-метилмалат дегідратазної субодиниці (КФ.4.2.1.33 / КФ.4.2.1.35); 64 - 3-ізопропілмалатдегідрогеназа (КФ.1.1.1.85); 65 - аміотрансфераза амінокислот з розгалуженим ланцюгом (КФ.2.6.1.42); 66 - D-3-фосфогліцератдегідрогеназа / 2-оксоглутаратредуктаза (КФ.1.1.1.95 / КФ.1.1.1.399); 67 - фосфосерин-аміотрансфераза (КФ.2.6.1.52); 68 - фосфосеринфосфатаза (КФ.3.1.3.3); 69 - серин O-ацетилтрансфераза (КФ.2.3.1.30); 70 - цистеїнсинтаза (КФ.2.5.1.47); 71 - гліцин гідроксиметилтрансфераза (КФ.2.1.2.1); 72 - 3-дезоксиглікоген-7-фосфогептулонат-синтаза (КФ.2.5.1.54); 73 - 3-дегідрохінатсинтаза (КФ.4.2.3.4); 74 - 3-дегідрохінатдегідратаза I (КФ.4.2.1.10); 75 - шикімат дегідрогеназа (КФ.1.1.1.25); 76 - шикіматна кіназа (КФ.2.7.1.71); 77 - 3-фосфошикімат 1-карбоксивінілтрансфераза (КФ.2.5.1.19); 78 - хоризатсинтаза (КФ.4.2.3.5); 79 - хозимат-мутаза /

дефенотна дегідратаза (КФ.5.4.99.5 / КФ.4.2.1.51); 80 - хозимат-мутаза / префенатная дегідрогеназа (КФ.5.4.99.5 / КФ.1.3.1.12); 81 - трансаміназа ароматичної амінокислоти (КФ.2.6.1.57); 82 - рибоза-фосфат пірофосфокіназа (КФ.2.7.6.1); 83 - АТФ фосфорибозилтрансфераза (КФ.2.4.2.17); 84 - фосфорибозил-АТФ-пірофосфогідролаза / фосфорибозил-АМФ-циклогідролаза (КФ.3.6.1.31 / КФ.3.5.4.19); 85 - фосфорибозилформаміно-5-аминоимидазол карбоксамид-риботид-ізомераза (КФ.5.3.1.16); 86 - імідазолу гліцерин-фосфат - синтази субодиниця (КФ.4.3.2.10); 87 - імідазолгліцерол-фосфат дегідратаза / гістидинол-фосфатаза (КФ.4.2.1.19 / КФ.3.1.3.15); 88 - гістидинол-фосфат-аміотрансфераза (КФ.2.6.1.9); 89 - гістидинолдегідрогеназа (КФ.1.1.1.23).

5.3. Спрощена схема біосинтезу цільового продукту

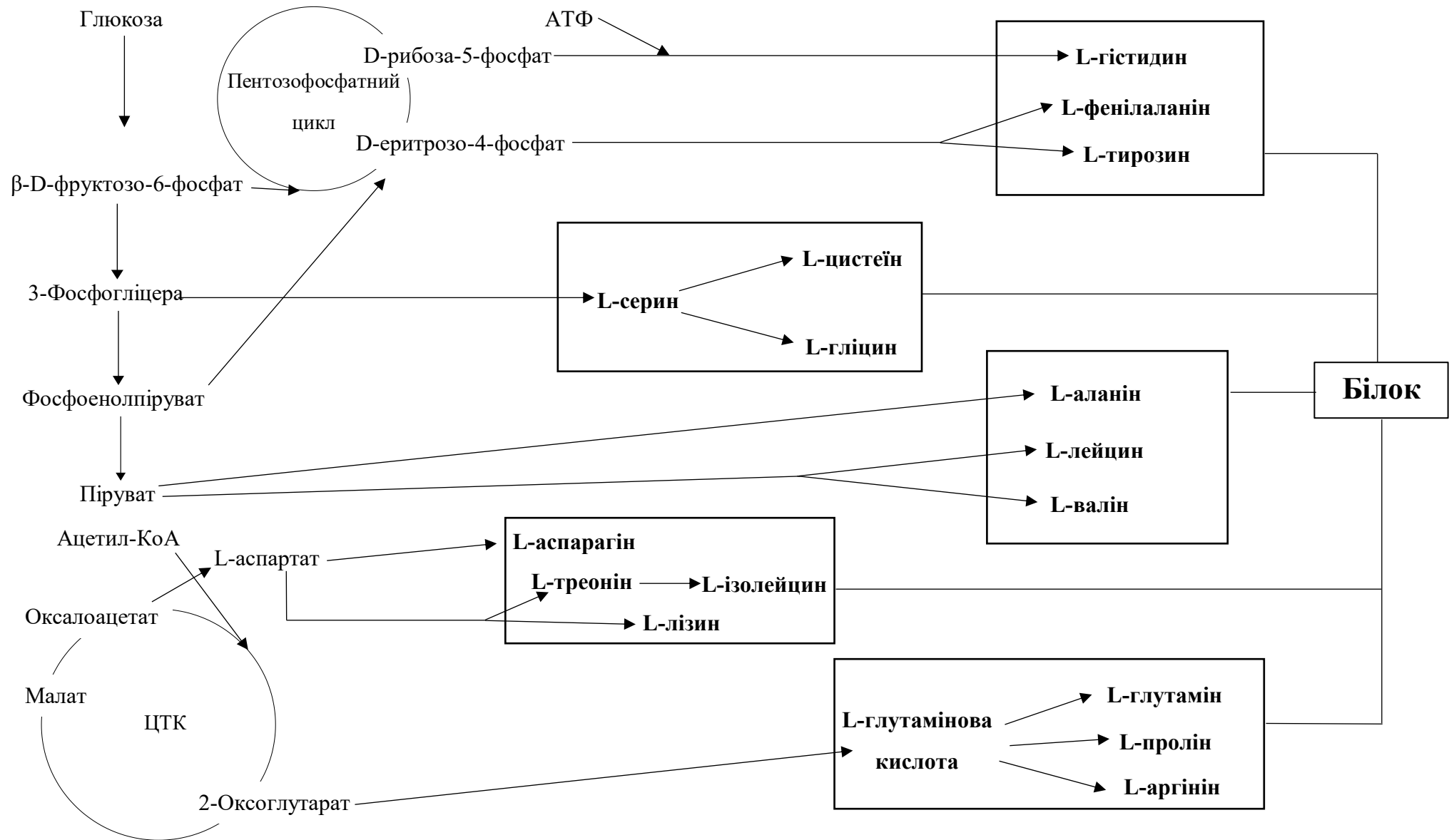


Рис. 5.2. Схема біосинтезу інсуліну в *E. coli* 20 ІВА 1, починаючи з реакцій катаболізму ростового субстрату - глюкози

РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА

6.1. Обґрунтування способу культивування *Escherichia coli* 20 ІВА 1

Для синтезу інсуліну важливим є правильний вибір умов культивування продуцента – *Escherichia coli* 20 ІВА 1. Від цього залежить приріст біомаси мікроорганізму, а отже й кількість синтезованого попередника гормону, яка знаходиться в біомасі у вигляді тілець включення [4].

Для найбільш ефективного культивування та синтезу цільового продукту є необхідними наступні умови:

- Глибинне культивування – біологічний агент є факультативним анаеробом, тому може засвоювати лише розчинний кисень. Для забезпечення необхідних умов використовується глибинне культивування [4].
- Аерація – необхідна для підвищення ефективності культивування *E. coli* 20 ІВА 1. Продуцент є факультативним анаеробом та не може засвоювати атмосферний кисень. Але *E. coli* 20 ІВА 1 може засвоювати розчинний кисень, що підвищує синтез цільового продукту [4, 17].
- Температура рівна 37°C – *Escherichia coli* 20 ІВА 1 є типовим представником мезофілів, може рости при температурах до 45°C, але оптимальною температурою, тобто температурою, при якій буде найбільший приріст біомаси та продуктів біосинтезу, є 37°C [4, 17].
- рН 6,9±0,5 – інсулін є нейтральним продуктом щодо водневого показника, тому його біосинтез відбувається при нейтральних умовах. Через це необхідно підтримувати рН чітко на визначеному рівні за допомогою 16% розчину NH₄ОН [4].
- Напівбезперервне культивування – культивування *E. coli* 20 ІВА 1 для

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Ткачова В. І.			РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ДОПОМІЖНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА	Лім.	Арк.
Перевір.		Скроцька О. І.					48
Реценз.						Кафедра БТМ	
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т. П.					
						49	

біосинтезу інсуліну необхідно проводити періодичним способом з підживленням. Періодичне культивування дає змогу отримати препарат високого ступеня чистоти та забезпечити асептичні умови культивування, крім того, для культивування використовуються порівняно невеликі ферментери. Підживлення дає змогу збільшити вихід біомаси та не дати великим концентраціям компонентів поживного середовища інгібувати ріст біомаси [4, 17].

- Асептичні умови – їх забезпечення є необхідною умовою, оскільки *E. coli* 20 ІВА 1 культивується в умовах, в яких можуть розмножуватись й інші бактерії, а конкуренція зменшить вихід як біомаси, так і цільового продукту. Також асептичні умови необхідні для отримання продукту біосинтезу високого ступеня чистоти [4, 17].

6.2. Обґрунтування типу ферментера

Вибір ферментеру ґрунтується на умовах, які необхідно забезпечити для найбільшого виходу цільового продукту, це напівбезперервне культивування, можливість аерації, глибинного культивування та регуляція інших умов біосинтезу. Крім того, важливим є вибір типу мішалки, оскільки від цього залежить якість перемішування середовища. В даному випадку (біосинтез інсуліну) найкраще використовувати гвинтову мішалку, тому що в'язкість середовища є малою. Гвинтова мішалка забезпечить інтенсивне перемішування при досить низькій енергоємності [17, 18].

Компанія «Bioengineering AG» (Швейцарія) — є визнаним лідером в області планування, проектування та будівництва біотехнологічних, фармацевтичних, хімічних і харчових виробництв. Випускає ферментери та біореактори лабораторного та



Рис. 6.1. Р-пілотний ферментер компанії Bioengineering AG

промислового типів. Ферментер від «Bioengineering» можна легко адаптувати під специфічний процес та умови культивування, такі як режим культивування, перемішуючий пристрій, система аерації, різні титрувальні розчини. Також ферментер оснащений датчиками для постійного контролю показників, а система повністю автоматизована [19].

6.3. Обґрунтування стадії підготовки виробничих приміщень, обладнання і комунікацій

Планувати допоміжні стадії виробництва необхідно з урахуванням особливостей культивування продуцента інсуліну – *Escherichia coli* 20 IBA 1, а саме:

- глибинне культивування;
- аерація;
- температура 37°C;
- рН 6,9±0,5;
- напівбезперервне культивування (періодичне з підживленням);
- асептичні умови.

Виробництво інсуліну за допомогою *Escherichia coli* 20 IBA 1 здійснюють упродовж 60 днів, що передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 100 л, інокулятор об'ємом 10 л, збірники об'ємом 10 та 30 л для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, бокс та лабораторне устаткування.

Виробництво включатиме наступні цехи: цех виробничого біосинтезу, качалочну кімнату, біохімічну лабораторію, оснащену вагами для приготування поживних середовищ та апаратурою для проведення різних видів контролю (рН-метр, хроматограф, ФЕК тощо) та мікробіологічну лабораторію, де знаходяться холодильники, термостати, бокс, автоклав, сухожарові шафи. Відстань між стінами та апаратами має бути 1 м, ширина проходів між апаратами також.

На *рис. 6.1* наведено приблизний план приміщення:

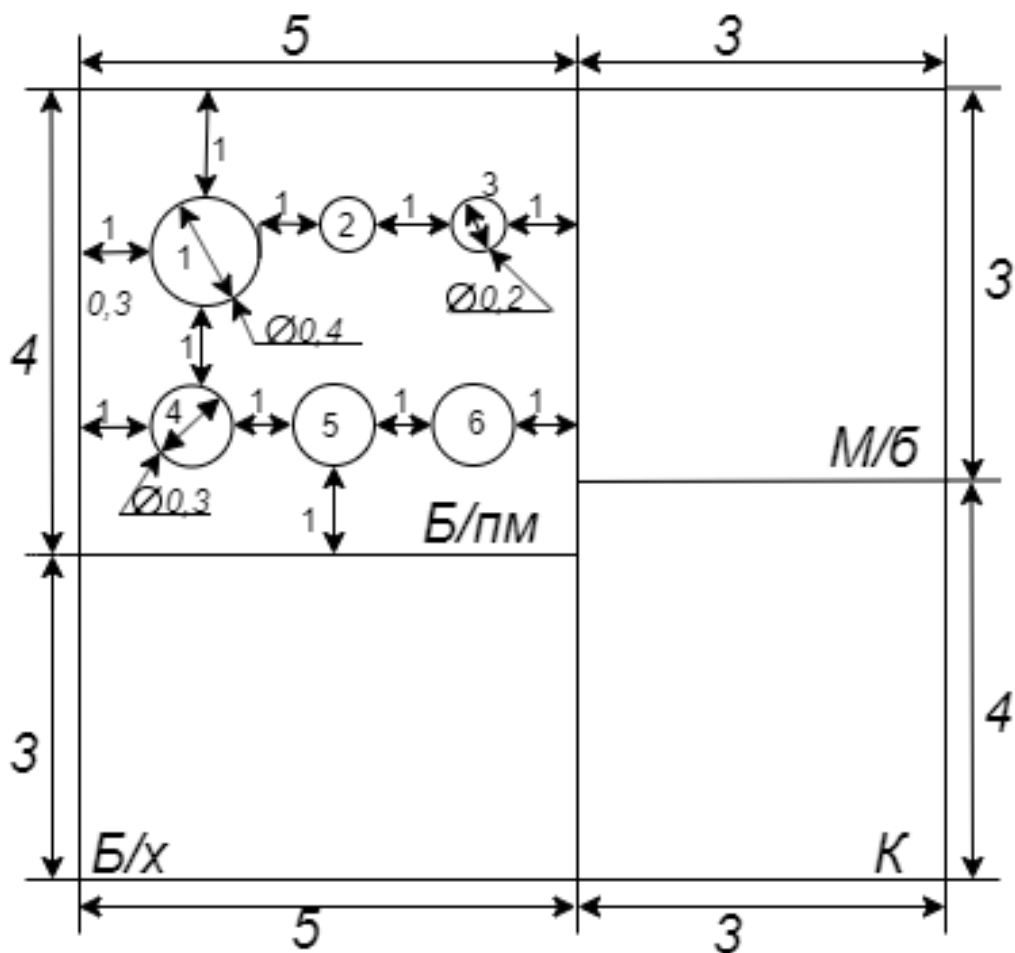


Рис. 6.2. План виробничого приміщення для виробництва інсуліну:

Б/ПМ – цех виробничого біосинтезу/вирощування посівного матеріалу (1 – ферментер об'ємом 100 л, 2 – посівний апарат об'ємом 10 л, 3 – збірник для приготування композиції В для посівного апарата об'ємом 10 л, 4 – збірник для приготування підживлюючого розчину об'ємом 30 л, 5 – збірник для приготування підживлюючого розчину об'ємом 30 л, 6 - збірник для приготування композиції В для ферментера об'ємом 30 л);

М/б – мікробіологічна лабораторія;

Б/х – біохімічна лабораторія;

К – приміщення з качалками.

Розрахунок діаметрів обладнання:

$$1. 100 \text{ л} = 3,14 \times r^2 \times 4r$$

$$r^2 \times 4r = 100 / 3,14 = 31,85$$

$$r^3 = 8$$

$$r = 2$$

$$d = 4$$

$$h = 8$$

$$2. 30 \text{ л} = 3,14 \times r^2 \times 4r$$

$$r^2 \times 4r = 30 / 3,14 = 9,95$$

$$r^3 = 2,4$$

$$r = 1,34$$

$$d = 2,7$$

$$h = 4$$

$$3. 10 \text{ л} = 3,14 \times r^2 \times 4r$$

$$r^2 \times 4r = 10 / 3,14 = 3,19$$

$$r^3 = 0,8 \quad r = 0,92$$

$$d = 2 \quad h = 4$$

Габаритні розміри обладнання наведено у *табл. 6.1*:

Таблиця 6.1

Габаритні розміри основного обладнання для виробництва інсуліну

Обладнання	Геометричний об'єм, л*	Діаметр, м	Висота, м
Ферментер	100	0,4	0,8
Збірник для приготування підживлюючого розчину (2)	30	0,27	0,4
Збірник для приготування композиції В (1)	10	0,2	0,4
Збірник для приготування композиції В (1)	30	0,27	0,4
Посівний апарат (1)	10	0,2	0,4
Загальний об'єм	210		

Примітка. *Дані взято з сайту <http://www.bioengineering.su/>

Підлогу у виробничих приміщеннях для підтримання чистоти та асептичних умов необхідно мити кожного дня, тобто 60 разів за виробництво. Генеральне прибирання необхідно здійснювати щомісячно, відповідно 2 рази. Для цього необхідно розрахувати кількість миючих засобів. Для цього розраховують приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 3 м.

Оптимальна площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить: 20 м² (5x4 м), площа стін – ((4 x 3) + (5 x 3)) x 2 = 54 м², загальна площа – 20 + 54 = 74 м².

Таблиця 6.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м²	Площа стін, м²	Загальна площа, м²
Цех виробничого біосинтезу	20	54	74
Мікробіологічна лабораторія	9	36	45
Біохімічна лабораторія	15	48	63
Приміщення з качалками	12	42	54
Загальна площа	56	180	236

Кількість виробничих циклів для синтезу інсуліну становить 31, включаючи додаткове миття після останнього циклу - 32 цикли. Тоді загальний об'єм миття становитиме: $0,21 \times 32 = 6,72 \text{ м}^3$.

Таблиця 6.3

Розрахунок загальної площі миття та/або дезінфекції оброблюваного об'єкту за весь період виробництва інсуліну

Об'єкт миття та/або дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м² (м³)	Кількість процесів миття та/або дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м² (м³)
Обладнання	0,21	32	6,72
Підлога	56	60	3 360
Стіни, двері, вікна	180	2	360

Підготовка обладнання та комунікацій складається з таких етапів:

- миття;
- перевірка на герметичність;
- технічний огляд;
- стерилізація.

Миття є необхідним етапом для видалення залишків речовин, дезінфекції мікроорганізмів. Оскільки збірники та посівний апарат не є габаритним обладнанням та повністю розбираються, їх миття здійснюють ручним способом. Це також є вигідним через меншу витрату засобу. Для ефективного миття кожні 30 м² засіб у відрі готують заново. Миття ферментера здійснюють подачею миючого засобу через бачок з подальшою подачею води, яка потім зливається в каналізацію. Таким чином ферментер легко миється зсередини [20].

Після миття та ополіскування обладнання проводять технічний огляд візуально з метою виявлення неущільнень в комунікаціях та запірній апаратурі на обладнанні. Ця стадія необхідна через можливість наступних проблем при культивуванні в разі наявності неущільнень. Подачею аераційного повітря до набору надлишкового тиску $P = 0,1\text{--}0,2$ МПа перевіряють герметичність, яка необхідна для виключення контамінації [20].

Стерилізація є вкрай важливою стадією підготовки обладнання. Особливо, якщо протягом року на одному й тому ж обладнанні виготовляють різні препарати. Стерилізують одночасно апарат, комунікації, фільтри. Таким чином остаточно позбавляються мікробіоти, що може зашкодити виробництву [20].

6.4. Обґрунтування вибору мийних та дезінфікуючих засобів

Для того, щоб обрати миючі та дезінфікуючі засоби, необхідно врахувати їх вартість та витрати на обробку потрібної площі виробничого приміщення. Витрата засобу складає приблизно 100 мл на 1 м² (згідно з методичними рекомендаціями щодо підготовки виробничих приміщень, наказ МОЗ України від 14.12.2001 №502).

Ферментер миють автоматично, при цьому витрати мийного засобу - 20% від загального об'єму обладнання. Враховуючи це, для миття обладнання необхідно:

$$6,73 \times 0,2 = \mathbf{1,35 \text{ м}^3 \text{ мийного засобу на рік.}}$$

Загальна площа підлоги, стін, дверей та вікон для миття складає:

$$3\,360 + 360 = \mathbf{3\,720 \text{ м}^2}$$

Вартість концентратів мийних і дезінфікуючих засобів та їх витрати при виробництві наведено в *табл. 6.4.*

Таблиця 6.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для виробництва інсуліну

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концент- рація робочого розчину, %	Загальна площа (об'єм) миття та/або дезінфекції об'єкту за весь період вироб- ництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфі- кувального засобу, грн.	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та/або дезінфекції за весь період виробництва, грн
Гігієнізер	Обладнання	2,5	6,72	1 350	134,4	33,6	45 360
Десо	Обладнання	0,5	6,72	1 350	110	5,5	7 425
Кіілто Антибакт	Стіни, підлога, вікна, двері, обладнання	5,0	3 360/6,72	372/1 350	165,6	8,28	3 080/11 178
Хемодез НУК	Стіни, підлога, вікна, двері	2,5	3 360	372	57,5	9,6	3 571
Хлорантоїн	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2	3 360	372	230	0,46	171

Примітка: ціни наведено станом на листопад 2019 р.: <https://prom.ua>

«Десо» - призначений для миття та дезінфекції різних поверхонь, підлог, стін, обладнання, інвентарю в торгових підприємствах, готелях, перукарнях, лікувально-профілактичних установах, підприємствах громадського харчування, м'ясної, молочної та фармацевтичної промисловостей [21].

Санітарну обробку обладнання, ємностей та комунікацій можна проводити ручним і механізованим способом - нанесення на поверхню за допомогою гідропульта [10]. Склад: четвертинні амонійні солі, неіоногенні поверхнево-активні речовини [22].

Має широкий спектр дії – антибактеріальний, протівірусний та протигрибовий засіб. Відноситься до 4-го класу безпеки, не токсичний, не пошкоджує оброблювані поверхні, безпечний для шкіри рук. При попаданні на шкіру або слизову оболонку потрібно промити великою кількістю води [21, 22].

Для миття обладнання концентрація розчину має становити 0,5%, час миття становить 15 хв. Після дезінфекції здійснюють ополіскування водою протягом 5 хв. Норма витрати при обробці дрантям становить 100 мл/м³ поверхні, при нанесенні за допомогою гідропульта 150-200 мл/м³. Температура розчину 60°C [23].

«Хлорантоїн» - хлорактивний, багатокомпонентний, поліфункціональний дезінфекційний засіб з миючим ефектом [24].

Хлорантоїн зберігають в упаковці виробника в критих, сухих, провітрюваних приміщеннях, недоступних для загального використання на відстані не менше 1 м від нагрівальних приладів, при температурі від 5°C до 30°C. Ефективний час експозиції даного миючого засобу за концентрації 0,2 % – 30 хв [24].

Засіб має бути захищеним від прямих сонячних променів. Ящики та мішки із засобом зберігають на плоских дерев'яних піддонах або піддонах із полімерних матеріалів у штабелях. Висота штабеля не повинна перевищувати 2,5 м. Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виробництва. Робочі розчини доцільно готувати безпосередньо перед обробкою, щоб запобігти розкладанню та інактивації діючої речовини. Також необхідно пам'ятати про засоби індивідуального захисту, оскільки засіб містить хлор активні речовини [24].

«Кііло Антибакт» - універсальний миючий засіб з дезінфікувальним ефектом, призначений для поверхонь, підлоги, стін. Основні діючі речовини четвертинні

амонійні солі та алкіламіни. Є протибактеріальним та протигрибковим засобом. Є безпечним засобом, відноситься до 4-го класу безпеки [25].

«Гігієнізер» - безбарвна рідина з характерним запахом, використовується для миття та обробки обладнання та комунікацій. Діючі речовини - 30% розчин перекису водню та 70% фосфорна кислота. Засіб ефективно щодо санітарно-показових грам позитивних та грам бактерій, в тому числі бактерій групи кишкових паличок, стафілококів, стрептококів, синьогнійної палички, сальмонел, дріжджоподібних і пліснявих грибів тощо. Є безпечним засобом, відноситься до 4-го класу безпеки [26].

«Хемодез НУК» - універсальний засіб для обробки поверхонь, приміщень. Діюча речовина – суміш оцтової кислоти і перекису водню. Має виключно високу бактерицидну (антимікробну), противірусну і фунгіцидну активність щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій, в тому числі бактерій групи кишкових паличок, туберкульозу, стафілакоков, стрептококів, сальмонел, а також спороутворюючих бактерій, дріжджових і цвілевих грибів і вірусів, включаючи вірус групи А птахів (H5N1) і найбільш стійких до дії дезінфікуючих засобів полівірусів. Відноситься до 4-го класу безпеки як безпечний засіб [27].

Згідно *табл. 6.4* робимо висновок, що для миття обладнання доцільно буде використовувати миючі засіб «Десо», а для миття стін, підлоги, вікон та дверей – «Хлорантоїн», через те, що їх вартість за один літр (кг), витрати на їх придбання для всього періоду виробництва становлять найменше. Кожні три місяці засоби необхідно змінювати, щоб виключити ризик виникнення резистентних штамів.

Для забезпечення належної чистоти повітря у виробничих приміщеннях передбачають наявність стельових бактерицидних ламп, які вмикають на 1,5–2 год після проведення генерального прибирання (проводиться раз на тиждень), в попередньо звільнених від персоналу приміщеннях.

6.5. Обґрунтування стадії підготовки аераційного повітря

Продуцент інсуліну *E. coli* 20 ІВА 1. є факультативним анаеробом та не може засвоювати атмосферний кисень. Але *E. coli* може засвоювати розчинний кисень, що підвищує накопичення біомаси та синтез цільового продукту. Відповідно на

технологічній схемі необхідно передбачити стадії підготовки аераційного повітря. При цьому витрати аераційного повітря будуть невеликі, тому підготовку здійснюють в окремих приміщеннях виробничої будівлі.

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітря забірником у точці, що на 3 метри вище верхньої точки будівлі, оскільки на такій висоті повітря буде чистішим. В даному випадку, з урахуванням габаритів обладнання та висоти розміщення, висота поверху 3 м, на дах припадає ще 2 м, отже висота забору буде 8 м [20].

Очищення повітря здійснюють в декілька стадій, що є необхідним для ефективної очистки та дає змогу запобігти контамінації при культивуванні. На початку відбувається очищення від механічних домішок. Далі повітря через компресор подається на аерацію. В компресорі повітря стискають, потім охолоджують в теплообміннику та надходить в ресивер. Така схема необхідна для видалення зайвої вологи, що може вплинути на процес біосинтезу [20].

Останнім є остаточне очищення повітря від домішок та мікроорганізмів. З цією метою повітря пропускають через набивні головні фільтри, а потім через фільтри тонкого очищення, після чого потрапляє в ферментер [20].

6.6. Обґрунтування способу підготовки та стерилізації поживного середовища

Для виробничого культивування *E. coli* 20 ІВА 1 з метою синтезу інсуліну використовують поживне середовище наступного складу (г/л): глюкоза – 109,42; глутамінова кислота – 1; манітол - 10,0; K_2HPO_4 - 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; $CaCl_2$ - 0,04; пролін – 149,9, а також мікроелементи: $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,0025; H_3BO_3 - 0,00001; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,00001; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00001; $MnCl_2$ - 0,001; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,00001; біотин - 0,00001; тіамін - 0,0001 [4].

Зазначимо, що на етапах підготовки посівного матеріалу не використовують глюкозу, додаємо тетрациклін – 0,1 г/л, використовуємо меншу концентрацію проліну – 0,6 г/л та додатково додаємо тіамін – 0,002 г/л [4].

Для забезпечення ефективного процесу в посівному апараті об'ємом 10 л та ферментері на 100 л всі солі стерилізують разом, щоб не було утворення нерозчинних

комплексів солей, рН розчину з солями необхідно довести до значення 4-4,5 за допомогою 16% розчину HCl. Потім, перед культивуванням, розчином 16% NH₄OH рН доводять до 7,0, при якому й відбувається біосинтез та синтез цільового продукту. Кількість титрувальних розчинів визначають як 2 мл на 1 л середовища, але готують з запасом, тож для культивування в посівному апараті на 10 л необхідно по 12 мл титрувальних розчинів, а для виробничого біосинтезу в ферментері на 100 л – по 120 мл титрувальних розчинів.

Розчин тетрацикліну не враховують при складанні композицій для стерилізації, оскільки він закуповується стерильним розчином концентрацією 10 г/л та додається безпосередньо перед ферментацією.

Враховуючи, що мікроелементи містяться у дуже малих кількостях та деякі з них потребують особливих умов стерилізації (холодна стерилізація), готують їх окремо концентрованими розчинами та додають після стерилізації поживного середовища. Концентрація мікроелементів у концентрованому розчині: 2,5 г/л FeCl₃ • 6H₂O, 10 мг/л H₃BO₃, 10 мг/л ZnSO₄ • 7H₂O, 10 мг/л CoCl₂ • 6H₂O, 10 мг/л CuSO₄ • 5H₂O, 1 г/л MnCl₂, 10 мг/л Na₂MoO₄ • 2H₂O, 10 мг/л біотин та 0,1 г/л тіамін для культивування в колбах на качалці, посівному апараті на 10 л та виробничому ферментері на 100 л. Окремо в таблиці наводимо їх кількість при приготуванні середовищ різних об'ємів (табл. 6.5).

Таблиця 6.5

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	FeCl ₃ • 6H ₂ O	H ₃ BO ₃	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	CoCl ₂ • 6H ₂ O	CuSO ₄ • 5H ₂ O	MnCl ₂	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	Біотин	Тіамін
0,45	1,1 мг	4,5 мкг	4,5 мкг	4,5 мкг	4,5 мкг	0,45 мг	4,5 мкг	4,5 мкг	45 мкг
5,1	12,8 мг	51 мкг	51 мкг	51 мкг	51 мкг	5,1 мг	51 мкг	51 мкг	0,51 мг
51	128 мг	0, 51 мг	0, 51 мг	0, 51 мг	0, 51 мг	51 мг	0,51 мг	0, 51 мг	5,1 мг

З наведеної таблиці можемо зробити висновок про те, що доцільно приготувати розчин мікроелементів об'ємом 1 л на потреби всіх стадій вирощування посівного матеріалу та для виробничого біосинтезу, так як наведені наважки занадто малі для зважування на високоточних лабораторних вагах окремо. Даний запасний розчин готують в колбі на 2 л, стерилізують холодною стерилізацією (фільтруванням) з використанням гладкого фільтрувального паперу [28]. Готовий стерильний розчин зберігатимуть в лабораторії та необхідну кількість додаватимуть на відповідному етапі безпосередньо перед ферментацією.

Другим концентрованим розчином є розчин тіаміну концентрацією 20 г/л. об'ємом 100 мл. Розчин готують в колбі на 250 мл, а стерилізують в автоклаві 30 хв при 100°C. Готовий стерильний розчин зберігатимуть в лабораторії та необхідну кількість додаватимуть на відповідному етапі безпосередньо перед ферментацією [29].

Крім того, обраний варіант ферментації потребує додавання підживлюючих розчинів. Розрахунок додавання підживлюючих розчинів необхідний через нерівномірне додавання глюкози протягом біосинтезу.

У вигляді підживлюючого розчину необхідно внести в середовище 149,9 г/л проліну. Культивування триває 20 год. При цьому пролін додаємо по 12 г/л в одній порції протягом перших 15 год культивування, тобто підживлення відбувається 12 порціями, через кожні 1 год 15 хв.

Розрахунок потреби в підживленні глюкозою здійснюється згідно графіка приросту біомаси:

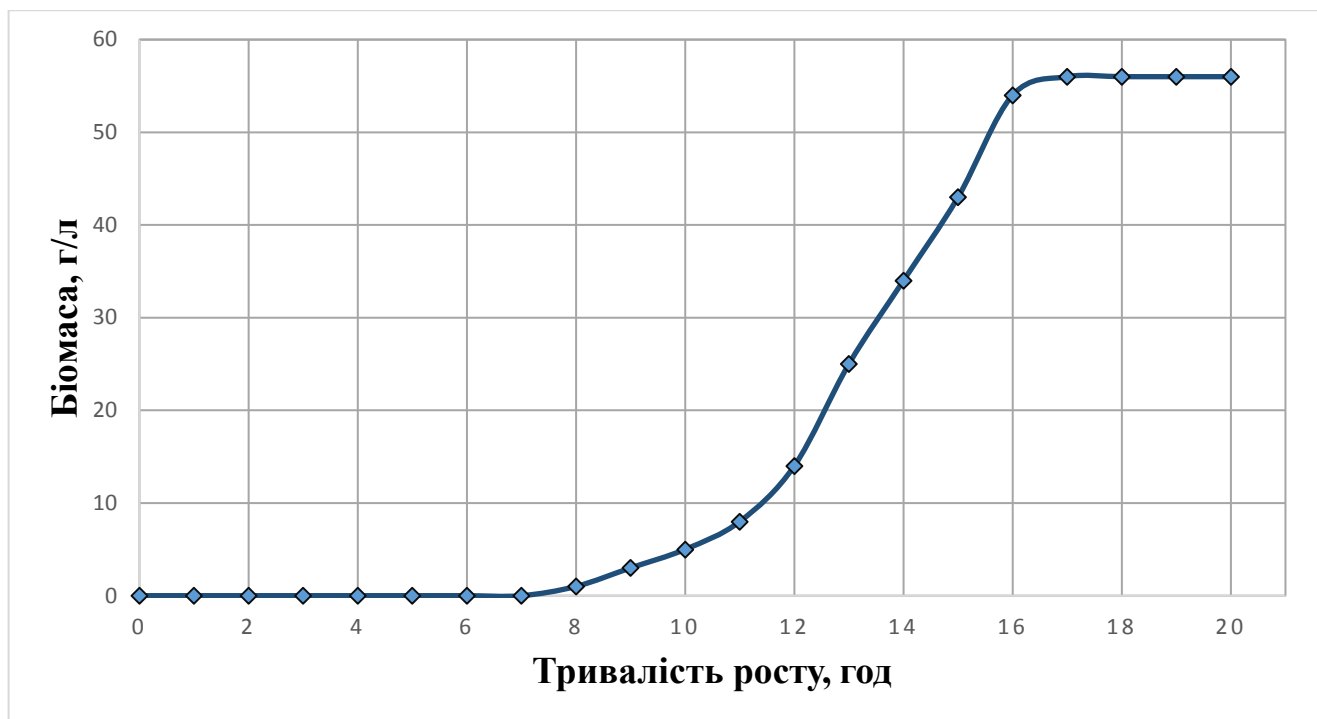


Рис. 6.3. Залежність приросту біомаси від тривалості культивування

Загальна потреба глюкози складає 109,42 г/л. Для ефективного процесу накопичення біомаси та, відповідно, цільового продукту, глюкозу підтримують на рівні 8 г/л. Така кількість глюкози додається на початку культивування.

Наступне додавання глюкози протягом перших 15 годин культивування здійснюється експоненційно для підтримання рівня глюкози. Далі на одну годину подачу глюкози припиняють, потім додають для підтримання на рівні 3 г/л протягом останніх 4 год, що показано на *рис. 6.4*:

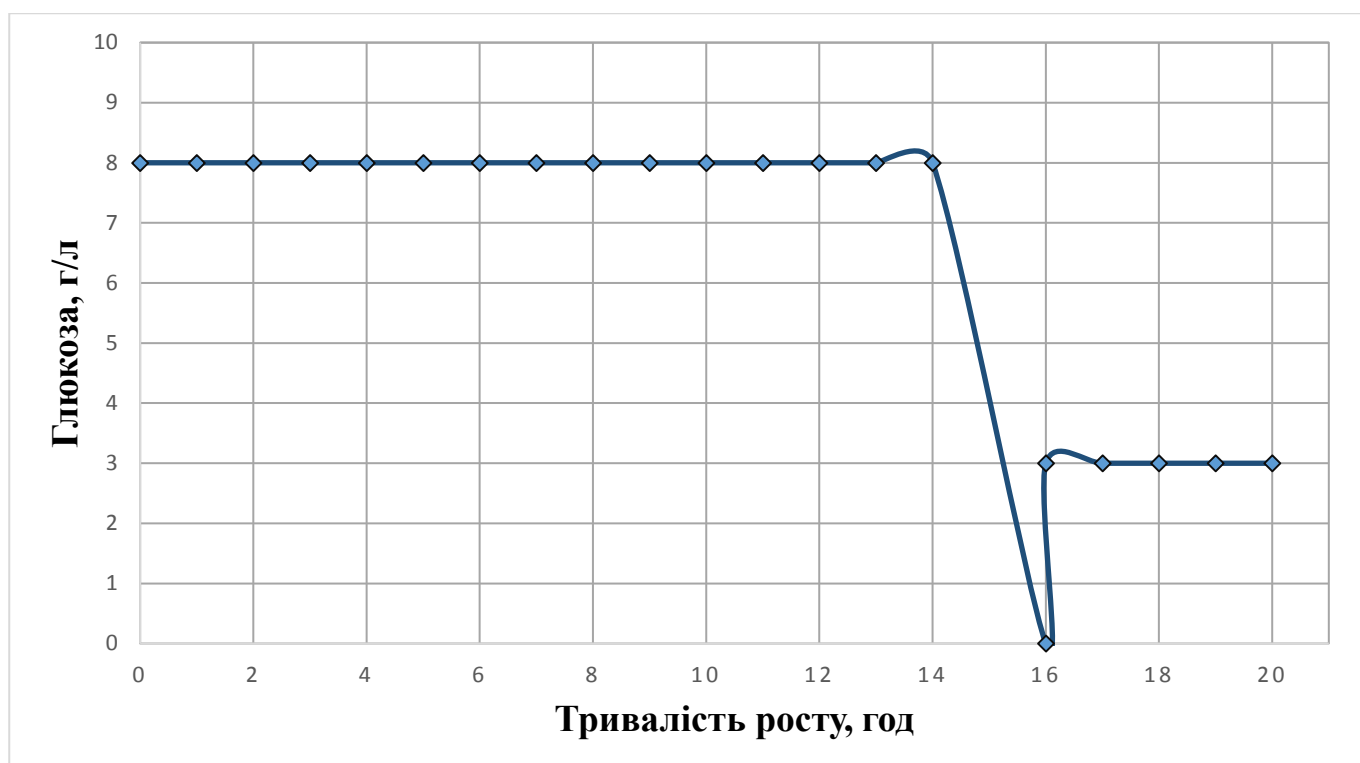


Рис. 6.4. Вміст глюкози в середовищі протягом виробничого біосинтезу

Глюкозу подають кожну годину. Розрахунок порцій здійснюють згідно приросту біомаси.

В перші 7 год подача глюкози не здійснюється, оскільки триває лаг-фаза та біомаса не зростає.

За 8-му годину біомаса зросла на 1 г/л. Отже, було використано 0,5 г/л вуглецю, що відповідає 1,25 г/л глюкози. Глюкоза використовується у вигляді 40% розчину, отже перша порція підживлення 3,13 мл/л 40% розчину глюкози.

Після 9-ої години культивування біомаса стала 3 г/л, тобто зросла на 2 г/л. Це відповідає 1 г/л карбону та 2,5 г/л глюкози. Необхідно додати 6,25 мл/л підживлюючого розчину.

Після 10-ої години біомаса = 5 г/л, тобто зросла на 2 г/л. Необхідно додати 6,25 мл/л підживлюючого розчину.

Після 11-ої години – 8 г/л, приріст біомаси склав 3 г/л. Це відповідає 1,5 г/л карбону та 3,75 г/л глюкози. Необхідно додати 9,4 мл/л 40% підживлюючого розчину.

Після 12-ої години необхідно додати 18,75 мл/л підживлюючого розчину. Після 13-ої години необхідно додати 19,25 мл/л підживлюючого розчину. Після 14-ої години необхідно додати 15,75 мл/л підживлюючого розчину.

Після 14-ти годин культивування на одну годину припиняють подачу глюкози.

Після 16-ої години підтримують глюкозу на рівні 3 г/л, для цього в середовище додають 4,5 г/л 40% підживлюючого розчину.

Після 17-ої години культивування біомаса досягає 56 г/л, тобто різниця складає 2 г/л. Це відповідає 1 г/л вуглецю та 2,5 г/л глюкози. Для підтримання визначеного рівня вуглеводу додають 6,25 г/л підживлюючого розчину.

Останні години культивування біомаса залишається на визначеному рівні, тому підживлення не використовують.

Дані щодо об'ємів підживлення глюкози наводимо також у вигляді діаграми:

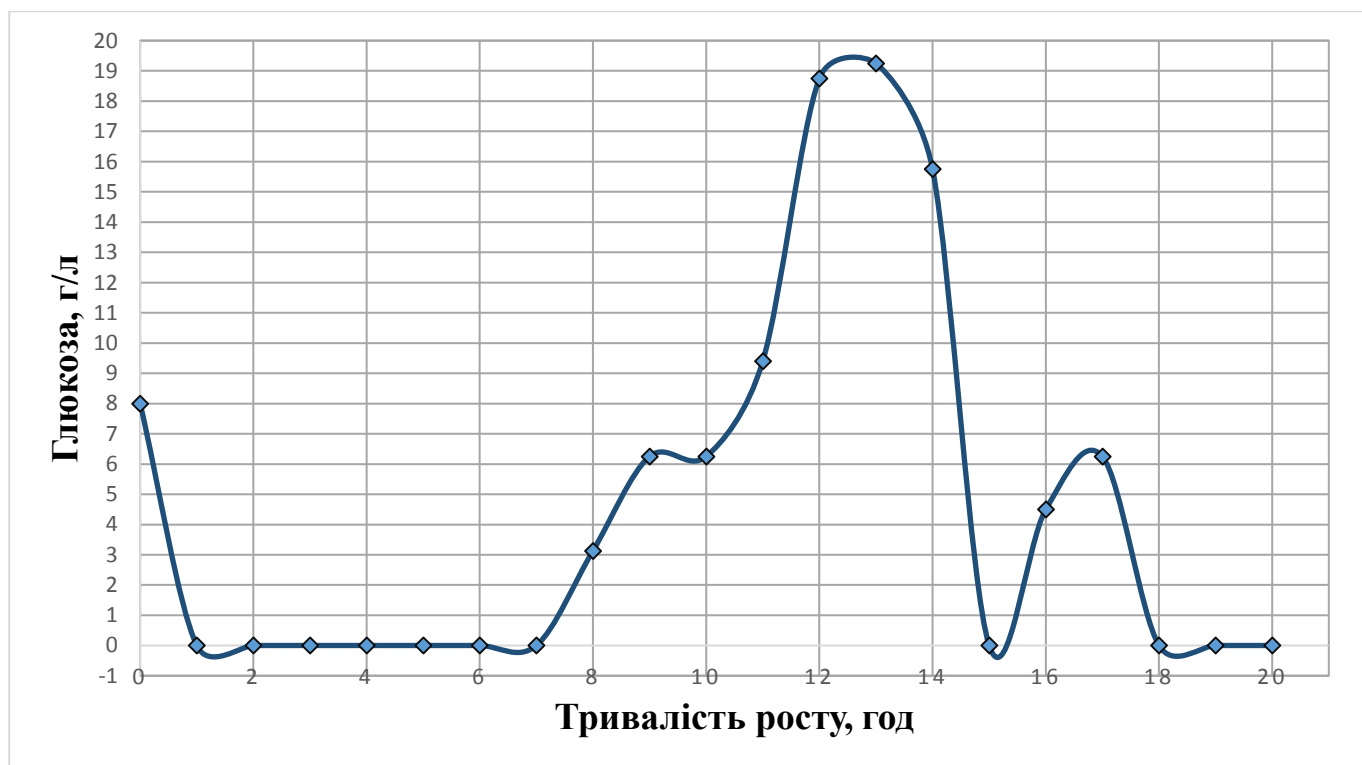


Рис. 6.5. Порції додавання глюкози в середовище протягом виробничого біосинтезу

Результати розрахунків вмісту компонентів поживного середовища наводжу в таблиці:

Таблиця 6.6

Компоненти поживного середовища	Вміст, г/л			
	Сумарний	Початковий	В підживлюючому розчині	В одній порції підживлення
Глюкоза	109,42	8,0	101,42	Експоненційне підживлення, розрахунок порцій наведено вище
Глутамінова кислота	1,0	1,0	-	-
Манітол	10,0	10,0	-	-
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0	-	-
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2	0,2	-	-
CaCl ₂	0,04	0,04	-	-
Пролін	149,9	-	149,9	12
FeCl ₃ • 6H ₂ O	0,0025	0,0025	-	-
H ₃ BO	0,00001	0,00001	-	-
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,00001	0,00001	-	-
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,00001	0,00001	-	-
MnCl ₂	0,001	0,001	-	-
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,00001	0,00001	-	-
Біотин	0,00001	0,00001	-	-
Тіамін	0,0001	0,0001	-	-

Вирощування інокуляту в колбах на качалках

Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *E. coli* 20 IBA 1, умовно ділимо його на композиції залежно від режиму стерилізації. Розчин тетрацикліну не стерилізуємо. Окремо наведено підготовку та стерилізацію розчинів мікроелементів.

Органічні компоненти (композиція А) є термолабільними і потребують м'якого режиму стерилізації. Солі композицій В та С стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфати стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинних фосфатів магнію та кальцію. Стерилізацію проводять в автоклаві. Склад композицій:

Композиція А: пролін, глютамінова кислота, манітол (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв).

Композиція В: K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131°С, 40 хв).

Композиція С: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$ (режим стерилізації: 131°С, 40хв).

Для стерилізації компонентів використовують горизонтальний циліндричний автоклав WS-90YDA. Він підходить вимогам щодо стерилізації композицій та має певні переваги в експлуатації [30].

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 10 л

Кількість поживного середовища є досить великою, тому склад композицій для стерилізації дещо змінюємо. Розчин тетрацикліну не стерилізуємо. Окремо наведено підготовку та стерилізацію розчинів мікроелементів.

Стерилізація композиції А відбувається в посівному апараті, композицію А готують в колбі на 250 мл, стерилізують в автоклаві WS-90YDA. Композицію В готують в окремому збірнику на 10 л і потім переносять в посівний апарат для стерилізації. Для запобігання утворенню нерозчинних комплексів вносять 16% розчин HCl. Склад композицій:

Композиція А: пролін, глютамінова кислота, манітол (режим стерилізації: 112°С, 30 хв).

Композиція В: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131°С, 40хв, рН 4,0 – 4,5).

Перед посівним апаратом розміщено збірник відповідного об'єму для приготування композиції.

Вирощування культури в ферментері об'ємом 100 л

Склад композицій та компонентів поживного середовища змінюємо. Окремо наведено підготовку підживлюючих розчинів (в збірниках по 30 л), що містять джерела вуглецю та азоту, а також підготовку та стерилізацію розчину мікроелементів.

Композицію А готують 40% розчином (оскільки містить вуглевод глюкозу) в колбі на 5 л стерилізують в автоклаві WS-90YDA. Композицію В готують в збірнику на 30 л, з якого переносять в ферментер, де відбувається її стерилізація. Для запобігання утворенню нерозчинних комплексів вносимо 16% розчин HCl.

Склад композицій:

Композиція А: глюкоза, глютамінова кислота, манітол (режим стерилізації: 112°C, 30 хв).

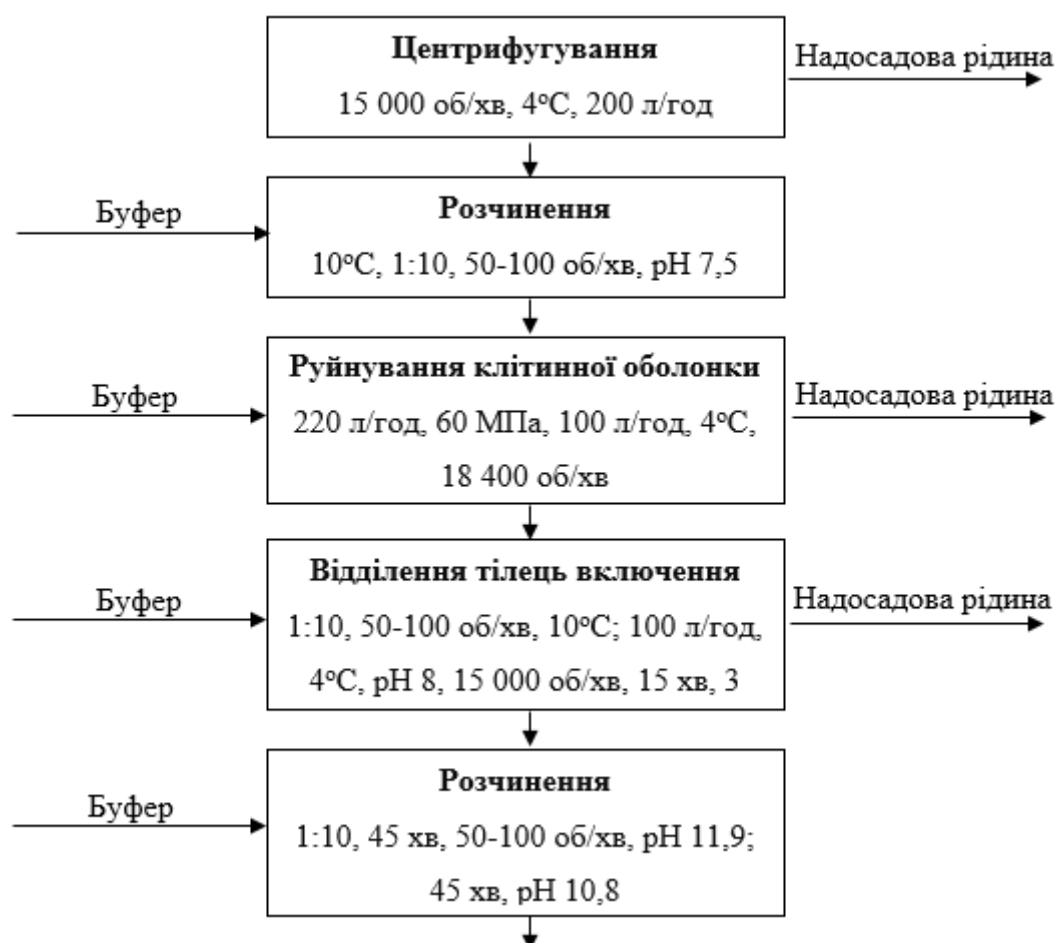
Композиція В: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 (режим стерилізації: 131°C, 40хв, рН 4,0 – 4,5).

6.7. Обґрунтування способу виділення та очищення інсуліну з продуценту

Escherichia coli 20 IBA 1

При виробничому біосинтезі за один цикл отримуємо 51 л середовища з концентрацією біомаси 56 г/л. Інсулін синтезується у вигляді тілець включення в кількості 14,5 г/л. З огляду на це необхідними стадіями виділення інсуліну з клітин є відділення біомаси з культуральної рідини, руйнування клітин та відділення тілець включення, розчинення та ренатурація тілець включення, перетворення попередника інсуліну в інсулін шляхом ферментативної конверсії та очищення білку за допомогою хроматографії. На завершальних етапах необхідно висушування та фасування інсуліну.

На *рис. 6.6* представлена загальна схема отримання післяферментаційних стадій отримання готового продукту, а нижче наведено обґрунтування кожної стадії.



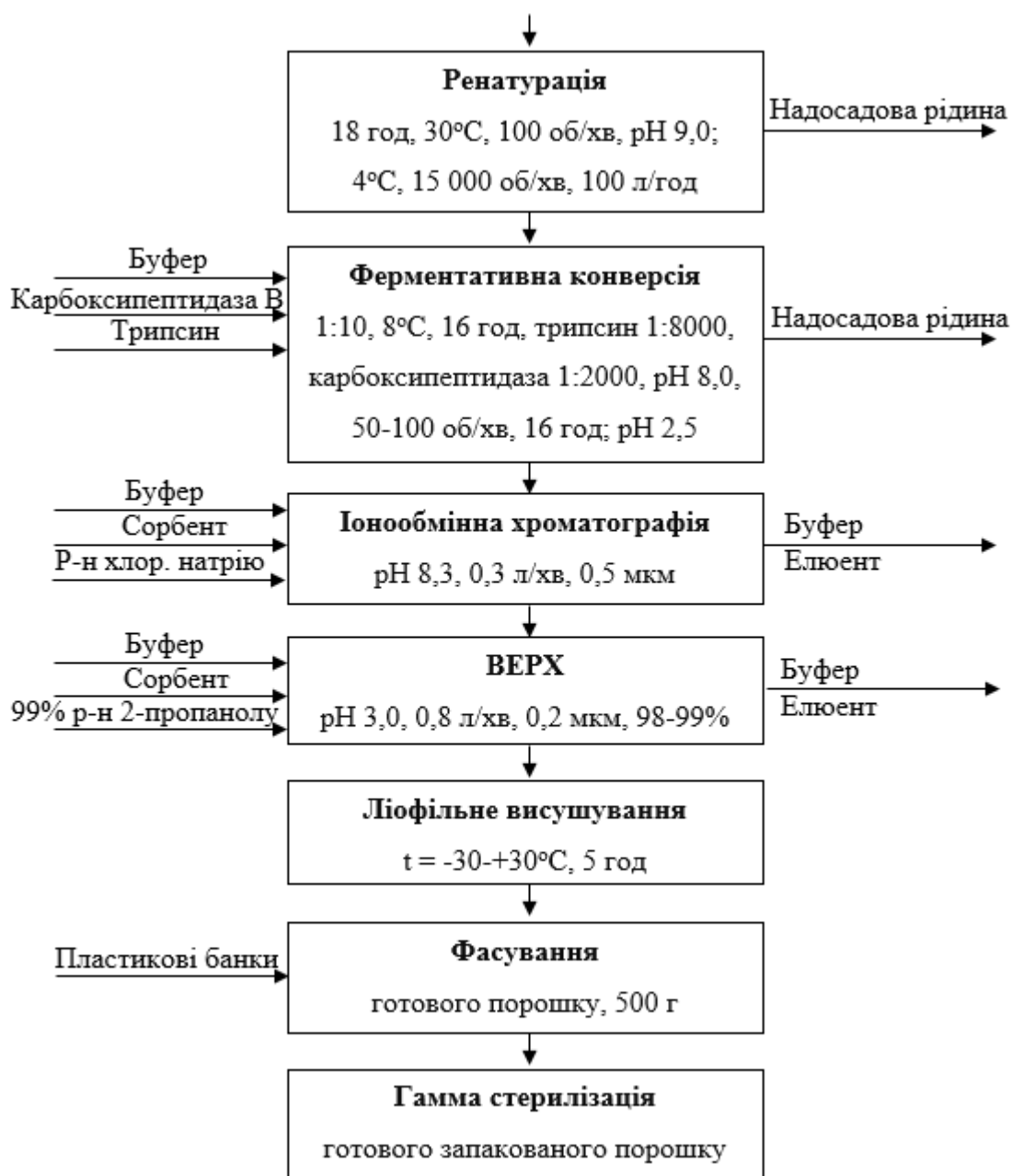


Рис. 6.6. Схема отримання субстанції інсуліну

6.7.1. Обґрунтування стадії відділення біомаси

Першим етапом в виділенні та очищенні інсуліну є відділення біомаси. Воно не потребує попередньої обробки. Порівняння найрозповсюдженіших на сьогоднішній день методів відділення біомаси від культуральної рідини наведено в таблиці [31]:

Таблиця 6.7

Методи відділення біомаси від культуральної рідини

Метод	Переваги	Недоліки
Сепарація	фактично немає втрат біомаси, висока продуктивність	висока енергоємність процесу, необхідність використання складного обладнання, підвищена температура проходження процесу
Фільтрування	простота проведення процесу, достатньо висока продуктивність	налипання клітин на фільтрі, що знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування та втрати біомаси.
Відстоювання	простота проведення процесу	велика тривалість процесу, втрати по біомасі, кімнатна температура проходження процесу
Центрифугування	висока продуктивність, висока швидкість розділення, можливість використання для часток малих розмірів, можливість забезпечення низької температури проведення процесу	необхідність дорогівартісного обладнання, певні вимоги до проведення процесу

Тож, порівняно з іншими методами, центрифугування має суттєві переваги:

- менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням та відстоюванням;
- можливість автоматизувати процес;
- високій фактор розділення;
- можливість відділення дуже малих часток;
- більша швидкість проведення процесу порівняно з фільтруванням, відстоюванням;
- можливість використання холодного режиму центрифугування;
- висока продуктивність.

Оптимальним режимом для відділення біомаси *E. coli* 20 ІВА 1 є 15 000 об/хв при 4°C [4].

Загальна кількість біомаси за цикл складає 2,9 кг. З огляду на це та параметри відділення біомаси необхідна проточна високошвидкісна центрифуга з охолодженням. Центрифугу виготовляємо на замовлення (зменшуємо місткість камери сухого осаду) з параметрами пілотної проточної центрифуги СЕРА Z 61, яка відповідає всім вимогам та дозволяє відділити біомасу швидко та з мінімальними втратами [32].

Таблиця 6.8

Характеристики СЕРА Z 61

параметри	значення
Протока min / max	50/1500 л/год
Швидкість	До 17 000 об/хв
Місткість камери для сухого осаду	3 л
контроль температури	Сорочка і вакуумна система
Потужність	1,5 кВт
Габарити (Ш / В / Г)	81 × 130 × 50 см
Вага	350 кг



Рис. 6.7. Пілотна проточна центрифуга СЕРА Z 61

Принцип дії: суміш рідин подається в нижню частину ротора за допомогою насосів або сили тяжіння. В середині ротора кожна фракція рідин розташовується пошарово, відповідно до своєї щільності, за рахунок чого навіть найдрібніші домішки швидко і надійно осідають в роторі. Центрифугат піднімається через центр ротора до його вершини, після чого виходить очищеним. Дві фракції суміші рідин направляються в окремі ємності для збору [32].

Приблизна ціна центрифуги згідно <https://russian.alibaba.com> 3 000 доларів.

6.7.2. Обґрунтування стадії руйнування клітин *Escherichia coli* 20 IBA 1

Оскільки інсулін синтезується в клітині у вигляді тілець включення, наступним етапом необхідно зруйнувати клітинну стінку для виділення тілець включення. Порівняння методів руйнування клітинної оболонки наведено в таблиці [15, 31]:

Таблиця 6.9

Методи руйнування клітинної оболонки

Метод	Переваги	Недоліки
Ферментативний лізис	швидке руйнування оболонки, доступність реактивів	можливість виникнення резистентних штамів, можлива токсичність та негативний вплив готового препарату на організм людини при недостатній очистці, висока температура проходження процесу
Ультразвук	дуже висока ефективність, не впливає на кінцеву якість продукту	необхідність використання спеціального обладнання, складність промислового використання

Осмотичний тиск	доступність реактивів, швидкий процес	необхідність слідкувати за реакцією, можливість впливу на гібридний білок
Високий тиск	висока ефективність, не впливає на кінцеву якість продукту, можливість зменшити енерговитрати	необхідність використання спеціального обладнання

Найбільш розповсюдженим методом на даний час є руйнування клітинної оболонки за допомогою ферментативного лізису. *E. coli* 20 ІВА 1 є грамнегативною бактерією. Клітинна стінка таких бактерій складається з тонкого шару пептидоглікану та зовнішньої мембрани з білків, фосфоліпідів та ліпополісахаридів, між якими розташований периплазматичний простір. Дуже ефективним для руйнування оболонок грамнегативних бактерій є антибактеріальний агент, фермент тваринного походження лізоцим, що має бактерицидну дію на даний мікроорганізм [15].

Доволі простим у виконанні та швидким є метод обробки суспензії клітин ультразвуком. Ультразвук – високочастотні коливання, що провокують необоротні фізико-хімічні зміни компонентів мікробної клітини, механічні ушкодження всіх клітинних структур. При цьому спосіб підходить для виділення окремих клітинних компонентів та не ушкоджує їх при правильно підібраних умовах процесу. Механізм дії ультразвуку пов'язаний з кавітацією – утворенням порожнин, при закриванні яких виникають гідравлічні удари, що руйнують клітину [15, 31].

Дія осмотичного тиску заснована на властивостях мікроорганізму *E. coli* 20 ІВА 1. Осмотичний тиск визначає концентрація речовин, розчинених в навколишньому середовищі стосовно мікроорганізму. Якщо осмотичний тиск в клітині вищий за тиск в навколишньому середовищі, то в клітину надходить вода. За високого тиску в навколишньому середовищі клітина втрачає здатність поглинати воду [14].

Високий тиск сильно впливає на розвиток бактерій. *E. coli* 20 ІВА 1 не є баротолетантним мікроорганізмом та краще всього росте за атмосферного тиску. Тиск 20-60 МПа розриває клітину *E. coli* 20 ІВА 1 [15].

Осмысливши всі переваги та недоліки способів руйнування клітинної оболонки, обираємо лізис під дією високого тиску, що повністю відповідає встановленим вимогам та задовольняє потреби пов'язані з актуальністю роботи.

Для відділення тілець включення використовують центрифугування. Так як зруйновані клітини будуть відцентрифугуватись разом із тільцями включення, необхідно попередньо розчинити біомасу в холодному (10°C) буферному розчині (1:10), що містить 20 мМ Tris, 1 мМ ЕДТА та 100 мМ хлориду натрію з рН = 7,5. Такий буфер використовується для того, щоб зв'язати виділені тільця включення та затримати їх в товщі розчину під час центрифугування. Для розведення використовують збірник з сорочкою. Після цього суспензію пропускають через гомогенізатор високого тиску Ariete 3006 [33], а далі центрифугують [7]. Параметри центрифугування: 4°C, 18 400 об/хв [4].

Гомогенізатор Ariete 3006 відповідає необхідним вимогам, а саме: висока швидкість проходження процесу, знижені супутні витрати енергоресурсів, простота експлуатації, висока продуктивність [33].



Рис. 6.8. Гомогенізатор високого тиску Ariete 3006

Характеристики гомогенізатора представлені в *табл 6.10 та 6.11* [33]:

Таблиця 6.10

Характеристики гомогенізатора GEA Ariete Homogenizer 3006

параметри	значення
Продуктивність	До 1000 л/год
Змашувальна і охолоджуюча вода	60 л/год
Хід	60 мм
Потужність	До 15 кВт
Вага	500 кг

За типом відноситься до плунжерних гомогенізаторів. Плунжерний механізм з'єднується з клапаном, через який поступає суспензія, та камерою високого тиску. Механізм приводиться в дію за допомогою насоса, який створює високий тиск в камері, де під дією тиску руйнується оболонка клітин [33].

Таблиця 6.11

Залежність продуктивності від тиску гомогенізатора

Тиск, бар	100	180	200	250	400	600	1000	1200	1500
Продуктивність, л/год	1000	750	750	600	350	220	120	120	50

Оскільки для *E. coli* 20 ІВА 1 необхідний тиск 20-60 МПа, згідно з наведеної у табл. 5 залежності, обираємо режим гомогенізації 600 бар (60 МПа) – 220 л/год. Таким чином, 30 л суспензії розведеної біомаси (3 кг біомаси, розведення 1:10) пройдуть через гомогенізатор за 10 хв.

Приблизна ціна гомогенізатора згідно <https://russian.alibaba.com> 3 000 доларів.

Загальна кількість тілець включення за цикл складає 750 г. З огляду на це та режим відділення тілець в необхідна проточна високошвидкісна центрифуга з охолодженням. Центрифугу виготовляємо на замовлення (зменшуємо місткість камери сухого складу) з параметрами пілотної проточної центрифуги СЕРА Z 41, яка дозволяє швидко відділити тільця включення та з мінімальними втратами [34].

Таблиця 6.12

Характеристики СЕРА Z 41

параметри	значення
Протока min / max	20/500 л/год
Швидкість	До 20 000 об/хв
Місткість камери для сухого осаду	1 л
контроль температури	Сорочка і вакуумна система
Потужність	0,9 кВт
Габарити (Ш / В / Г)	81 × 117 × 35 см
Вага	290 кг



Рис. 6.9. Пілотна проточна центрифуга СЕРА Z 41

Принцип дії: суміш рідин подається в нижню частину ротора за допомогою насосів або сили тяжіння. Всередині ротора кожна фракція рідин розташовується пошарово, відповідно до своєї щільності, за рахунок чого навіть найдрібніші домішки швидко і надійно осідають в роторі. Центрифугат піднімається через центр ротора до його вершини, після чого виходить очищеним. Дві фракції суміші рідин направляються в окремі ємності для збору [34].

Для повноцінного розділення залишків клітин та тілець включення, осад промивають холодним буферним розчином (1:10), що містить 50 мМ Тріс-гідрохлорид, 500 мМ натрію хлорид та 1% Тритон X-100 з рН = 8,0, центрифугують. Потім двічі промивають 50 мМ Тріс-гідрохлоридом, 500 мМ натрію хлоридом з рН = 8,0, центрифугують. Параметри центрифугування після промивки тілець включення 4°C, 15 000 об/хв [4].

Для циклічного промивання та центрифугування використовуємо систему, що складається зі збірника, та центрифуги, з'єднаних трубами.

Приблизна ціна центрифуги згідно <https://russian.alibaba.com> 1 500 доларів.

6.7.3. Обґрунтування стадії розчинення тілець включення та ренатурації

На цьому етапі необхідно виділити з тілець включення фрагменти інсуліну. З цією метою проводиться розчинення тілець включення, тобто руйнування зв'язків білку в певних місцях. Це означає, що відбувається денатурація (інактивація) гібридного білку. Тому наступним після розчинення проводять ренатурацію – відновлення нативного стану.

Згідно відомих методів виробництва інсуліну, використовують наступні варіанти розчинення тілець включення:

1. тільця включення розчиняють в буфері (1:10), що містить 8 М сечовини, 50 мМ гліцину, 150 мМ β -меркаптоетанолу, 2 мМ ЕДТА та має рН 8,0. Інкують суспензію при кімнатній температурі 6 годин. Далі проводять високошвидкісне центрифугування для освітлення розчину та видалення нерозчинних часток (24000 об/хв) [7].

Для ренатурації використовують рефолдинг. Ємність для рефолдингу наповнюють буфером складом 50 мМ гліцин, 2 мМ ЕДТА, 5мМ цистин, 10% гліцерин з рН = 11,2, охолоджують до 5°C. Потім освітлений поліпептидний розчин і буфер для рефолдингу в пропорції 1:70 швидко змішують подачею цих розчинів в камеру змішування. Реакційну суміш переносять у ємність для рефолдингу на 10 год при 5°C при повільному перемішуванні [7].

2. тільця включення розчиняють в буфері (1:4) складом 8 М сечовини, 0,05 М тріс-гідрохлориду, 0,001 М дитіотреїтолу та має рН 8,0. Інкують суспензію при температурі 18°C 12 годин при постійному перемішування на магнітній мішалці [5].

Такий метод вимагає подальшого кислотного осадження білку. Розчин гібридного білка розбавляють (при перемішуванні на магнітній мішалці) п'ятьма обсягами попередньо охолодженою до 4°C ультрачистою водою 0,1 N соляною кислотою, доводять рН до 4,5. При температурі 4°C інкують розчин гібридного білка протягом 3 годин. В процесі інкубації утворюється осад, що містить гібридний білок, який відокремлюють центрифугуванням при 9000 об/хв протягом 30 хвилин [5].

Далі проводять ренатурацію гібридного білка. Осад зважують на терезах, при постійному перемішуванні розчиняють в подвійному обсязі по відношенню до ваги осаду ультрачистої води, $\text{pH} = 12$ (доводять однонормальним NaOH). Нерозчинний матеріал відокремлюють центрифугуванням при 9000 об/хв протягом 30 хв. До супернатанту додають 0,05 М гліцин- NaOH буфер з $\text{pH} = 10,8$ в кількості, необхідній для отримання концентрації білка 0,5 г/л. Розчин залишають при температурі 14°C на 14 годин [5].

3. тільця включення розчиняють в 12 мМ карбонатному (NaHCO_3) буфері (1:10), з 0,2 мМ ЕДТА, $\text{pH} 11,9$ (доводять 5 М NH_4OH). Перемішують 45 хв за кімнатної температури. Потім pH доводять до 10,8 за допомогою 2 М HCl [4].

Для ренатурації залишають на 18 год при постійному перемішуванні та аерації. Потім pH доводять до 9,0 за допомогою 2 М HCl [4].

Перевагою *першого* методу є висока ефективність, але рефолдинг є дорогим та вимагає спеціального обладнання. Такий варіант було б можливо роздивитись у випадку, якщо всі інші стадії не є дороговартісними, але в даному випадку це не так, тому немає сенсу використовувати такий спосіб.

Другий варіант не вимагає дорогого обладнання, реактиви є доступними, але процес тривалий та вимагає додаткової стадії кислотного осадження. Не є доцільним його використання, оскільки загалом виділення та очистка інсуліну є довгим процесом, збільшувати його тривалість не вигідно.

Третій спосіб є доволі простим, не вимагає спеціального обладнання, реактиви доступні та час проведення процесу не найшвидший, але оптимальний. Тому обираємо цей метод. Необхідності в спеціальному обладнанні немає, для розчинення та ренатурації використовуємо збірник. Центрифугу наведено в пункті 2 цього розділу. Параметри центрифугування: 4°C , 20 000 об/хв [4].

6.7.4. Обґрунтування стадій очищення інсуліну

Очищення інсуліну є найбільш важливою стадією процесу. Це зумовлено високою вибірковістю організму до готового лікарського препарату та можливими побічними реакціями.

Оскільки для перетворення попередника інсуліну в інсулін у промисловості використовують один метод – розщеплення гібридного білка трипсином з подальшим видаленням кінцевих аргінінів обробкою карбоксипептидазою В, обґрунтування цього процесу не потрібно. Але зважаючи на використання різних промислових методів очистки рекомбінантного інсуліну, вищеназані реакції описані в послідовності дій, які необхідні для отримання кінцевого продукту [4, 5, 7].

Згідно проведених науковцями досліджень, існує багато методів (послідовних стадій) очищення рекомбінантного інсуліну. Спільним та суттєво важливим в них є використання послідовно різних видів хроматографії, що є необхідним для очищення інсуліну від сторонніх білків [4, 5, 7].

Послідовність дій при використанні різних методів очистки зображена на *рис. 6.10*.

Метод 1	Метод 2	Метод 3
Спиртове осадження домішкових білків ↓ Хроматографія гібридного білка на КМ-сефарозі ↓ Розщеплення гібридного білка трипсином ↓ Хроматографія на СП-сефарозі ↓ Видалення кінцевих аргінінів обробкою карбоксипептидазою В ↓ ВЕРХ на обернених фазах ↓ Отримання висушеного інсуліну ↓ Очищення інсуліну методом гелі-фільтрації	Реакція цитраконсулатури ↓ Розщеплення трипсином ↓ Хроматографія низького тиску на DEAE-сефарозі ↓ Розбавлення ↓ Осадження інсуліну ↓ Розчинення солі цинку ↓ Хроматографія низького тиску на Q-сефарозі ↓ Реакція з карбоксипептидазою В ↓ RP-HPLC хроматографія ↓ Сефадекс G-25 хроматографія ↓ UHPLC хроматографія	Ферментативна конверсія ↓ Іонообмінна хроматографія ↓ Високоєфективна рідинна хроматографія

Рис. 6.10. Стадії очистки інсуліну різними методами

Оскільки більшість винайдених методів є дещо схожими за стадіями очищення та всі методи є дорогавартісними, визначними при виборі вважаємо ступінь очищення, тривалість процесу та кількість використовуваного обладнання.

Згідно першого методу [5]:

1. Спиртове осадження домішкових білків.

Однонормальною соляною кислотою доводять рН розчину до 7,5. До розчину додають ізопропанол для досягнення концентрації білку 40%. Суміш інкубують протягом 14 годин при температурі 4°C. Утворений осад відділяють центрифугуванням при 9 000 об/хв.

2. Хроматографія гібридного білка на КМ-сефарозі.

Супернатант піддають хроматографічній очистці на КМ-сефарозі. Колонку, що містить 30 мл КМ-сефарози, врівноважують 0,05 М тріс-гідрохлоридним буфером з рН = 7,5, з додаванням 1,5 М сечовини. Наносять на колонку розчин гібридного білка та промивають врівноважуючим буфером до досягнення базової лінії контрольного обладнання для детекції білків. Сорбований білок елюють з колонки додаванням 0,25 М хлориду натрію.

3. Розщеплення гібридного білка трипсином.

Вміст гібридного білка доводять ультрафільтрацією до 5 г/л, потім додають розчин трипсину в співвідношенні 600:1 гібридний білок:трипсин. Для зупинки реакції в розчин вносять трифтороцтову кислоту до значення рН = 3,85. Реакцію зупиняють при припиненні накопичення діаргінінінсуліна та збільшенні вмісту побічних продуктів.

4. Хроматографія на СП-сефарозі.

Розчин наносять на колонку, що містить 100 мл СП-сефарози ФФ, попередньо врівноважену 0,03 М амоній-ацетатним буфером з рН = 5,0 та з доданим 6 М сечовини. Промивають врівноважуючим буфером до досягнення базової лінії контрольного обладнання для детекції білків. Елюють лінійним градієнтом хлористого натрію від 0 до 0,5 М при швидкості потоку елюента 180 мл/год. Об'єднують фракції, що містять діаргінінінсулін без домішок дезтреонінінсуліну.

5. Видалення кінцевих аргінінів обробкою карбоксипептидазою В.

Об'єднаний матеріал концентрують методом ультрафільтрації до концентрації діаргінінінсуліна 1 г/л, сечовини 3 М, трис-НСІ буфер з рН = 7,85. Перетворення діаргінінінсуліна в інсулін досягається шляхом його розщеплення карбоксипептидазою В в співвідношенні 1:500 (кількість білка карбоксипептидази В:кількість білка діаргінінінсуліна). Для зупинки реакції під контролем рН-метра при безперервному перемішуванні в суміш додають 10% р-н трифтороцтової кислоти, доводячи рН до 3,85. Час зупинки реакції визначається від повного перетворення діаргінінінсуліна в інсулін, що перевіряють методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

6. ВЕРХ на обернених фазах.

Отриманий розчин інсуліну концентрують ультрафільтрацією до 8 г/л. Очищення інсуліну проводять на стандартному обладнанні для обернено-фазової рідинної хроматографії високого тиску. Для проведення робіт колонку "Діасорб" С16Т врівноважують водним розчином складом 10% ацетонітрилу та 0,1% трифтороцтової кислоти. Реєстрацію процесу поділу ведуть при 220 нм на проточному спектрофотометрі при чутливості приладу 0,1. Фракції інсуліну без домішок дезамідінсуліна використовують для подальшого очищення.

7. Видалення ацетонітрилу та висушування інсуліну.

Ацетонітрил видаляють шляхом випарювання на роторному випарнику, після чого препарат ліофільно висушують.

8. Очищення інсуліну методом гель-фільтрації.

Гель-фільтрацію проводять на колонці, що містить 0,25 л сефадексу G-50. Колонку попередньо врівноважують 1 М розчином оцтової кислоти. Препарат інсуліну людини розчиняють в 1 М оцтової кислоти доводячи до оптичної густини 90-100 од. при довжині хвилі 277 нм. За необхідності, якщо розчин інсуліну мутний, проводять коригування рН до 3,0 концентрованою оцтовою кислотою. Розчин інсуліну фільтрують через мембрану з розміром пор 0,22 мкм, потім вводять в верхню частину колонки зі швидкістю 4,8 мл/см²·год. Після введення розчину інсуліну в колонку подають елюент – 1 М розчин оцтової кислоти – з тією ж швидкістю. Реєструють піки випадіння білків в осад. Фракції білка об'єднують відповідно до хроматографічних

зон на вихідний кривій розподілу білків. В об'єднаній фракції, яка використовується як субстанція інсуліну, спектрофотометрично визначають вміст білка. Отриманий інсулін має чистоту 96%.

Переваги: доступність реагентів.

Недоліки: порівняно нижча чистота виділеного продукту, використання гел'єфільтрації ускладнює масштабування процесу, оскільки вимагає великих кількостей сорбенту, можуть бути наявні домішки небілкової природи, накопичення дезтріонінінсуліну через використання трипсину для розщеплення білку, необхідність спеціального обладнання.

Згідно другого методу [4]:

1. Реакція цитраконсулатури.

Попередник інсуліну обробляють цитраконовим ангідридом, щоб контролювати ферментативне розщеплення, необхідне для утворення інсуліну, і запобігати деградації інсуліну. 1 мл цитраконового ангідриду, 5 М NaOH додають порціями до розчину білка таким чином, щоб рН розчину залишався в діапазоні 8,7-9,3. Кількість ангідриду розраховують за формулою: розчин $0,2 \times V$ (дм) $\times A_{280}$ нм. Після додавання всієї кількості цитраконового ангідриду розчин перемішують протягом 2,5 годин. Потім додають 3 мл 2 М розчину етаноламіну. Кількість розраховують за формулою: $3 \times V$ цитраконовий ангідрид і перемішують протягом 45 хвилин.

2. Розщеплення трипсином.

рН утвореного розчину доводять до 8,8 2 М соляною кислотою і розбавляють так, щоб провідність була нижче 5 мСм. Додають 1% р-н трипсину, інкубують при перемішуванні 16-18 годин за кімнатної температури. Кількість трипсину розраховують за формулою: розчин A_{280} нм $\times V$ (дм) / 75. Реакцію інгібують за допомогою 1 мг/мл апротиніну. Кількість доданого апротиніну розраховують за формулою: $V_{\text{трип}} / 21$.

3. Хроматографія низького тиску на DEAE-сефарозі.

Зразок білка наносять на колонку, заповнену DEAE-сефарозою, врівноважують 0,5 М Тріс з рН 8,6, потім 20 мМ Тріс, рН 8,6, наносять зразок білка. Після нанесення

колонку промивають буферами: DW I 20 мМ Тріс з рН 8,6 і DW II - 20 мМ Тріс з рН 8,6 + 20% ізопропанол. Інсулін елюють буфером DE - 20 мМ Тріс, рН 8,6 + 30% ізопропанол.

4. Розбавлення.

Основну фракцію, елюйовану з колонки, розбавляють в 2 рази водою. рН знижують до 2,9 за допомогою 2 М хлоридною кислотою. Перемішують протягом 1 години, залишають при 4°C на ніч.

5. Осадження інсуліну.

До розчину додають 1 М розчин хлориду цинку і рН доводять до 5,9. Розчин перемішують протягом 1 години. Кількість доданого хлориду цинку розраховують за формулою: $2 \times V_p / 100$. Потім зразок центрифугують при 18 400 об/хв при 4°C.

6. Розчинення солями цинку.

Осад інсуліну суспендують у воді. Обсяг розраховують за формулою: загальна кількість білка, отриманого після DEAE / 7. Потім додають 1 М Тріс, рН 8,6 до концентрації 30 мМ і 0,2 М ЕДТА (кількість, розрахована за формулою: загальна кількість білка, отриманого після DEAE / 190). Провідність отриманого зразка нижче 3 мСм.

7. Хроматографія низького тиску на Q-сефарозі.

Зразок білка поміщають в колонку, заповнену Q-сефарозою, врівноважують 0,5 М Тріс з рН 8,6, а потім 20 мМ Тріс з рН 8,6. Після нанесення колонку промивають буферами: QW - 20 мМ Тріс з рН 8,6 + 20% ізопропанол. Білок елюють буфером QE1 – 20 мМ Тріс з рН 8,6 + 30% ізопропанол і буфером QE2 - 20 мМ Тріс з рН 8,6 + 30% ізопропанол.

8. Реакція з карбоксипептидазою В.

Основну фракцію елюйовану з колонки, розбавляють в 2 рази водою, додають карбоксипептидазу В (2,5 мг / мл) (10 мкл на кожні 150 АУ загального білка, певного в основний фракції). рН доводять до 8,8. Реакцію ведуть 16-18 год при кімнатній температурі.

9. RP-HPLC хроматографія.

Елюювання проводять на колонці ACE 5C18-300 з використанням градієнта ацетонітрилу. Рухома фаза А: 2000 мл 0,2 М розчину сульфату натрію з рН 2,3, попередньо нагрітого до 25-30°C з 440 мл ацетонітрилу з рН 2,3. Рухома фаза В 1250 мл 0,2 М розчину сульфату натрію з рН 2,3, попередньо нагрітого до 25-30°C з 1250 мл ацетонітрилу з рН 2,3. Основну фракцію елюють з колонки, розбавляють в 3 рази водою, інсулін осаджують хлоридом цинку.

10. Сефадекс G-25 хроматографія.

Осад інсуліну суспендують у воді, рН доводять до 3,0. Для заміни буфера зразок білка наносять на колонку, заповнену сефадексом G-25, врівноваженим 5 мМ ацетатом амонію, рН 4,0. Інсулін елюють тим же буфером.

11. UHPLC хроматографія.

Поділ зразків проводять з використанням системи Waters Acquity UHPLC з програмним забезпеченням Empower 3, оснащеної колонкою ACQUITY UPLC CSH C18. Поділ проводять при 23°C за швидкості потоку 0,713 мл/хв і спектрофотометричному детектуванні при 220 нм. Використовують градієнт двох буферів А1 і В1. Елюент А1 - 9,66 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ і 24,58 г $\text{NaClO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл води, рН 2,5. Елюент В1 - 9,66 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл води, рН 2,5, змішаний з ацетонітрилом 1:1 (об. : Про.). Ступінь очищення гібридного білка, визначений спектрофотометрично, складає ~ 98%.

Переваги: високий ступінь очищення інсуліну, реагенти, що використовуються, доступні.

Недоліки: багато стадій, довготривалий процес, необхідна велика кількість апаратів.

Згідно третього методу [7]:

1. Ферментативна конверсія.

Попередник інсуліну розчиняють 1:10 в 50 мМ Tris-гідрохлориду з рН 8,0. Інкують з трипсином (1:8000; вагове співвідношення) і карбоксипептидазою В (1:2000; вагове співвідношення) в присутності 1,5 мМ Zn^{2+} . Реакцію ведуть протягом 16 год. при 8°C

і зупиняють шляхом корекції рН до 2,5 за допомогою 6 М хлоридної кислоти. Інсулін осаджують за допомогою хлориду натрію з розрахунку 147,5 г на 1 л розчину.

2. Іонообмінна хроматографія.

Інсулін розчиняють в 19 л буферного розчину, який містить 50 мМ Tris-гідрохлорид, 1 мМ ЕДТА, 32% 2-пропанолу з рН 8,3. Розчин інсуліну фільтрують через 0,5 мкм фільтр і подають на колонку для іонообмінної хроматографії при швидкості потоку 300 мл/хв. Колонку попередньо заповнюють 19 л сорбенту M atrex PEI-300. Перед та після адсорбції інсуліну колонку відмивають двома обсягами буфера для врівноваження. Сорбент відправляють на регенерацію. Поліпептид елюють градієнтом (0-0,3 М) концентрацій хлориду натрію. Реєструють піки за допомогою двох детекторів. Фракції збирають в окремі ємності. Відбирають фракції в межах 0,1-0,2 М хлориду натрію.

3. Високоєфективна рідинна хроматографія.

Інсулін після іонообмінної хроматографії розчиняють при рН = 3,0 в розчині, який містить 0,05 М ацетату натрію та 10% 2-пропанолу. Отриманий розчин зі швидкістю 0,8 л/хв подають на фільтр з порами 0,2 мкм, а з нього на колонку, заповнену 19 л сорбенту Diasogel SP-120-20-ODS-AP. Попередньо колонку врівноважують 40 л буфера для нанесення (0,05 М натрію ацетату, 10% 2-пропанолу, рН = 3,0); цим же буферним розчином промивають колонку після нанесення інсуліну. Сорбент відправляють на регенерацію. Елюють інсулін лінійним градієнтом 2-пропанолу (10-28%). Реєструють піки за допомогою двох детекторів. Фракції збирають в окремі ємності. Придатні фракції об'єднують. Спектрофотометрично аналізують вміст інсуліну, він становить не менше 98-99%.

Переваги: мала кількість стадій виділення та очищення, відсутня необхідність обробки цитраконовим ангідридом перед ферментативною конверсією, трипсиноліз відбувається при підвищених значеннях рН, що підвищує вихід інсуліну, порівняно найчистіший продукт, доступність реагентів.

Недоліки: необхідні великі об'єми реагентів.

Проаналізувавши описані методи очищення інсуліну, робимо висновок, що найкращим варіантом буде використання третього методу [7], зважаючи на його великі переваги перед іншими методами.

Для процесу необхідне обладнання – збірники, фільтрувальні системи і хроматографи: рідинний та іонообмінний.

Для фільтрування використовуємо пілотну систему для мікрофільтрації УФ-201. Вона забезпечує високу швидкість проходження процесу, високу ефективність та дає змогу використовувати різні мембрани [35].



Рис. 6.11. Пілотна система для мікрофільтрації УФ-201

Технічні характеристики системи наведено в таблиці [35]:

Таблиця 6.13

Технічні характеристики пілоотної системи для мікрофільтрації УФ-201

параметри	значення
Швидкість подачі	До 37.85 л/хв
Температура корпусу	до +60°C
Габарити	749.3 × 548.6 × 1300 мм
Тиск в апараті	50 psi (3,5 атм)
Вага	200 кг

Згідно <https://russian.alibaba.com> систему для мікрофільтрації можна придбати за 3 000 доларів.

Іонообмінну хроматографію здійснюємо за допомогою рідинного хроматографа середнього тиску ÄKTA pure 150 M, представленого на *рис. 6.12.а*. Він ефективно розділяє білки та оснащений всіма необхідними пристроями. Система гнучка та дозволяє підлаштовувати прилад під вимоги, так чином підходячи для різних видів хроматографічного розділення, в тому числі для іонообмінної хроматографії [36].

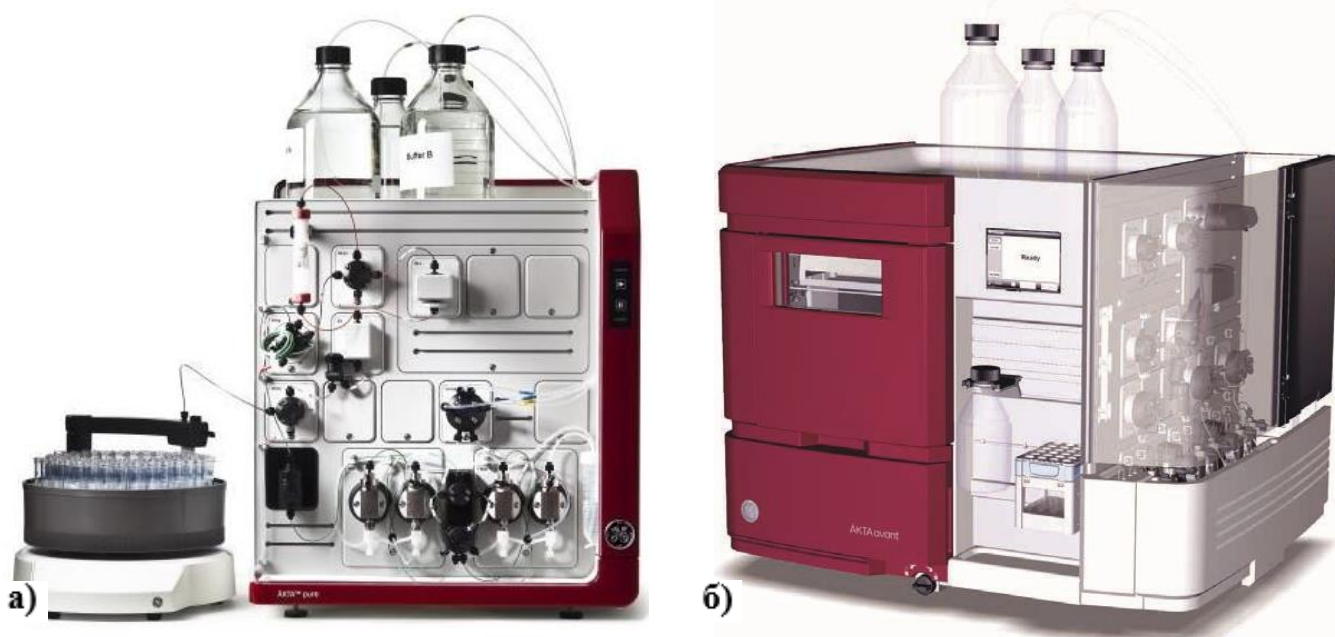


Рис. 6.12. Хроматограф ÄKTA pure 150 M

Технічні характеристики ÄKTA pure 150 M наведено в таблиці [36, 37]:

Таблиця 6.14

Технічні характеристики хроматографа ÄKTA pure 150 M

параметри	значення
Швидкість потоку	0,01 – 300 мл/хв
Тиск	до 5 МПа
pH	0 – 14
Потужність	До 250 Вт
Габарити	535 × 470 × 629 мм
Вага	53 кг

Принцип дії іонних хроматографів заснований на поділі іонів, що містяться в аналізованій пробі, на хроматографічній колонці та подальшому їх детектуванні. Рідинний хроматограф ÄKTA pure 150 M забезпечує високу швидкість процесу завдяки можливості використання колонок для промисловості. При цьому, його обладнано захисним кожухом, загальний вигляд апарата в ньому представлений на *рис. 6.12.б*. Підходить для обладнання всіма необхідними датчиками та додатковими елементами [37].

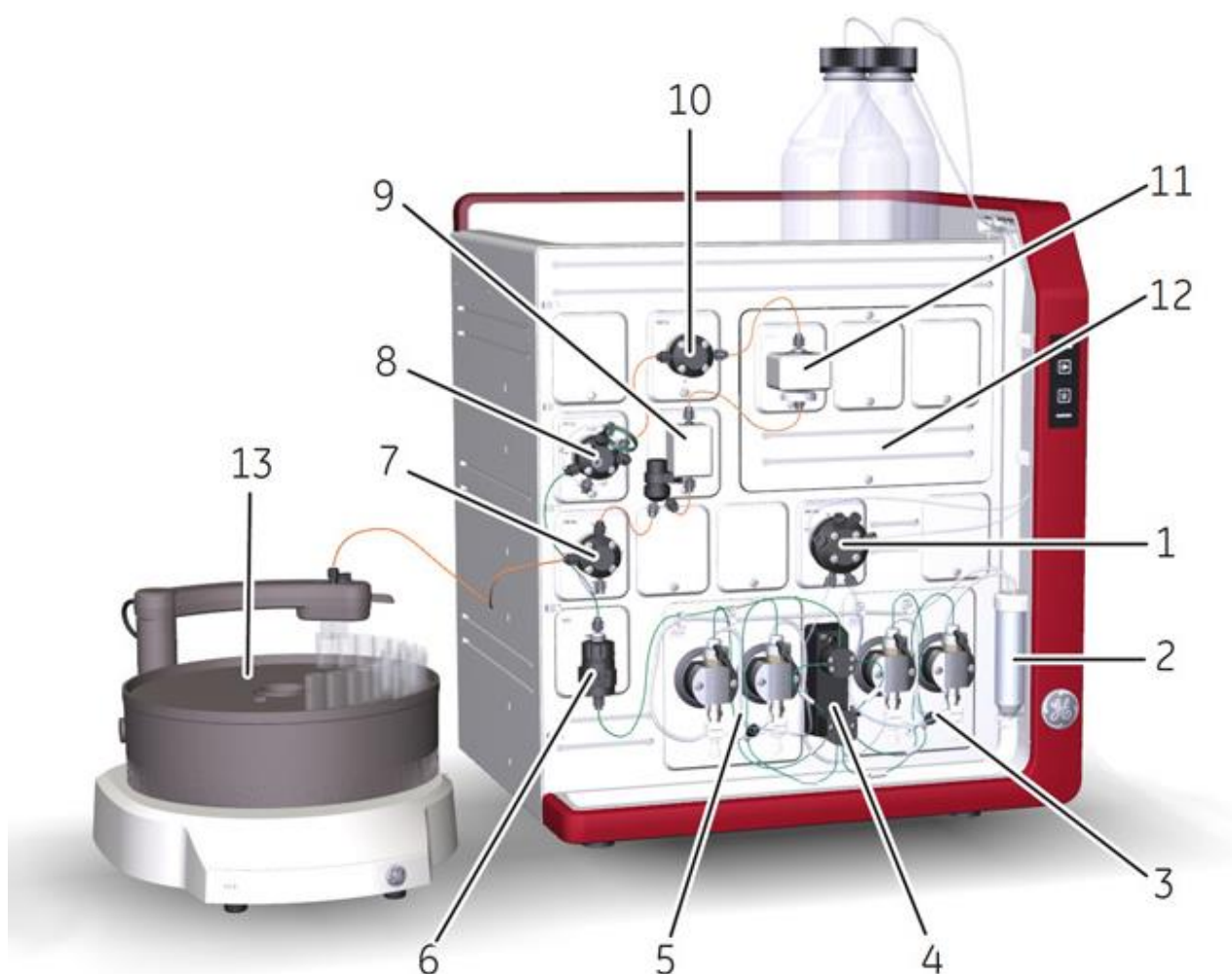


Рис. 6.13. Схема проходження іонообмінної хроматографії на ÄKTA pure 150

Схема процесу наступна: через насос 3 сорбент подається на колонку 6, після нього насосом 5 подається проба. Елюент додається через насос вприскування 8, 10. Суспензія проходить через ультрафіолетовий детектор 11, а потім через детектор точки випадіння 9. Після цього білки попадають в фракційну камеру 13, де кожна фракція розфасовується по окремим ємностям [38].

При цьому, вигляд приладу може відрізнятись від наведеного в залежності від потреби та масштабності. Можлива установка до десяти колонок, в яких адсорбція та елюювання будуть проходити паралельно. Це дозволяє прискорити та масштабувати процес [38].

Згідно <https://russian.alibaba.com> приблизна ціна іонного хроматографа становить 15 000 доларів.

Обираємо рідинну хроматографічну систему Prochrom Varicol 6-150 [39].

Пілотна хроматографічна система Prochrom Varicol 6-150 призначена для безперервного розділення білків. Особливість будови полягає у використанні кількох послідовно розташованих колон. Будова колони представлена на *рис. 6.14.а*, будова системи – на *рис. 6.14.б* [39].

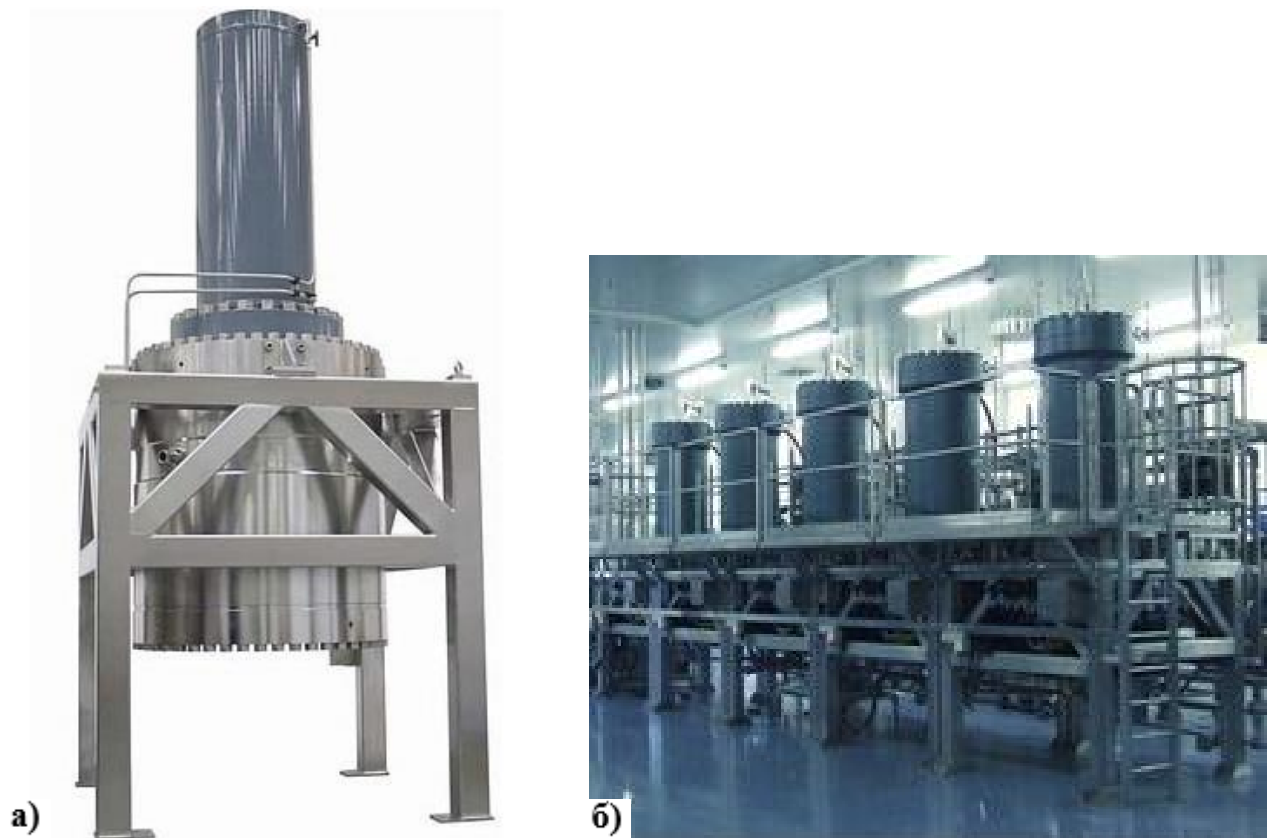


Рис. 6.14. Хроматографічна система Prochrom Varicol 6-150

Технічні характеристики системи наведені в таблиці [39]:

Технічні характеристики Prochrom Varicol 6-150

параметри	значення
Продуктивність	10 – 200 кг/тиждень
Тиск	50 – 100 бар
Температура	+15 – +50°C
Діаметр колони	110 – 150 мм
Кількість колон	5-6 шт
Габарити (Ш×В×Г)	200 × 200 × 100 см
Вага	500 кг

У багатоколонній безперервній хроматографії одна довга колона замінена послідовно встановленими 4-6 коротшими колонами, оптимізуючи тим самим використання нерухомої фази. У них відбувається збір тільки чистих фракцій; залишені змішані фракції повторно циркулюють через колони [40].

Схема процесу подібна до іонообмінного хроматографа. Різниця полягає в тому, що установка призначення для обладнання декількох колон, процес в кожній з яких індивідуальний та проходять процеси паралельно. Тобто таким чином швидкість розділення прискорюється в степені, що дорівнює кількості колон [40].

Згідно <https://russian.alibaba.com> середня ціна рідинного хроматографа для ВЕРХ становить 20 000 доларів.

6.7.5. Обґрунтування стадії сушіння інсуліну

Цільовим готовим продуктом є субстанція, тому останньою стадією отримання готового продукту є сушіння. Вибір сушарки залежить від характеристик інсуліну, а саме від відношення білку до температури.

Зазначимо, що сушіння та пакування інсуліну проходять один раз після завершення всіх циклів виробництва. Це пов'язано з тим, що малі обсяги продукції за цикл – 0,32 кг недоцільно розфасовувати окремо, оскільки це вимагає більших енерговитрат та часу. Елюйований білок відправляється у холодильник, де зберігається при -30°C до сушіння.

Інсулін – термолабільний білок, при температурі вище 35°C інактивація інсуліну прискорюється. Тому оптимальним варіантом є використання сублімаційної (ліофільної) сушарки.

Принцип дії ліофільної сушарки полягає в заморожування продукту та подальшому видаленні льоду випарюванням під вакуумом, мінаючи при цьому рідку фазу [8].

Обираємо промислову поличну ліофільну сушарку LP50R. Зовнішній вигляд зображено на *рис. 6.15* [41].



Рис. 6.15. Ліофільна сушарка LP50R

Технічні характеристики відповідають всім вимогам, представлені в таблиці [41]:

Технічні характеристики ліофільної сушарки LP50R

параметри	значення
Місткість	60 л
Температура	-40 – +75°C
Об'єм конденсатора	50 л
Загальна площа полиць	2,8 м ²
Кількість полиць	7 шт
Габарити полиць	800 × 800 мм
Габарити камери	800 × 800 × 20 мм
Вакуумний насос	Edwards 841 л/хв

Заморожування матеріалу відбувається за температури -20 – -30°C, важливим є час проходження процесу, оскільки при швидкій заморозці структура білку руйнується [31].

Згідно <https://russian.alibaba.com> приблизна ціна ліофільної сушарки становить 5 000 доларів.

6.7.6. Обґрунтування стадії фасування порошку інсуліну

Процес пакування має велике значення для збереження якості препарату. Універсальним пакувальним матеріалом є пластикові тари, зокрема банки (рис. 6.16). Він задовольняє вимоги зберігання інсуліну: водонепроникний, має високу хімічну стійкість, малу проникність для газів, високу ударну міцність, тривалість зберігання якості продукту, гігієнічність, не впливає на властивості продукту [42].

При використанні пластикових банок для пакування можливо стерилізувати розфасовану продукцію гамма променями, оскільки пластик гарно їх пропускає. Такі банки дадуть змогу зберігати субстанцію довгий час та зберегти якість і чистоту інсуліну.



Рис. 6.16. Пластикові банки для пакування

Згідно <https://russian.alibaba.com> ціна плівки становить 0,5 долара за 1 шт.

Фасування проходить у фасувальній машині для сипучих продуктів в пластикові банки по 0,5 кг. Зазначимо, що отриманий після сушіння порошок не потребує проходження через млин та сита, оскільки порошок відправляється на інші підприємства, які вже доводять частинки до необхідних їм розмірів для виготовлення суспензії.

Обираємо фасувальну вібраційну машину виробництва НВП “Техноаги” [43]. Загальний вигляд апарату наведено на *рис. 6.17*. Фасування проходить наступним чином: спочатку оператор розташовує порожній пакет під приймальну лійку, дає команду подачі готової дози продукту, забирає повний пакет та знову підставляє порожній.

Технічні характеристики фасувальної машини наведено в таблиці [43]:

Таблиця 6.17

**Технічні характеристики
фасувальної машини**

параметри	значення
Маса дози	2 – 500 г
Дискретність	0,1 г
Дозування	вагове
Продуктивність	До 10 уп/хв
Вага	250 кг

Згідно <https://russian.alibaba.com> ціна фасувального апарату складає 4 000 доларів.

Через те, що інсулін є продуктом фармацевтичної промисловості, його субстанція має бути стерильною. Для досягнення такої чистоти необхідні асептичні умови всього процесу або стерилізація готового продукту. Забезпечити 100% асептику під час всього



**Рис. 6.17. Фасувальна
машина**

виробництва майже неможливо, тому така ціль не ставилась. Для стерилізації готового запакованого продукту – порошку інсуліну використовуємо гамма-випромінювання.

Принцип дії випромінювання полягає в передачі енергії гамма-променів на електрони молекул продукту. При цьому утворюються високоактивні радикали, які руйнують ДНК мікроорганізмів. Таким чином препарат стає стерильним [15].

Для стерилізації обираємо електронно-променевий стерилізатор ЕЛС-900. Він підходить для стерилізації запакованих матеріалів та зберігає механічні властивості упаковки та матеріалів. Будова зображена на *рис. 6.18* [44].



Рис. 6.18. Електронно-променевий стерилізатор ЕЛС-900

Технічні характеристики стерилізаційної шафи наведено в таблиці [44]:

Таблиця 6.18

Технічні характеристики стерилізатора ЕЛС-900

параметри	значення
Середня енергія прискорених електронів	3 МеВ
Потужність	12 кВт
Габарити камери	600 × 300 × 100 мм
Габарити (В × Ш × Д)	1200 × 800 × 2100 мм
Вага	2500 кг

Середня ціна апарату складає 10 000 доларів згідно <https://russian.alibaba.com>.

Таким чином, процес виділення та очищення інсуліну оптимізовано.

Тож, окрім стадій підготовки поживного середовища, мають бути також додаткові стадії:

1. приготування розчину миючого засобу для обладнання (в збірнику).
2. приготування розчинів HCl для підкислення середовища на доферментаційних та післяферментаційних стадіях.
3. приготування та стерилізація (фільтрування) розчинів NH_4OH для стабілізації рН середовища на доферментаційних та післяферментаційних стадіях.
4. приготування та стерилізація підживлюючих розчинів, що складаються окремо з 40% розчину глюкози та 50% проліну. Режим стерилізації: 112°C , 30 хв.
5. приготування та стерилізація концентрованого розчину мікроелементів (1 л) в колбі на 2 л для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках, посівному апараті на 10 л та виробничому ферментері на 100 л.
6. приготування та стерилізація концентрованого розчину тіаміну (100 мл) в колбі на 250 мл для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках та посівному апараті на 10 л. Режим стерилізації: 100°C , 30 хв.
7. підготовка компонентів буферних розчинів шляхом розведення необхідної їх кількості в колбах водою.
8. підготовка розчину хлориду натрію для елюювання інсуліну під час іонообмінної хроматографії.
9. підготовка розчинів для промивання колонок хроматографії перед та після власне хроматографією.

Для виробництва необхідно також мати два збірники для розведення органічних компонентів на 10 л та 30 л відповідно та два збірники для підготовки підживлюючого розчину на 30 л кожний. Необхідні два збірники по 50 л кожний для зберігання в них сорбентів для хроматографічної очистки, два збірники по 600 л кожний для приготування та зберігання елюентів. Для розчинення перед гомогенізацією необхідний збірник об'ємом 50 л, на розведення на подальших стадіях необхідні 6 збірників по 30 л кожний.

Для виробництва інсуліну знадобиться наступне обладнання:

- збірник – 16 шт.
- ферментер 100 л – 1 шт.
- високошвидкісна центрифуга з охолодженням – 4 шт.
- гомогенізатор – 1 шт.
- фільтрувальна система – 2 шт.
- хроматографічна система – 2 шт.
- ліофільна сушарка – 1 шт.
- фасувальна машина – 1 шт.
- електронно-променевий стерилізатор – 1 шт.

РОЗДІЛ 7. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДИН ЦИКЛ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

Проаналізувавши потреби цільового продукту в техніко-економічному розрахунку, кількість інсуліну на рік для забезпечення 10% хворих на цукровий діабет 1 типу складає $G_{нд} = 12,84$ кг. Таку кількість гормону необхідно отримати за $T_{рд} = 60$.

Відомо, що максимальна продуктивність біосинтезу інсуліну – $P_{кр} = 14,5$ г/л за 20 год культивування бактерії *Escherichia coli* 20 ІВА 1 на заданому середовищі (г/л):

- Глюкоза – 109,42;
- Глутамінова кислота – 1,0;
- Манітол - 10,0;
- K_2HPO_4 - 1,0;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2;
- $CaCl_2$ - 0,04;
- Пролін – 149,9;

Мікроелементи:

- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,0025;
- H_3BO_3 - 0,00001;
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,00001;
- $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ - 0,00001;
- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00001;
- $MnCl_2$ - 0,001;
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,00001;

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ								
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.		Ткачова В. І.			РОЗДІЛ 7. ПРОДУКТОВИЙ РОЗРАХУНОК, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДИН ЦИКЛ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ, РОЗРАХУНОК ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ				Лім.	Арк.	Акрушів		
Перевір.		Скороцька О. І.									97	34	
Реценз.									Кафедра БТМ				
Н. Контр.													
Затверд.		Пирог Т. П.											

- Біотин - 0,00001;
- Тіамін - 0,0001.

Зазначимо, що на етапах підготовки посівного матеріалу не використовується глюкоза, додається тетрациклін – 0,1 г/л, використовується менша концентрація проліну – 0,6 г/л та додатково додається тіамін – 0,002 г/л.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні показники:

1. Вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{гп}$ повинен складати не менше 95%;
2. час циклу роботи ферментера $T_{цф} = 47$ год відповідно до загального часу на виділення та очистку інсуліну, оскільки це більше за виробничий біосинтез (20 год) та підготовку ферментера (10 год);
3. коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій – 1,1-1,5) $K_1 = 1,1$;
4. коефіцієнт заповнення ферментера, частка, (0,5-0,7), прийmemo $K_{зф} = 0,6$;
5. коефіцієнт заповнення посівного апарату, частка $K_{па} = 0,6$;
6. коефіцієнт заповнення інокуляту, частка – 0,6;
7. коефіцієнт заповнення збірника, частка (0,7-0,8), $K_{зб} = 0,7$;
8. сумарні втрати при виділенні готового продукту (сума всіх втрат на стадіях виділення готового продукту), частка $E_{св} = 0,4$;
9. кількість посівного матеріалу для виробничих ферментерів, частка (0,05-0,1) $X_{ф} = 0,1$;
10. кількість посівного матеріалу для посівних апаратів, частка (0,02-0,1) $X_{па} = 0,1$;
11. кількість посівного матеріалу для інокуляторів, частка (0,02-0,1) $X_{ін} = 0,1$;
12. кількість посівного матеріалу для качалочних колб, частка (0,02-0,1) $X_{кол} = 0,1$;
13. втрати культуральної рідини при біосинтезі, частка (0,1-0,2) $E_{ф} = 0,1$;
14. втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в посівних апаратах, частка (0,1-0,2) $E_{па} = 0,1$;
15. втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в інокуляторах, частка (0,05-0,1) $E_{ін} = 0,1$;
16. втрати посівного матеріалу у процесі його культивування в колбах, частка (0,01-0,02) $E_{кол} = 0,01$.

7.1. Розрахунок партій продукту (виробничих циклів)

Кількість продукту на добу:

$$G_{\text{нтд}} = G_{\text{нт}} / T_{\text{рд}} = 12,84 / 60 = 0,214 \text{ кг/добу.}$$

Кількість продукту за цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{пд}} \times T_{\text{цф}} / 24 = 0,214 \times 47 / 24 = 0,419 \text{ кг/цикл.}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один цикл з урахуванням втрат за виробничий цикл ($E_{\text{св}}$):

$$V_{\text{кр}} = K_1 \times G_{\text{цк}} \times \text{CP}_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \times 0,419 \times 0,95 / 14,5 (1 - 0,4) = 0,05 \text{ м}^3 = 50 \text{ л.}$$

Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / G_{\text{цк}} = 12,84 / 0,419 = 30,6 = 31 \text{ цикл.}$$

7.2. Приготування та стерилізація поживних середовищ для виробничого культивування та вирощування посівного матеріалу

7.2.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу

Кількість поживного середовища (ПС) та посівного матеріалу (ПМ) в ферментері до культивування становить:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 50 / (1 - 0,1) = 56 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в ферментері:

$$V_{\text{псф}} = V_{\text{ф}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 56 / (1 + 0,1) = 51 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву ферментера:

$$V_{\text{пмф}} = V_{\text{ф}} - V_{\text{пс}} = 56 - 51 = 5 \text{ л.}$$

При вибраному коефіцієнті заповнення ферментера $K_3 = 0,6$ його приблизний геометричний об'єм ферментера складе $V_{\text{гф}} = V_{\text{ф}} / K_3 = 56 / 0,6 = 93 \text{ л.}$ За таблицею обираємо ферментер об'ємом 100 л.

7.2.2. Визначаємо кількість стадій вирощування посівного матеріалу

Оскільки кількість посівного матеріалу становить $X_{\text{ф}} = X_i = X_{\text{колб}} = 0,1\%$ від кількості поживного середовища визначаємо кількість посівного матеріалу для інших стадій. Приблизна кількість посівного матеріалу для інших стадій становитиме:

Посівний матеріал з інокулятора геометричним об'ємом $V_{\text{ін}} = 10$ л.

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{пмф}} / K_3 = 5 / 0,6 = 8,3 \text{ л.}$$

Обираємо інокулятор геометричним об'ємом 10 л.

Посівний матеріал з качалочних колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{пмф}} \times X_{\text{ін}} = 5 \times 0,1 = 0,5 \text{ л.}$$

$$n_{\text{колб}} = V_{\text{пмк}} / V_{\text{колб}} \times K_{3\text{колб}} = 0,5 / 0,75 \times 0,2 = 3,3 = 4 \text{ колби.}$$

Отже, підготовка посівного матеріалу включатиме 2 стадії.

7.2.3. Приготування та стерилізація мікроелементів для стадій підготовки посівного матеріалу та для виробничого біосинтезу

Враховуючи, що мікроелементи містяться у дуже малих кількостях та деякі з них потребують особливих умов стерилізації (холодна стерилізація), вони готуються окремо концентрованим розчином та додаються після стерилізації поживного середовища. Концентрація мікроелементів: 2,5 г/л $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 мг/л H_3BO_3 , 10 мг/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 мг/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 мг/л $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 г/л MnCl_2 , 10 мг/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 мг/л біотин та 0,1 г/л тіамін для культивування в колбах на качалці, посівному апараті на 10 л та виробничому ферментері на 100 л. Окремо в таблиці наводимо їх кількість при приготуванні середовищ різних об'ємів (табл. 7.1).

Таблиця 7.1

Розрахунок вмісту мікроелементів в різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	H_3BO_3	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	MnCl_2	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Біотин	Тіамін
0,45	1,1 мг	4,5 мкг	4,5 мкг	4,5 мкг	4,5 мкг	0,45 мг	4,5 мкг	4,5 мкг	45 мкг
5,1	12,8 мг	51 мкг	51 мкг	51 мкг	51 мкг	5,1 мг	51 мкг	51 мкг	0,51 мг
51	128 мг	0,51 мг	0,51 мг	0,51 мг	0,51 мг	51 мг	0,51 мг	0,51 мг	5,1 мг

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм розчину мікроелементів:

$$G_M = V \times C_{\Sigma M} = 1 \times 3,67 = 3,67 \text{ г}$$

Для стерилізації використовують колбу. Виходячи з цього, кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{BM} = V_{OM} - G_M = 1000 - 3,67 = 996 \text{ мл.}$$

Об'єм розчину мікроелементів для додавання при культивуванні в виробничому ферментері:

$$V_M = V_B \times (C_M / C_{\Sigma M}) = 996 \times (0,187 / 3,67) = 51 \text{ мл.}$$

Об'єм розчину мікроелементів для додавання при культивуванні в інокуляторі:

$$V_M = V_B \times (C_M / C_{\Sigma M}) = 996 \times (0,0188 / 3,67) = 5 \text{ мл.}$$

Об'єм розчину мікроелементів для додавання при культивуванні в колбах на качалці:

$$V_M = V_B \times (C_M / C_{\Sigma M}) = 996 \times (0,0016 / 3,67) = 0,43 \text{ мл.}$$

7.2.4. Приготування та стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері геометричним об'ємом 100 л

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера:

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища:

$$G_{\Phi} = V_{\text{псф}} \times C_{\Sigma \Phi} = 0,051 \times 271,56 = 13,85 \text{ кг, в тому числі покомпонентно, кг:}$$

$$\text{Глюкоза } G_1 = G_{\Phi} \times (C_1 / C_{\Sigma \Phi}) = 13,85 \times (8 / 271,56) = 0,408$$

$$\text{Глюкоза (підживлення) } G_{1.1} = G_{\Phi} \times (C_{1.1} / C_{\Sigma \Phi}) = 13,85 \times (101,42 / 271,56) = 5,173$$

$$\text{Глутамінова кислота } G_2 = G_{\Phi} \times (C_2 / C_{\Sigma \Phi}) = 13,85 \times (1 / 271,56) = 0,051$$

$$\text{Манітол } G_3 = G_{\Phi} \times (C_3 / C_{\Sigma \Phi}) = 13,85 \times (10 / 271,56) = 0,51$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ } G_4 = G_{\Phi} \times (C_4 / C_{\Sigma \Phi}) = 13,85 \times (1 / 271,56) = 0,051$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } G_5 = G_{\Phi} \times (C_5 / C_{\Sigma \Phi}) = 13,85 \times (0,2 / 271,56) = 0,01$$

$$\text{CaCl}_2 \text{ } G_6 = G_{\Phi} \times (C_6 / C_{\Sigma \Phi}) = 13,85 \times (0,04 / 271,56) = 0,002$$

$$\text{Пролін (підживлення) } G_7 = G_{\Phi} \times (C_7 / C_{\Sigma \Phi}) = 13,85 \times (149,9 / 271,56) = 7,645$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для виробничого ферментера:

Кількість води, що необхідна для поживного середовища визначають за такою формулою $V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}}$, де $V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \times K_{\text{кон}}$ – розбавлення виробничого поживного середовища конденсатом пари при його стерилізації, $K_{\text{кон}}$ – частка конденсату у загальній кількості води, що йде на приготування поживного середовища.

В залежності від способу та обладнання, яке використовують для стерилізації компонентів поживного середовища, величина $K_{\text{кон}}$:

- якщо стерилізація проходить в колбах на качалці, то $K_{\text{кон}} = 0$;
- у разі стерилізації компонентів поживного середовища у реакторі-змішувачі або у ферментері $K_{\text{кон}} = 0,1-0,15$;
- при стерилізації компонентів в УБС $K_{\text{кон}} = 0,2$.

Якщо об'єм поживного середовища у ферментері (без конденсату) складає $V_{\text{пс}} = 45,9$ л, приймаємо рішення щодо використання для стерилізації реактора-змішувача та ферментера.

Тоді кількість конденсату становитиме:

$$V_{\text{фк}} = V_{\text{псф}} \times K_{\text{кон}} = 51 \times 0,1 = 5,1 \text{ л.}$$

Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{псф}} - G_{\text{ф}} - V_{\text{фк}} = 51 - 13,85 - 5,1 = 32,05 \text{ л.}$$

Формування композицій А, В, С наведено у таблиці 3.2. Для виробничого культивування в ферментері також використовується підживлюючий розчин, який виноситься в окрему композицію. Також враховуються мікроелементи, які входять в склад поживного середовища. На мікроелементи припадає 51 мл, тоді на інші компоненти: $32,05 - 0,051 = 32$ л.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, л:

$$\text{Глюкоза } V_{1\text{в}} = V_{\text{в}} \times (C_1 / C_{\Sigma\text{п}}) = 32 \times (8 / 271,56) = 0,942$$

$$\text{Глюкоза (підживлення) } V_{1.1\text{в}} = V_{\text{в}} \times (C_{1.1} / C_{\Sigma\text{п}}) = 32 \times (101,42 / 271,56) = 11,95$$

$$\text{Глутамінова кислота } V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} \times (C_2 / C_{\Sigma\text{п}}) = 32 \times (1 / 271,56) = 0,118$$

$$\text{Манітол } V_{3\text{в}} = V_{\text{в}} \times (C_3 / C_{\Sigma\text{п}}) = 32 \times (10 / 271,56) = 1,18$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ } V_{4\text{в}} = V_{\text{в}} \times (C_4 / C_{\Sigma\text{п}}) = 32 \times (1 / 271,56) = 0,118$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } V_{5\text{B}} = V_{\text{B}} \times (C_5 / C_{\Sigma\text{П}}) = 32 \times (0,2 / 271,56) = 0,023$$

$$\text{CaCl}_2 V_{6\text{B}} = V_{\text{B}} \times (C_6 / C_{\Sigma\text{П}}) = 32 \times (0,04 / 271,56) = 0,004$$

$$\text{Пролін (підживлення) } V_{7\text{B}} = V_{\text{B}} \times (C_7 / C_{\Sigma\text{П}}) = 32 \times (149,9 / 271,56) = 17,664$$

$$V_{\text{M}} = 51 \text{ мл} = 0,05$$

Всього: 32,05 л.

Таблиця 7.2

Композиції для стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 51 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	8	0,408	A	3,209
Вода		0,942		
Глутамінова кислота	1	0,051		
Вода		0,118		
Манітол	10	0,51		
Вода		1,18		
K ₂ HPO ₄	1	0,051	B	0,208
Вода		0,118		
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2	0,01		
Вода		0,023		
CaCl ₂	0,04	0,002		
Вода		0,004		
P-н мікроелементів		0,051	C	0,051
Конденсат		0,4		0,4
Разом:		3,868		3,868

Композиції для стерилізації підживлюючих розчинів для виробничого біосинтезу в ферментері

Компонент підживлюючого розчину	Вміст, г/л	Кількість для приготування 51 л середовища, г (мл)	Об'єм композиції, V, л
Глюкоза	101,42	5,173	17,123
Вода		11,95	
Пролін	149,9	7,645	25,309
Вода		17,664	
Конденсат		4,7	4,7
Разом:		47,132	47,132

7.2.5. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 10 л

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становить:

$$V_{\text{ін}} = V_{\text{пмф}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5 / (1 - 0,1) = 5,6 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в інокуляторі:

$$V_{\text{псін}} = V_{\text{ін}} / (1 + X_{\text{ф}}) = 5,6 / (1 + 0,1) = 5,1 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву посівного апарату:

$$V_{\text{пмін}} = V_{\text{ін}} - V_{\text{псін}} = 5,6 - 5,1 = 0,5 \text{ л.}$$

Розрахунок кількості компонентів поживного середовища виробничого ферментера:

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища:

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{псін}} \times C_{\Sigma\text{п}} = 5,1 \times 12,942 = 66 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Тетрациклін } G_1 = G_{\text{ін}} \times (C_1 / C_{\Sigma\text{п}}) = 66 \times (0,1 / 12,942) = 0,51$$

$$\text{Глутамінова кислота } G_2 = G_{\text{ін}} \times (C_2 / C_{\Sigma\text{п}}) = 66 \times (1 / 12,942) = 5,1$$

$$\text{Манітол } G_3 = G_{\text{ін}} \times (C_3 / C_{\Sigma\text{п}}) = 66 \times (10 / 12,942) = 51$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ } G_4 = G_{\text{ін}} \times (C_4 / C_{\Sigma\text{п}}) = 66 \times (1 / 12,942) = 5,1$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } G_5 = G_{\text{ін}} \times (C_5 / C_{\Sigma\text{п}}) = 66 \times (0,2 / 12,942) = 1,02$$

$$\text{CaCl}_2 G_6 = G_{\text{ін}} \times (C_6 / C_{\Sigma\text{п}}) = 66 \times (0,04 / 12,942) = 0,2$$

$$\text{Пролін } G_7 = G_{\text{ін}} \times (C_7 / C_{\Sigma\text{п}}) = 66 \times (0,6 / 12,942) = 3,06$$

$$\text{Тіамін } G_8 = G_{\text{ін}} \times (C_8 / C_{\Sigma\text{п}}) = 66 \times (0,002 / 12,942) = 0,01$$

$$\text{Визначаємо кількість конденсату } V_{\text{інк}} = V_{\text{псін}} \times K_{\text{кон}} = 5,1 \times 0,1 = 0,51 \text{ л.}$$

Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{він}} = V_{\text{псін}} - G_{\text{ін}} - V_{\text{інк}} = 5,1 - 0,066 - 0,51 = 4,524 \text{ л.}$$

Формування композиції А, В, С, D наведено у таблиці 3.3. Розчин тетрацикліну не враховується при складанні композицій для стерилізації, оскільки він закуповується стерильним розчином концентрацією 10 г/л. На нього враховується $990 \times (0,51 / 10) = 50,5$ мл води. Також враховуються мікроелементи, які входять в склад поживного середовища. На мікроелементи припадає 5,12 мл, тоді на інші компоненти: $4\,524 - 5 - 50 = 4,469$ л.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{Тетрациклін } V_{1\text{в}} = 50$$

$$\text{Мікроелементи } V_{\text{м}} = 5$$

$$\text{Глутамінова кислота } V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2 / C_{\Sigma\text{п}}) = 4\,469 (1 / 12,842) = 348$$

$$\text{Манітол } V_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3 / C_{\Sigma\text{п}}) = 4\,469 (10 / 12,842) = 3\,479$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 V_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4 / C_{\Sigma\text{п}}) = 4\,469 (1 / 12,842) = 348$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } V_{5\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5 / C_{\Sigma\text{п}}) = 4\,469 (0,2 / 12,842) = 70$$

$$\text{CaCl}_2 V_{6\text{в}} = V_{\text{в}} (C_6 / C_{\Sigma\text{п}}) = 4\,469 (0,04 / 12,842) = 14$$

$$\text{Пролін } V_{7\text{в}} = V_{\text{в}} (C_7 / C_{\Sigma\text{п}}) = 4\,469 (0,6 / 12,842) = 209$$

$$\text{Тіамін } V_{8\text{в}} = V_{\text{в}} (C_8 / C_{\Sigma\text{п}}) = 4\,469 (0,002 / 12,842) = 1$$

Всього: 4 524 мл.

Таблиця 7.4

**Композиції для стерилізації поживного середовища для вирощування
інокуляту в посівному апараті**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,1 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глутамінова кислота	1	5,1	A	4 095,16
Вода		348		
Манітол	10	51		
Вода		3 479		
Пролін	0,6	3,06		
Вода		209		
K ₂ HPO ₄	1	5,1	B	438,32
Вода		348		
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2	1,02		
Вода		70		
CaCl ₂	0,04	0,2		
Вода		14		
Тіамін	0,002	0,01	C	1,01
Вода		1		
Р-н мікроелементів		5	D	5
Тетрациклін	0,1	0,51	Не стерилізується	50,51
Вода		50		
Конденсат		510		510
Разом:		5 100		5 100

**7.2.6. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування
інокуляту в колбах на качалці**

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу в колбах становить:

$$V_{\text{кол}} = V_{\text{пмін}} = 0,5 \text{ л.}$$

Кількість поживного середовища в колбах:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{кол}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 0,5 / (1 + 0,1) = 0,45 \text{ л.}$$

Необхідна кількість посівного матеріалу для засіву колб:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{кол}} - V_{\text{пск}} = 0,5 - 0,45 = 0,05 \text{ л} = 50 \text{ мл.}$$

Загальні витрати компонентів на визначений об'єм поживного середовища

$$G_{\text{к}} = V_{\text{пск}} \times C_{\Sigma\text{п}} = 0,45 \times 12,942 = 5,824 \text{ г, в тому числі покомпонентно, г:}$$

$$\text{Тетрациклін } G_1 = G_{\text{к}} \times (C_1 / C_{\Sigma\text{п}}) = 5,824 \times (0,1 / 12,942) = 0,045$$

$$\text{Глутамінова кислота } G_2 = G_{\text{к}} \times (C_2 / C_{\Sigma\text{п}}) = 5,824 \times (1 / 12,942) = 0,45$$

$$\text{Манітол } G_3 = G_{\text{к}} \times (C_3 / C_{\Sigma\text{п}}) = 5,824 \times (10 / 12,942) = 4,5$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ } G_4 = G_{\text{к}} \times (C_4 / C_{\Sigma\text{п}}) = 5,824 \times (1 / 12,942) = 0,45$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } G_5 = G_{\text{к}} \times (C_5 / C_{\Sigma\text{п}}) = 5,824 \times (0,2 / 12,942) = 0,09$$

$$\text{CaCl}_2 \text{ } G_6 = G_{\text{к}} \times (C_6 / C_{\Sigma\text{п}}) = 5,824 \times (0,04 / 12,942) = 0,018$$

$$\text{Пролін } G_7 = G_{\text{к}} \times (C_7 / C_{\Sigma\text{п}}) = 5,824 \times (0,6 / 12,942) = 0,27$$

$$\text{Тіамін } G_8 = G_{\text{к}} \times (C_8 / C_{\Sigma\text{п}}) = 5,824 \times (0,002 / 12,942) = 0,001$$

Враховуючи малу концентрацію компонентів, їх стерилізація проводиться в колбах в автоклаві, при цьому конденсат не утворюється. Кількість води для розбавлення компонентів поживного середовища буде:

$$V_{\text{вк}} = V_{\text{пск}} - G_{\text{к}} = 450 - 5,824 = 444,18 \text{ мл.}$$

Формування композиції А, В, С, D наведено у таблиці 3.4. На розчин тетрацикліну, який закупається стерильним розчином (10 г/л), враховується $990 \times (0,045 / 10) = 4,5$ мл води. Також враховуються мікроелементи, які входять в склад поживного середовища. На мікроелементи припадає 0,44 мл, тоді на інші компоненти: $444,18 - 4,5 - 0,44 = 439,24$ л.

Розраховуємо кількість води для розчинення покомпонентно, мл:

$$\text{Тетрациклін } V_{1\text{в}} = 4,5$$

$$\text{Мікроелементи } V_{\text{м}} = 0,44$$

$$\text{Глутамінова кислота } V_{2\text{в}} = V_{\text{в}} (C_2 / C_{\Sigma\text{п}}) = 439,24 (1 / 12,842) = 34,2$$

$$\text{Манітол } V_{3\text{в}} = V_{\text{в}} (C_3 / C_{\Sigma\text{п}}) = 439,24 (10 / 12,842) = 342$$

$$\text{K}_2\text{HPO}_4 \text{ } V_{4\text{в}} = V_{\text{в}} (C_4 / C_{\Sigma\text{п}}) = 439,24 (1 / 12,842) = 34,2$$

$$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } V_{5\text{в}} = V_{\text{в}} (C_5 / C_{\Sigma\text{п}}) = 439,24 (0,2 / 12,842) = 6,84$$

$$\text{CaCl}_2 \text{ } V_{6\text{в}} = V_{\text{в}} (C_6 / C_{\Sigma\text{п}}) = 439,24 (0,04 / 12,842) = 1,4$$

$$\text{Пролін } V_{7B} = V_B (C_7 / C_{\Sigma\P}) = 439,24 (0,6 / 12,842) = 20,5$$

$$\text{Тіамін } V_{8B} = V_B (C_8 / C_{\Sigma\P}) = 439,24 (0,002 / 12,842) = 0,1$$

Всього: 444,18 мл.

Таблиця 7.5

**Композиції для стерилізації поживного середовища для вирощування
інокуляту в колбах на качалці**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 5,1 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Глутамінова кислота	1	0,45	A	401,92
Вода		34,2		
Манітол	10	4,5		
Вода		342		
Пролін	0,6	0,27		
Вода		20,5		
K ₂ HPO ₄	1	0,45	B	34,65
Вода		34,2		
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2	0,09	C	8,348
Вода		6,84		
CaCl ₂	0,04	0,018		
Вода		1,4		
Тіамін	0,002	0,001	D	0,101
Вода		0,1		
Р-н мікроелементів		0,44	E	0,44
Тетрациклін	0,1	0,045	Не стерилізується	4,545
Вода		4,5		
Разом:		450		450

**7.3. Розрахунок напівпродуктів і баластних речовин в культуральній рідині
після виробничого біосинтезу**

Кількість абсолютно сухих речовин (АСР) в поживному середовищі для виробничого біосинтезу $G_{\Phi} = 13,85 \text{ кг} = 13850 \text{ г}$.

Кількість АСР в посівному матеріалі з врахуванням втрат під час вирощування в посівному апараті об'ємом 10 л $E_{\text{ін}} = 0,1$ (частка) $G_{\text{ін}} = 66$ г.

$$G_{\text{загп}} = G_{\text{ін}} (1 - E_{\text{п}}) = 65,34 \text{ г}$$

Загальна кількість АСР у середовищі для виробничого біосинтезу становить:

$$G_{\text{срф}} = G_{\text{ф}} + G_{\text{загп}} = 13850 + 65,34 = 13915,34 \text{ г} = 13,92 \text{ кг}$$

Кількість втрат АСР у культуральній рідині (КР) в процесі виробничого біосинтезу з урахуванням втрат $E_{\text{бс}} = 0,5$ (частка).

$$G_{\text{втб}} = G_{\text{срф}} \times E_{\text{бс}} = 13,92 \times 0,5 = 6,958 \text{ кг}$$

Кількість АСР в КР, що йде на подальшу переробку, становить:

$$G_{\text{сркр}} = G_{\text{срф}} - G_{\text{втб}} = 13,92 - 6,958 = 6,962 \text{ кг}$$

Кількість КР після виробничого біосинтезу, кг:

$$G_{\text{кр}} = V_{\text{кр}} \times \rho_{\text{кр}} = 0,05 \times 1020 = 51 \text{ кг},$$

враховуючи, що $\rho_{\text{кр}}$ – це середня густина культуральної рідини ($\rho_{\text{кр}} = 1020 \dots 1050$ кг/м³, приймаємо 1020, оскільки густина суспензії буде дуже малою).

Враховуючи коефіцієнт запасу ($K_1 = 1,1$) на нестерильні операції під час виробничого біосинтезу частина біомаси зливається. При цьому вихід абсолютно сухої біомаси та абсолютно сухого продукту буде менше пропорційно до коефіцієнту.

Тоді, кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) в КР:

$$G_{\text{асб}} = V_{\text{кр}} \times X_{\text{кр}} / K_1 = 0,05 \times 56 / 1,1 = 2,55 \text{ кг або } 2\,550 \text{ г}$$

Кількість абсолютно сухого гормону інсуліну (АСГ) в КР:

$$G_{\text{асг}} = V_{\text{кр}} \times P_{\text{кр}} / K_1 = 0,05 \times 14,5 / 1,1 = 0,659 \text{ кг або } 659 \text{ г}$$

Кількість абсолютно сухих баластних речовин в КР становить:

$$G_{\text{брв}} = G_{\text{сркр}} - G_{\text{асб}} = 6,962 - 2,55 = 4,412 \text{ кг}$$

Кількість води, в КР:

$$G_{\text{води}} = G_{\text{кр}} - G_{\text{асб}} - G_{\text{брв}} = 51 - 2,55 - 4,412 = 44,22 \text{ кг}$$

7.4. Розрахунок стадії відділення біомаси центрифугуванням

Об'єм суспензії КР, що йде на подальшу переробку:

$$V_{\text{сус}} = V_{\text{кр}} = 0,05 \text{ м}^3 \text{ або } 50,5 \text{ л}$$

Вологовміст біомаси становить 65-85 %, приймаємо $W_{\text{кліт}} = 0,8$ (частка). Тоді, маса вологої біомаси в КР:

$$G_{\text{вб}} = G_{\text{асб}} / (1 - W_{\text{кліт}}) = 2,55 / (1 - 0,8) = 12,75 \text{ кг}$$

Вологий осад містить $\sim 10..15$ % міжклітинної води. Приймаємо $W_{\text{во}} = 0,13$ (частка). Загальна кількість вологого осаду, який відділяють з КР:

$$G_{\text{вос}} = G_{\text{асб}} / (1 - W_{\text{во}}) = 2,55 / (1 - 0,13) = 2,93 \text{ кг}$$

Об'єм вологого осаду в суспензії:

$$V_{\text{вос}} = G_{\text{вос}} \times 1000 / \rho_{\text{ос}} = 2,93 \times 1000 / 1050 = 2,79 \text{ л}$$

Втрати вологого осаду під час центрифугування:

$$V_{\text{втц}} = V_{\text{вос}} \times E_{\text{ц}} = 2,79 \times 0,03 = 0,084 \text{ л},$$

де $E_{\text{ц}} = 0,03$ – частка втрат при центрифугуванні.

Об'єм центрифугату, що зливається:

$$V_{\text{цв}} = V_{\text{сус}} - V_{\text{вос}} - V_{\text{втц}} = 50,5 - 2,79 - 0,084 = 47,53 \text{ л}$$

Маса АСГ з врахуванням втрат при центрифугуванні:

$$G_{\text{осг}} = G_{\text{асг}} \times (1 - E_{\text{ц}}) = 659 \times (1 - 0,03) = 639,23 \text{ г або } 0,639 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в концентраті:

$$CP_{\text{ц}} = G_{\text{асб}} \times 100 / G_{\text{вос}} = 2,55 \times 100 / 2,93 = 87 \text{ мас. \%}$$

7.5. Розрахунок стадій руйнування клітин *Escherichia coli* 20 ІВА 1

7.5.1. Розчинення в буферному розчині

На розчинення надходить $V_{\text{вос}} = 2,79$ кг вологого осаду. Розчинення проводять в пропорції 1:10. Таким чином, об'єм буферного розчину $V_{\text{буф}} = 25,11$ л. Вміст білку в концентраті $G_{\text{осг}} = 639,23$ г.

Об'єм одержаного розчину з урахуванням коефіцієнта втрат при розчиненні $E_{\text{р}} = 0,01$:

$$V_{\text{р}} = (V_{\text{буф}} + V_{\text{вос}}) \times (1 - E_{\text{р}}) = (25,11 + 2,79) \times (1 - 0,01) = 27,62 \text{ л}$$

Втрати об'єму під час розчинення:

$$V_{\text{вр}} = V_{\text{зр}} \times E_{\text{р}} = 27,9 \times 0,01 = 0,28 \text{ л}$$

Маса АСБ в розчині:

$$G_{\text{р}} = G_{\text{вос}} \times (1 - E_{\text{р}}) = 2,93 \times (1 - 0,01) = 2,9 \text{ кг}$$

Маса АСГ в розчині:

$$G_{\text{рг}} = G_{\text{осг}} \times (1 - E_p) = 639,23 \times (1 - 0,01) = 632,84 \text{ г}$$

Вміст сухих речовин в розчині:

$$CP_p = G_p \times 100 / V_p = 2,9 \times 100 / 27,62 = 10,5 \text{ мас. \%}$$

7.5.2. Руйнування клітин на гомогенізаторі високого тиску

Об'єм суспензії з урахуванням коефіцієнта втрат при гомогенізації $E_T = 0,02$:

$$V_T = V_p \times (1 - E_T) = 27,62 \times (1 - 0,02) = 27,1 \text{ л}$$

Втрати об'єму при гомогенізації:

$$V_{\text{вт}} = V_p \times E_T = 27,62 \times 0,02 = 0,55 \text{ л}$$

Маса АСР в розчині:

$$G_T = G_p \times (1 - E_T) = 2,9 \times (1 - 0,02) = 2,84 \text{ кг}$$

Маса АСГ в розчині:

$$G_{\text{гг}} = G_{\text{рг}} \times (1 - E_T) = 632,84 \times (1 - 0,02) = 620,2 \text{ г}$$

Вміст сухих речовин в розчині після гомогенізації:

$$CP_T = G_T \times 100 / V_T = 2,84 \times 100 / 27,1 = 10,5 \text{ мас. \%}$$

7.5.3. Відділення тілець включення центрифугуванням

Маса АСГ після центрифугування суспензії, з урахуванням втрат, ($E_{\text{ц}} = 0,03$):

$$G_{\text{ос}} = G_{\text{гг}} \times (1 - E_{\text{ц}}) = 620,2 \times (1 - 0,03) = 601,6 \text{ г або } 0,602 \text{ кг}$$

Об'єм розчину, що зливається:

$$V_{\text{вц}} = V_T - G_{\text{ос}} = 27,1 - 0,602 = 26,5 \text{ л}$$

7.5.4. Циклічне промивання осаду з подальшим центрифугуванням

Промивання осаду тілець включення з подальшим центрифугуванням здійснюють тричі. Операції проводяться на одних і тих же апаратах, з'єднаних між собою трубами. При цьому використовуються буфери одного і того ж складу, тому між промиваннями та центрифугуваннями апарати не миють для зменшення втрат при виробництві. Для розрахунку вважаємо що втрати є лише при останньому промиванні та центрифугуванні.

На розчинення надходить $G_{\text{ос}} = 601,6 \text{ г}$ тілець включення. Розчинення проводять в пропорції 1:10. Таким чином, об'єм буферного розчину $V_{\text{буф}} = 5,41 \text{ л}$.

Об'єм одержаного розчину з урахуванням коефіцієнта втрат при розчиненні $E_p = 0,01$:

$$V_p = (V_{\text{буф}} + G_{\text{ос}}) \times (1 - E_p) = (5,41 + 0,602) \times (1 - 0,01) = 5,95 \text{ л}$$

Втрати об'єму під час розчинення:

$$V_{\text{вр}} = V_{\text{зр}} \times E_p = 6,012 \times 0,01 = 0,06 \text{ л}$$

Маса АСГ в розчині:

$$G_{\text{рг}} = G_{\text{ос}} \times (1 - E_p) = 601,6 \times (1 - 0,01) = 595,6 \text{ г або } 0,596 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в розчині:

$$C_{\text{Р}} = G_{\text{рг}} \times 100 / V_p = 0,596 \times 100 / 5,95 = 10 \text{ мас. \%}$$

Маса АСГ після центрифугування суспензії, з урахуванням втрат, ($E_{\text{ц}} = 0,03$):

$$G_{\text{ц}} = G_{\text{рг}} \times (1 - E_{\text{ц}}) = 595,6 \times (1 - 0,03) = 577,7 \text{ г або } 0,578 \text{ кг}$$

Об'єм розчину, що зливається:

$$V_{\text{вц}} = V_p - G_{\text{ц}} = 5,95 - 0,578 = 5,372 \text{ л}$$

7.6. Розрахунок стадій розчинення тілець включення та ренатурації

7.6.1. Розчинення в буферному розчині та ренатурація

На розчинення надходить $G_{\text{ц}} = 577,7 \text{ г}$ тілець включення. Розчинення проводять в пропорції 1:10. Таким чином, об'єм буферного розчину $V_{\text{буф}} = 5,2 \text{ л}$.

Об'єм одержаного розчину з урахуванням коефіцієнта втрат при розчиненні та ренатурації $E_p = 0,01$:

$$V_p = (V_{\text{буф}} + G_{\text{ц}}) \times (1 - E_p) = (5,2 + 0,578) \times (1 - 0,01) = 5,72 \text{ л}$$

Втрати об'єму під час розчинення:

$$V_{\text{вр}} = V_{\text{зр}} \times E_p = 5,778 \times 0,01 = 0,06 \text{ л}$$

Маса АСГ в розчині:

$$G_{\text{рг}} = G_{\text{ц}} \times (1 - E_p) = 577,7 \times (1 - 0,01) = 572 \text{ г або } 0,572 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в розчині:

$$C_{\text{Р}} = G_{\text{рг}} \times 100 / V_p = 0,572 \times 100 / 5,72 = 10 \text{ мас. \%}$$

7.6.2. Концентрування суспензії після ренатурації центрифугуванням

Маса АСГ після центрифугування суспензії, з врахуванням втрат, ($E_{\text{ц}} = 0,03$):

$$G_{\text{осг}} = G_{\text{рг}} \times (1 - E_{\text{ц}}) = 572 \times (1 - 0,03) = 554,84 \text{ г або } 0,555 \text{ кг}$$

Об'єм розчину, що зливається:

$$V_{\text{вц}} = V_p - G_{\text{осг}} = 5,72 - 0,555 = 5,165 \text{ л}$$

7.7. Розрахунок стадії ферментативної конверсії

7.7.1. Розчинення в буферному розчині та ферментативна конверсія

На розчинення надходить $G_{\text{осг}} = 554,84$ г тілець включення. Розчинення проводять в пропорції 1:10. Таким чином, об'єм буферного розчину $V_{\text{буф}} = 5$ л.

Об'єм одержаного розчину з урахуванням коефіцієнта втрат при розчиненні та ферментативній конверсії $E_p = 0,01$:

$$V_{\text{рфк}} = (V_{\text{буф}} + G_{\text{осг}}) \times (1 - E_p) = (5 + 0,555) \times (1 - 0,01) = 5,5 \text{ л}$$

Втрати об'єму під час розчинення:

$$V_{\text{врфк}} = V_{\text{зр}} \times E_p = 5,36 \times 0,01 = 0,056 \text{ л}$$

Маса АСГ в розчині:

$$G_{\text{рфкг}} = G_{\text{осг}} \times (1 - E_p) = 554,84 \times (1 - 0,01) = 549,3 \text{ г або } 0,549 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в розчині:

$$CP_{\text{рфк}} = G_{\text{рфкг}} \times 100 / V_{\text{рфк}} = 0,549 \times 100 / 5,5 = 10 \text{ мас. \%}$$

7.7.1. Осадження інсуліну

Приймаємо ступінь концентрування при осадженні (після зливання надосадової рідини) $K_{\text{ос}} = 5$.

Об'єм концентрованого розчину після зливання з врахуванням коефіцієнта втрат при осадженні $E_{\text{ос}} = 0,04$:

$$V_{\text{ос}} = V_{\text{рфк}} \times (1 - E_{\text{ос}}) / K_{\text{ос}} = 5,5 \times (1 - 0,04) / 5 = 1,06 \text{ л}$$

Втрати об'єму розчину при осадженні:

$$V_{\text{во}} = V_{\text{рфк}} \times E_{\text{ос}} = 5,5 \times 0,04 = 0,22 \text{ л}$$

Маса абсолютно сухих речовин в концентраті:

$$G_{\text{рк}} = G_{\text{рфкг}} \times (1 - E_{\text{ос}}) = 549 \times (1 - 0,04) = 527 \text{ г або } 0,527 \text{ кг}$$

Вміст сухого гормону в концентраті:

$$CP_{\text{к}} = G_{\text{рк}} \times 100 / V_{\text{ос}} = 0,527 \times 100 / 1,06 = 49,7 \text{ мас. \%}$$

Об'єм розчину, що зливається:

$$V_{\text{рв}} = V_{\text{рфк}} - V_{\text{ос}} - V_{\text{во}} = 5,5 - 1,06 - 0,22 = 4,22 \text{ л}$$

7.8. Розрахунок стадій хроматографічної очистки інсуліну

7.8.1. Розчинення в буферному розчині

На розчинення надходить $G_{гк} = 527$ г інсуліну. Розчинення проводять в $V_{буф} = 19$ л буферного розчину.

Об'єм одержаного розчину з урахуванням коефіцієнта втрат при розчиненні $E_p = 0,01$:

$$V_p = (V_{буф} + G_{гк}) \times (1 - E_p) = (19 + 0,527) \times (1 - 0,01) = 19,33 \text{ л}$$

Втрати об'єму під час розчинення:

$$V_{вр} = V_{зр} \times E_p = 19,527 \times 0,01 = 0,195 \text{ л}$$

Маса абсолютно сухих речовин в розчині:

$$G_{аср} = G_{рк} \times (1 - E_p) = 527 \times (1 - 0,01) = 521,7 \text{ г або } 0,522 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в розчині:

$$CP_p = G_{аср} \times 100 / V_p = 0,522 \times 100 / 19,33 = 2,7 \text{ мас. \%}$$

7.8.2. Фільтрування

Об'єм відфільтрованого розчину з врахуванням коефіцієнта втрат при фільтруванні $E_\phi = 0,01$:

$$V_\phi = V_p \times (1 - E_\phi) / K_\phi = 19,33 \times (1 - 0,01) / 1,005 = 19,02 \text{ л}$$

Втрати об'єму розчину при фільтруванні:

$$V_{вф} = V_p \times E_\phi = 19,33 \times 0,01 = 0,193 \text{ л}$$

Маса абсолютно сухих речовин в концентраті:

$$G_{рк} = G_{аср} \times (1 - E_\phi) = 521,7 \times (1 - 0,01) = 516,5 \text{ г або } 0,517 \text{ кг}$$

Вміст сухого гормону в концентраті:

$$CP_\phi = G_{рк} \times 100 / V_\phi = 0,517 \times 100 / 19,02 = 2,72 \text{ мас. \%}$$

Маса баластних речовин на фільтрі:

$$G_{бр} = V_p \times (1 - E_\phi) \times (K_\phi - 1) = 19,33 \times (1 - 0,01) \times 0,005 = 96 \text{ г} = 0,096 \text{ кг}$$

7.8.3. Хроматографічна очистка

Маса АСГ після проходження суспензії через колонку з врахуванням втрат, ($E_{пр} = 0,01$):

$$G_{прг} = G_{рк} \times (1 - E_{пр}) = 516,5 \times (1 - 0,01) = 511,3 \text{ г або } 0,511 \text{ кг}$$

Об'єм розчину, що зливається:

$$V_{\text{вц}} = V_{\text{ф}} - G_{\text{прг}} = 19,02 - 0,511 = 18,51 \text{ л}$$

Для елюювання готують розчин хлориду натрію у пропорції 1:25, тобто $V_{\text{на}} = 475,5$ л. Загальний об'єм реакційної суміші:

$$V_{\text{рс}} = V_{\text{на}} + G_{\text{прг}} = 475,5 + 0,511 = 476 \text{ л}$$

Після закінчення елюювання, проходження через детектори та розфасовки по фракціям маса АСГ після елюювання з урахуванням втрат $E_{\text{ел}} = 0,03$:

$$G_{\text{асг}} = G_{\text{прг}} \times (1 - E_{\text{ел}}) = 511,3 \times (1 - 0,03) = 496 \text{ г або } 0,496 \text{ кг}$$

Об'єм розчину, що зливається:

$$V_{\text{вц}} = V_{\text{на}} - G_{\text{асг}} = 476 - 0,496 = 475,5 \text{ л}$$

7.8.4. Розчинення в буферному розчині

На розчинення надходить $G_{\text{гк}} = 496$ г інсуліну. Розчинення проводять в $V_{\text{буф}} = 19$ л буферного розчину.

Об'єм одержаного розчину з урахуванням коефіцієнта втрат при розчиненні $E_{\text{р}} = 0,01$:

$$V_{\text{р}} = (V_{\text{буф}} + G_{\text{гк}}) \times (1 - E_{\text{р}}) = (19 + 0,496) \times (1 - 0,01) = 19,3 \text{ л}$$

Втрати об'єму під час розчинення:

$$V_{\text{вр}} = V_{\text{зр}} \times E_{\text{р}} = 19,5 \times 0,01 = 0,195 \text{ л}$$

Маса абсолютно сухих речовин в розчині:

$$G_{\text{аср}} = G_{\text{рк}} \times (1 - E_{\text{р}}) = 496 \times (1 - 0,01) = 491 \text{ г або } 0,491 \text{ кг}$$

Вміст сухих речовин в розчині:

$$CP_{\text{р}} = G_{\text{аср}} \times 100 / V_{\text{р}} = 0,491 \times 100 / 19,3 = 2,54 \text{ мас. \%}$$

7.8.5. Фільтрування

Об'єм відфільтрованого розчину з врахуванням коефіцієнта втрат при фільтруванні $E_{\text{ф}} = 0,01$:

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{р}} \times (1 - E_{\text{ф}}) / K_{\text{ф}} = 19,3 \times (1 - 0,01) / 1,005 = 19 \text{ л}$$

Втрати об'єму розчину при фільтруванні:

$$V_{\text{вф}} = V_{\text{р}} \times E_{\text{ф}} = 19,3 \times 0,01 = 0,193 \text{ л}$$

Маса абсолютно сухих речовин в концентраті:

$$G_{\text{рк}} = G_{\text{аср}} \times (1 - E_{\text{ф}}) = 491 \times (1 - 0,01) = 486,1 \text{ г або } 0,486$$

Вміст сухого гормону в концентраті:

$$CP_{\phi} = G_{pk} \times 100 / V_{\phi} = 0,486 \times 100 / 19 = 2,56 \text{ мас. \%}$$

Маса баластних речовин на фільтрі:

$$G_{bp} = V_p \times (1 - E_{\phi}) \times (K_{\phi} - 1) = 19,3 \times (1 - 0,01) \times 0,005 = 96 \text{ г} = 0,096 \text{ кг}$$

7.8.6. Хроматографічна очистка

Маса АСГ після проходження суспензії через колонку з врахуванням втрат, ($E_{пр} = 0,01$):

$$G_{прг} = G_{pk} \times (1 - E_{пр}) = 486,1 \times (1 - 0,01) = 481,24 \text{ г або } 0,481 \text{ кг}$$

Об'єм розчину, що зливається:

$$V_{вц} = V_{\phi} - G_{прг} = 19 - 0,481 = 18,52 \text{ л}$$

Для елюювання подають 2-пропанол у пропорції 1:25, тобто $V_{сп} = 475 \text{ л}$.

Загальний об'єм реакційної суміші:

$$V_{pc} = V_{сп} + G_{прг} = 475 + 0,481 = 475,48 \text{ л}$$

Після закінчення елюювання, проходження через детектори та розфасовки по фракціям маса АСГ після елюювання з урахуванням втрат $E_{ел} = 0,03$:

$$G_{асг} = G_{прг} \times (1 - E_{ел}) = 481,24 \times (1 - 0,03) = 466,8 \text{ г або } 0,467 \text{ кг}$$

Об'єм розчину, що зливається:

$$V_{вц} = V_{сп} - G_{асг} = 475,48 - 0,467 = 475,01 \text{ л}$$

7.9. Розрахунок стадії сушіння в сублимаційній сушарці

Маса висушеного препарату інсуліну з врахуванням коефіцієнта втрат під час сушіння $E_{сш} = 0,05$ сухої речовини, що виходить із сушарки:

$$G_{сш} = G_{асг} \times (1 - E_{сш}) = 0,467 \times (1 - 0,05) = 0,443 \text{ г}$$

7.10. Розрахунок стадії ПМВ

Субстанцію інсуліну розфасовують в пластикові банки по 0,5 кг. Втрати при фасуванні складають $E_{уп} = 0,01$.

Кількість інсуліну для фасування з урахуванням втрат:

$$G_{уп} = G_{сш} \times (1 - E_{уп}) = 0,443 \times (1 - 0,01) = 0,439 \text{ кг}$$

Кількість банок при заповненні $N_{п} = 0,5 \text{ кг}$:

$$N_{б} = G_{уп} / N_{п} = 0,439 / 0,5 = 0,88 \sim 1 \text{ шт}$$

Механічні втрати гормону при фасуванні:

$$G_{\text{втм}} = G_{\text{сш}} - G_{\text{уп}} = 0,443 - 0,439 = 0,004 \text{ кг}$$

Похибка продуктового розрахунку:

$$\Delta = (G_{\text{уп}} - G_{\text{цк}}) \times 100 / G_{\text{уп}} = (0,439 - 0,419) \times 100 / 0,439 = 4,56 \% ,$$

що значно менше від заданої точності $\pm 10 \%$. Робимо висновок, що продуктивний розрахунок зроблено вірно.

7.11. Розрахунок матеріального балансу

Таблиця 7.5

Матеріальний баланс на один цикл виробничого біосинтезу

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини та напівпродукту	Кількість, г, мл	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, г, мл
1	2	3	4	5
1.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛЦІ			
1.1.	Глутамінова кислота	0,45	Нестерильне ПС	450
1.2.	Манітол	4,5		
1.3.	Пролін	0,27		
1.4.	K ₂ HPO ₄	0,45		
1.5.	MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,09		
1.6.	CaCl ₂	0,018		
1.7.	Тіамін	0,001		
1.8.	Р-н мікроелементів	0,44		
1.9.	Тетрациклін	0,045		
1.10.	Вода	444,18		
	Всього:	450	Всього:	450
2.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛЦІ			
2.1.	Нестерильне ПС	450	Стерильне ПС	450

	Всього:	450	Всього:	450
3.	ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В КОЛБАХ НА КАЧАЛЦІ			
3.1.	Стерильне ПС	450	Посівний матеріал	500
3.2.	Посівний матеріал з колби	50		
	Всього:	500	Всього:	500
4.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 10 Л, Г (МЛ)			
4.1.	Глутамінова кислота	5,1	Нестерильне ПС	4 590
4.2.	Манітол	51		
4.3.	Пролін	3,06		
4.4.	K ₂ HPO ₄	5,1		
4.5.	MgSO ₄ • 7H ₂ O	1,02		
4.6.	CaCl ₂	0,2		
4.7.	Тіамін	0,01		
4.8.	Р-н мікроелементів	5		
4.9.	Тетрациклін	0,51		
4.10.	Вода	4 524		
	Всього:	4 590	Всього:	4 590
5.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ІНОКУЛЯТУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 10 Л, Г (МЛ)			
5.1.	Нестерильне ПС	4 590	Стерильне ПС	5100
5.2.	Конденсат	510	(втрат немає)	
	Всього:	5100	Всього:	5100
6.	ВИРОЩУВАННЯ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ В ПОСІВНОМУ АПАРАТІ НА 10 Л, Г (МЛ)			
6.1.	Стерильне ПС	5 100	Посівний матеріал	5 040
6.2.	Посівний матеріал	500		
6.3.	Втрати (частка)	0,1		560
	Всього:	5 600		5 600

7.	ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ В ФЕРМЕНТЕРІ ГЕОМЕТРИЧНИМ ОБ'ЄМОМ 100 Л, Г (Л)			
7.1.	Глюкоза	0,408	Нестерильне ПС	3,468
7.2.	Глутамінова кислота	0,051		
7.3.	Манітол	0,51		
7.4.	K ₂ HPO ₄	0,051		
7.5.	MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,01		
7.6.	CaCl ₂	0,002		
7.7.	Р-н мікроелементів	0,051		
7.10.	Вода	2,385		
	Всього:	3,468	Всього:	3,468
8.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ В ФЕРМЕНТЕРІ ГЕОМЕТРИЧНИМ ОБ'ЄМОМ 100 Л, Г (Л)			
8.1.	Нестерильне ПС	3,468	Стерильне ПС	3,868
8.2.	Конденсат	0,4	(втрат немає)	
	Всього:	3,868	Всього:	3,868
9.	ПРИГОТУВАННЯ ПІДЖИВЛЮЮЧОГО РОЗЧИНУ ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ В ФЕРМЕНТЕРІ ГЕОМЕТРИЧНИМ ОБ'ЄМОМ 100 Л, Г (Л)			
9.1.	Глюкоза	5,173	Нестерильне ПС	42,432
9.2.	Пролін	7,645		
9.3.	Вода	29,614		
	Всього:	42,432	Всього:	42,432
10.	СТЕРИЛІЗАЦІЯ ПІДЖИВЛЮЮЧОГО РОЗЧИНУ ДЛЯ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ В ФЕРМЕНТЕРІ ГЕОМЕТРИЧНИМ ОБ'ЄМОМ 100 Л, Г (Л)			
10.1.	Нестерильне ПС	42,432	Стерильне ПС	47,132
10.2.	Конденсат	4,7	(втрат немає)	
	Всього:	47,132	Всього:	47,132
11.	ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ, Г (Л)			
11.1.	Стерильне ПС	51	Культуральна рідина	50,4
11.2.	Посівний матеріал	5		
11.3.	Втрати (частка)	0,1		5,6

	Всього:	56	Всього:	56
12.	ЦЕНТРИФУГУВАННЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ, КГ (Л)			
12.1.	КР на центрифугування	50,4	Центрифугат	47,53
12.2.			Вологий осад, л	2,79
12.3.	Втрати (частка)	0,03	Втрати	0,084
	Всього	50,4	Всього	50,4
13.	РОЗЧИНЕННЯ БІОМАСИ В БУФЕРНОМУ РОЗЧИНІ, КГ (Л)			
13.1.	Вологий осад, кг	2,93	Біомаса в розчині	2,9
13.2.	Розчинник	25,11	Розчинник	24,86
13.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,28
	Всього	28,04	Всього	28,04
14.	РУЙНУВАННЯ КЛІТИН ГОМОГЕНІЗАЦІЄЮ ВИСОКОГО ТИСКУ, КГ (Л)			
14.1.	Біомаса в розчині	2,9	Біомаса в розчині	2,22
14.2.			Тільця включення в розчині	0,62
14.3.	Розчинник	24,86	Розчинник	24,36
14.4.	Втрати (частка)	0,02	Втрати	0,56
	Всього	27,76	Всього	27,76
15.	ВІДДІЛЕННЯ ТІЛЕЦЬ ВКЛЮЧЕННЯ ЦЕНТРИФУГУВАННЯМ, КГ (Л)			
15.1.	Тільця включення в розчині	0,62	Вологий осад	0,602
15.2.	Розчинник	24,36	Центрифугат	23,63
15.3.	Втрати (частка)	0,03	Втрати	0,75
	Всього	24,98	Всього	24,98
16.	ПРОМИВАННЯ ДЛЯ ВІДДІЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ КЛІТИН, КГ (Л)			
16.1.	Вологий осад	0,602	Тільця включення в розчині	0,596
16.2.	Розчинник	5,41	Розчинник	5,356
16.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,06
	Всього	6,012	Всього	6,012
17.	ЦЕНТРИФУГУВАННЯ ДЛЯ ВІДДІЛЕННЯ ЗАЛИШКІВ КЛІТИН, КГ (Л)			
17.1.	Тільця включення в розчині	0,596	Вологий осад	0,578

17.2.	Розчинник	5,356	Центрифугат	5,185
17.3.	Втрати (частка)	0,03	Втрати	0,179
	Всього	5,952	Всього	5,952
18.	РОЗЧИНЕННЯ ТА РЕНАТУРАЦІЯ ТІЛЕЦЬ ВКЛЮЧЕННЯ, КГ (Л)			
18.1.	Вологий осад	0,578	Тіляця включення в розчині	0,572
18.2.	Розчинник	5,2	Розчинник	5,148
18.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,058
	Всього	5,778	Всього	5,778
19.	КОНЦЕНТРУВАННЯ СУСПЕНЗІЇ ЦЕНТРИФУГУВАННЯМ, КГ (Л)			
19.1.	Тіляця включення в розчині	0,572	Вологий осад	0,555
19.2.	Розчинник	5,148	Центрифугат	4,993
19.3.	Втрати (частка)	0,03	Втрати	0,172
	Всього	5,72	Всього	5,72
20.	РОЗЧИНЕННЯ ТА ФЕРМЕНТАТИВНА КОНВЕРСІЯ, КГ (Л)			
20.1.	Вологий осад	0,555	Продукт в розчині	0,549
20.2.	Розчинник	5	Розчинник	4,95
20.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,056
	Всього	5,555	Всього	5,555
21.	ОСАДЖЕННЯ, КГ (Л)			
21.1.	Продукт в розчині	0,549	Концентрат	0,527
21.2.	Розчинник	4,95	Розчинник	4,752
21.3.	Втрати (частка)	0,04	Втрати	0,22
	Всього	5,499	Всього	5,499
22.	РОЗЧИНЕННЯ ПЕРЕД ХРОМАТОГРАФІЄЮ, КГ (Л)			
22.1.	Концентрат	0,527	Продукт в розчині	0,522
22.2.	Розчинник	19	Розчинник	18,81
22.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,195
	Всього	19,527	Всього	19,527
23.	ФІЛЬТРАЦІЯ, КГ (Л)			
23.1.	Продукт в розчині	0,522	Продукт в розчині	0,517
23.2.	Розчинник	18,81	Розчинник	18,622
23.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,193

	Всього	19,332	Всього	19,332
24.	ПОДАЧА НА ІОНООБМІННУ КОЛОНКУ, КГ (Л)			
24.1.	Продукт в розчині	0,517	Продукт в колонці	0,511
23.2.	Розчинник	18,622	Розчинник на злив	18,436
24.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,192
	Всього	19,139	Всього	19,139
25.	ЕЛЮЮВАННЯ ФРАКЦІЙ, КГ (Л)			
25.1.	Продукт в колонці	0,511	Вологий осад	0,496
23.2.	Елюат	475,5	Елюат на злив	461,235
25.3.	Втрати (частка)	0,03	Втрати	14,28
	Всього	476,011	Всього	476,011
26.	РОЗЧИНЕННЯ ПЕРЕД ХРОМАТОГРАФІЄЮ, КГ (Л)			
26.1.	Вологий осад	0,496	Продукт в розчині	0,491
26.2.	Розчинник	19	Розчинник	18,81
26.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,195
	Всього	19,496	Всього	19,496
27.	ФІЛЬТРАЦІЯ, КГ (Л)			
27.1.	Продукт в розчині	0,491	Продукт в розчині	0,486
27.2.	Розчинник	18,81	Розчинник	18,622
27.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,193
	Всього	19,301	Всього	19,301
28.	ПОДАЧА НА РІДИННУ КОЛОНКУ, КГ (Л)			
28.1.	Продукт в розчині	0,486	Продукт в колонці	0,481
28.2.	Розчинник	18,622	Розчинник на злив	18,436
28.3.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,191
	Всього	19,108	Всього	19,108
29.	ЕЛЮЮВАННЯ ІНСУЛІНУ, КГ (Л)			
29.1.	Продукт в колонці	0,481	Вологий осад	0,467
29.2.	Елюат	475	Елюат на злив	460,75
29.3.	Втрати (частка)	0,03	Втрати	14,264
	Всього	475,481	Всього	475,481
30.	СУШІННЯ ПРЕПАРАТУ, КГ			
30.1.	Вологий осад	0,467	Сухий гормон	0,421
30.2.			Волога	0,022

30.3.	Втрати (частка)	0,05	Втрати	0,024
	Всього	0,467	Всього	0,467
31.	ФАСУВАННЯ, ПАКУВАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, КГ			
31.1.	Сухий гормон	0,443	Сухий гормон	0,439
31.2.	Втрати (частка)	0,01	Втрати	0,004
	Всього	0,443	Всього	0,443

7.12. Розрахунок технологічного обладнання

7.12.1. Розрахунок кількості робочих ферментерів

Приблизний загальний геометричний об'єм ферментерів при заданому $K_{зф} = 0,6$, л:

$$V_{фг} = V_{ф} / K_{зф} = 100 / 0,6 = 166,67 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за об'ємом ферментер, л

$$V_{фт} = 160 \text{ л}$$

Кількість виробничих ферментерів при заданому K_3 , од.

$$N_{фт} = V_{фг} / V_{фт} = 166,67 / 160 = 1,04 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка $K_{зф}$

$$K_{зф} = V_{ф} / V_{фт} \times N_{фт} = 100 / 160 \times 1 = 0,625$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{фт} + 1$ запасний.

7.12.2. Розрахунок кількості посівних апаратів

Приблизний загальний геометричний об'єм посівного апарата при заданому $K_{па} = 0,6$, л:

$$V_{пт} = V_{па} / K_{па} = 10 / 0,6 = 16,67 \text{ л}$$

Вибираємо найближчий за номінальним об'ємом апарат: $V_{пт} = 20$ л.

Кількість посівних апаратів при заданому K_3 , од:

$$N_{пр} = V_{пт} / V_{пт} = 16,67 / 20 = 0,83 - \text{приймаємо } 1$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення вибраних з таблиці ферментерів, частка $K_{зф}$

$$K_{зпа} = V_{па} / (V_{пт} \times N_{пт}) = 10 / 20 \times 1 = 0,5$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує заданих меж (0,5-0,65) приймаємо до установки кількість ферментерів $N_{\text{пт}} + 1$ запасний.

7.12.3. Розрахунок кількості качалочних колб

Приблизний загальний необхідний об'єм качалочних колб при заданому $K_{\text{па}} = 0,2$, л:

$$V_{\text{кг}} = V_{\text{к}} / K_{\text{к}} = 0,5 / 0,2 = 2,5 \text{ л}$$

Об'єм однієї качалочної колби $V_{\text{кг}} = 0,75$

Кількість качалочних колб при заданому $K_{\text{з}}$, од:

$$N_{\text{пар}} = V_{\text{гпа}} / V_{\text{ппа}} = 2,5 / 0,75 = 3,3 - \text{приймаємо } 4$$

7.12.4. Розрахунок кількості збірників для приготування та стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері об'ємом 100 л

Композицію А готують в окремому. Підбираємо геометричний об'єм збірника для композиції А. Приблизний геометричний об'єм збірника при заданому $K_{\text{зб}} = 0,7$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}} / K_{\text{зб}} = 3,2 / 0,7 = 4,57 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{\text{нр}} = 10 \text{ л}$.

Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{Ар}} = V_{\text{Аг}} / V_{\text{нр}} = 4,57 / 10 = 0,46 - \text{обираємо } 1 \text{ од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зр}} = V_{\text{А}} / (V_{\text{нр}} \times N_{\text{Ар}}) = 3,2 / (10 \times 1) = 0,32$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,7-0,85), то приймаємо до установки кількість збірників для приготування композиції А – 1 + 1 запасний. Після приготування композиція А подається в ферментер, в якому стерилізується.

Підживлюючий розчин готується та стерилізується окремо в двох збірниках, з яких потім поступово подається в ферментер.

Підбираємо геометричний об'єм збірника для підживлюючого розчину глюкози. Приблизний геометричний об'єм збірника при заданому $K_{\text{зб}} = 0,7$:

$$V_{\text{ПРг}} = V_{\text{ПР}} / K_{\text{зб}} = 17,123 / 0,7 = 24,5 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор-змішувач: $V_{\text{нр}} = 30 \text{ л}$.

Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{ПРр}} = V_{\text{ПРг}} / V_{\text{нр}} = 24,5 / 30 = 0,82 - \text{обираємо 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зр}} = V_{\text{ПР}} / (V_{\text{нр}} \times N_{\text{ПРр}}) = 17,123 / (30 \times 1) = 0,57$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,7-0,85), то приймаємо до установки кількість збірників для приготування підживлюючого розчину – 1 + 1 запасний.

Підбираємо геометричний об'єм збірника для підживлюючого розчину пролыну. Приблизний геометричний об'єм збірника при заданому $K_{\text{зб}} = 0,7$:

$$V_{\text{ПРг}} = V_{\text{ПР}} / K_{\text{зб}} = 25,309 / 0,7 = 36,2 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом реактор-змішувач: $V_{\text{нр}} = 50 \text{ л.}$

Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{ПРр}} = V_{\text{ПРг}} / V_{\text{нр}} = 36,2 / 50 = 0,72 - \text{обираємо 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зр}} = V_{\text{ПР}} / (V_{\text{нр}} \times N_{\text{ПРр}}) = 25,309 / (50 \times 1) = 0,51$$

Оскільки уточнений коефіцієнт заповнення не перевищує задані межі (0,7-0,85), то приймаємо до установки кількість збірників для приготування підживлюючого розчину – 1 + 1 запасний.

7.12.5. Розрахунок кількості збірників для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 10 л

Композицію А готують в окремому збірнику. Підбираємо геометричний об'єм збірника для композиції А. Приблизний геометричний об'єм збірника при заданому $K_{\text{зб}} = 0,7$:

$$V_{\text{Аг}} = V_{\text{А}} / K_{\text{зб}} = 4,095 / 0,7 = 5,85 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{\text{нр}} = 10 \text{ л.}$

Кількість реакторів при заданому $K_{\text{зб}}$ становить:

$$N_{\text{Ар}} = V_{\text{Аг}} / V_{\text{нр}} = 5,85 / 10 = 0,58 - \text{обираємо 1 од.}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення реактора:

$$K_{\text{зб}} = V_{\text{А}} / (V_{\text{нр}} \times N_{\text{Ар}}) = 4,095 / (10 \times 1) = 0,41$$

Приймаємо до установки кількість реакторів для приготування композиції А – 1. Після приготування композиція А передається до інокулятора, де стерилізується.

7.12.6. Розрахунок об'єму збірників для приготування та зберігання реактивів

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для приготування розчину хлориду натрію для елюювання. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збна} = V_{на} / K_{зб} = 0,476 / 0,8 = 0,59 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збна} = 600 \text{ л.}$

Уточнений коефіцієнт заповнення:

$$K_{зб} = V_{на} / V_{збна} = 0,476 / 0,6 = 0,78,$$

вкладається в допустимі межі (0,7-0,85).

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для приготування буферного розчину для промивання колонок іонообмінного хроматографа. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збр1} = V_{бр1} / K_{зб} = 0,04 / 0,8 = 0,05 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збр1} = 50 \text{ л.}$

Оскільки приблизний та номінальний об'єми збірника співпадають, уточнення коефіцієнта заповнення обладнання не проводимо.

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для приготування буферного розчину для промивання колонок рідинного хроматографа. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збр2} = V_{бр2} / K_{зб} = 0,04 / 0,8 = 0,05 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збр2} = 50 \text{ л.}$

Оскільки приблизний та номінальний об'єми збірника співпадають, уточнення коефіцієнта заповнення обладнання не проводимо.

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для зберігання сорбенту. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збс} = V_c / K_{зб} = 0,02 / 0,8 = 0,025 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збс} = 30 \text{ л.}$

Уточнений коефіцієнт заповнення:

$$K_{зб} = V_c / V_{збс} = 0,02 / 0,03 = 0,67,$$

що вважається нормальним через стандартний об'єм збірника. Оскільки в нас два збірники з однаковою кількістю сорбенту, то таких збірників має бути два.

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для зберігання розчину 2-пропанолу. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збр} = V_{пр} / K_{зб} = 0,48 / 0,8 = 0,6 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збр} = 600 \text{ л}$.

Оскільки приблизний та номінальний об'єми збірника співпадають, уточнення коефіцієнта заповнення обладнання не проводимо.

7.12.7. Розрахунок збірників для розведення цільового продукту на всіх стадіях виділення та очищення

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для розведення біомаси перед гомогенізацією. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збр} = V_p / K_{зб} = 0,03 / 0,8 = 0,038 \text{ м}^3$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збна} = 50 \text{ л}$.

Уточнений коефіцієнт заповнення:

$$K_{зб} = V_p / V_{збр} = 0,03 / 0,05 = 0,6,$$

що є допустимим.

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для розведення біомаси перед центрифугуванням з метою відділення залишків клітин. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збр} = V_p / K_{зб} = 10 / 0,8 = 12,5 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збна} = 15 \text{ л}$.

Уточнений коефіцієнт заповнення:

$$K_{зб} = V_p / V_{збр} = 10 / 15 = 0,67,$$

що фактично входить в допустимі межі (0,7-0,8).

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для розведення біомаси з метою розчинення та ренатурації білку. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збр} = V_p / K_{зб} = 6 / 0,8 = 7,5 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збна} = 10 \text{ л}$.

Уточнений коефіцієнт заповнення:

$$K_{зб} = V_p / V_{збр} = 6 / 10 = 0,6,$$

що є допустимим.

Розраховуємо геометричний об'єм збірника для розведення біомаси перед хроматографією. Таких збірника буде два. Перший з них буде використовуватись також для ферментативної конверсії. Розрахунок його геометричного об'єму проводимо з розрахунку на розведення перед хроматографією, оскільки кількість речовин буде більшою. Враховуючи коефіцієнт заповнення збірника $K_{зб} = 0,8$, приблизний геометричний об'єм апарата:

$$V_{збр} = V_p / K_{зб} = 19,5 / 0,8 = 24,4 \text{ л}$$

Обираємо найближчий за номінальним об'ємом збірник: $V_{збна} = 30 \text{ л}$.

Уточнений коефіцієнт заповнення:

$$K_{зб} = V_p / V_{збр} = 19,5 / 30 = 0,65,$$

що є допустимим.

7.12.8. Розрахунок центрифуг

Розраховуємо центрифугу для відділення біомаси з культуральної рідини. Продуктивність центрифуги від часу центрифугування $t_{ц1} = 15 \text{ хв} = 0,25 \text{ год}$:

$$P_{ц1} = V_{кр} / t_{ц1} = 51 / 0,25 = 204 \text{ л/год.}$$

Заповнення камери для осаду:

$$CP_{к1} = G_б \times 100 / V_{к1} = 2,9 \times 100 / 3 = 96,7 \text{ \%}.$$

Оскільки обидва параметри підходять обраній центрифугі та є оптимальними для виробничого процесу, робимо висновок, що центрифуга обрана вірно.

Розраховуємо центрифуги, які використовуються на наступних стадіях. Розраховуємо одразу всі, оскільки вони однакові та працюють з подібними кількостями речовин. Продуктивність центрифуги від часу центрифугування $t_{ц1} = 6 \text{ хв} = 0,1 \text{ год}$:

$$P_{ц2,3,4} = V_{кр} / t_{ц2,3,4} = 10 / 0,1 = 100 \text{ л/год.}$$

Заповнення камери для осаду:

$$CP_{к2,3,4} = G_6 \times 100 / V_{к2,3,4} = 0,6 \times 100 / 1 = 60 \ \%.$$

Оскільки обидва параметри підходять обраній центрифугі та є оптимальними для виробничого процесу, робимо висновок, що центрифуги обрана вірно.

7.12.9. Розрахунок гомогенізатора

Продуктивність гомогенізатора відома відповідно до тиску, який встановлюють в апараті. При цьому необхідно розуміти за який час буде гомогенізована вся суспензія. Час гомогенізації за продуктивністю $P_r = 220$ л/год при $P = 600$ бар:

$$t_r = V_{зр} / P_r = 30 / 220 = 0,14 \text{ год} \approx 9 \text{ хв}$$

Оскільки час проходження процесу та тиск є оптимальними для руйнування клітин, вважаємо гомогенізатор обраним правильно.

7.12.10. Розрахунок апаратів для хроматографії

Розраховуємо фільтрувальну систему перед іонообмінною хроматографією та іонний хроматограф. Відома швидкість подачі розчину на апарати $w_{x1} = 0,3$ л/хв.

Час, необхідний на здійснення фільтрації:

$$t_{ф1} = V_{p1} / w_{x1} = 19,5 / 0,3 = 65 \text{ хв}$$

Час іонообмінної хроматографії з урахуванням елюювання (час елюювання пропорційний часу подачі розчину на колонку, оскільки швидкість проходження процесів однакова):

$$t_{x1} = (V_{p1} / w_{x1}) \times 2 = (19,5 / 0,3) \times 2 = 130 \text{ хв}$$

Оскільки фільтрат подається з установки одразу на колонку, то час, затрачений на фільтрування не враховуємо в загальному часі.

Вважаємо апарати для хроматографії обраними правильно, оскільки вони дозволяють прискорити процес, зробити його безперервним та забезпечують порівняно високу продуктивність іонообмінного хроматографа.

Розраховуємо фільтрувальну систему перед ВЕРХ та рідинний хроматограф. Відома швидкість подачі розчину на апарати $w_{x2} = 0,8$ л/хв.

Час, необхідний на здійснення фільтрації:

$$t_{ф2} = V_{p2} / w_{x2} = 19,5 / 0,8 = 25 \text{ хв}$$

Час іонообмінної хроматографії з урахуванням елюювання (загальний час елюювання в два рази швидший оскільки дві колонки працюють паралельно):

$$t_{x2} = (V_{p2} / w_{x2}) \times 1,5 = (19,5 / 0,8) \times 1,5 = 37 \text{ хв}$$

Оскільки фільтрат подається з установки одразу на колонку, то час, затрачений на фільтрування не враховуємо в загальному часі.

Вважаємо апарати для рідинної хроматографії обраними правильно, оскільки вони дозволяють прискорити процес, зробити його безперервним та забезпечують високу продуктивність іонообмінного хроматографа.

7.12.11. Розрахунок ліофільної сушарки

Приймемо температуру на вході за рахунок створення вакууму $t_{1в} = -20^{\circ}\text{C}$, на виході $t_{2в} = 30^{\circ}\text{C}$, температуру висушеного матеріалу не повинною перевищувати $t_{пр} = 25^{\circ}\text{C}$. Середня питома продуктивність сушарки за вологою, що випаровується:

$$G_{сер} = 0,05 \times [(t_{1в} + t_{2в}) / 2 - t_{пр}] = 0,05 \times [(-20 + 30) / 2 - 25] = 3,75 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$$

РОЗДІЛ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в *табл.*

8.1:

Таблиця 8.1

Позиція	Найменування	Кі-сть	Технічна характеристика
Д-1 Д-13 Д-15 Д-18 Д-39 Д-43 Д-46 Д-49 Д-52 Д-55 Д-59	Об'ємно-ваговий дозатор	11	Об'ємно-ваговий дозатор FlexWX «Флексмаш» (Україна), нержавіюча сталь AISI 304, похибка 1,5%, зміна температури та густини не впливає на точність *****
3-2	Збірник для приготування розчину миючого засобу «Десо»	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 50 л, габарити 0,32×0,64 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений сорочкою та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *
ПЗ-3	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень
Ф-4	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр ФПО ФА-3 «Уралкомпресормаш» (Росія), 138×385×424 мм, площа фільтрації 3 м ² , корпус нержавіюча сталь, матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е = 80 % ****
К-5	Компресор	1	Компресор КВ 7 «АСО» (Росія), пропускна здатність 250 л/хв, робочий тиск 10 бар, 620×700×1260 мм, високоякісна нержавіюча сталь ****
Т-6	Теплообмінник-охолоджувач	1	Осушувач ОВ 42 «АСО» (Росія), пропускна здатність 700 л/хв, робочий тиск 16 бар, 440×570×440 мм, високоякісна нержавіюча сталь, потужність 0,2 кВт ****

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Ткачова В. І.			РОЗДІЛ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Лім.	Арк.
Перевір.		Скороцька О. І.					131
Реценз.						Кафедра БТМ	
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т. П.					

Р-7	Ресивер	1	Ресивер вертикальний РВ 110/10 «АСО» (Росія), об'єм 110 л, робочий тиск 10 бар, 600×600×1000 мм, високоякісна нержавіюча сталь ****
Т-8	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник HF75 «Pahlen» (Швеція), пропускна здатність 600 л/хв, робочий тиск 10 бар, 702×139 мм, високоякісна нержавіюча сталь, потужність 75 кВт *****
Ф-9	Головний фільтр тонкої очистки	1	Фільтри ФТОП Н12 СКБ «Технофільтр» (Україна), 305×305×78 мм, площа фільтрації 2,7 м ² , пропускна здатність 270 м ³ , корпус нержавіюча сталь, матеріал мікроскловолокно, Е = 95% ***
З-10	Збірник для приготування композиції В для вирощування в посівному апараті	1	Збірник NLF «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 10 л. Робочий об'єм 6,5 л, габарити 0,2×0,4 м, нержавіюча сталь 316 L, потужність 0,75 кВт, оснащений гвинтовою мішалкою, швидкість обертання 200 об/хв **
Ф-11 Ф-16 Ф-19 Ф-21 Ф-27 Ф-34	Фільтри індивідуальної очистки	6	Фільтри НЕРА Н14 СКБ «Технофільтр» (Україна), 305×305×78 мм, площа фільтрації 2,7 м ² , пропускна здатність 270 м ³ , корпус нержавіюча сталь, матеріал мікроскловолокно, Е = 99,999 % ***
ПА-12	Посівний апарат	1	Ферментер L1523 «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 10 л. Робочий об'єм 6,5 л, габарити 0,2×0,4 м, скло/сталь - опукле сталеве дно, скляний циліндр, сталева кришка - нержавіюча сталь марки 316 L, скло Duran, потужність 0,75 кВт, оснащений сорочкою та гвинтовою мішалкою, швидкість обертання 200 об/хв **
З-14	Збірник для приготування композиції В для виробничого біосинтезу	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 30 л, робочий об'єм 20 л, габарити 0,27×0,4 м, нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *
З-17 З-20	Збірник для приготування підживлюючого розчину	2	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 30 л, робочий об'єм 20 л, габарити 0,27×0,4 м, нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *

ФР-22	Ферментер	1	Р-пілотний ферментер «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 100 л. Робочий об'єм 65 л, габарити 0,4×0,8 м, нержавіюча сталь 316 L, потужність мотора 3 кВт, оснащений сорочкою та гвинтовою мішалкою, швидкість обертання 200 об/хв [19]
Н-23 Н-25 Н-30 Н-33 Н-38 Н-48 Н-51 Н-58	Відцентровий насос з магнітною муфтою	8	Відцентровий насос з магнітною муфтою MPC042 «La Fonte» (Італія), потужність мотора 0,12 кВт, пропускна здатність 1,8 м ³ /год, поліпропілен *****
Ц-24	Пілотна проточна центрифуга	1	Пілотна проточна центрифуга CERA Z 61 «Біотехно» (Україна), протока мін/макс 50/1500 л/год, габарити 81×130×50 см, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь 1.4571, швидкість до 17 000 об/хв, потужність 1,5 кВт, вага 350 кг, оснащена сорочкою та вакуумною системою [32]
З-26	Збірник для розведення	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 50 л, габарити 0,32×0,64 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений сорочкою та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *
Г-28	Гомогенізатор високого тиску	1	Гомогенізатор Ariete NS3015 «GEA» (Італія), продуктивність до 4 500 л/год, тиск 100-1500 бар, змашувальна і охолоджуюча вода 90 л/год, хід 60 мм, потужність до 15 кВт, вага 1000 кг, матеріал нержавіюча сталь 316L [343]
Н-41	Шестерний насос	1	Шестерний насос реверсивний ALP1-D2 «Marzocchi Pompe S.p.A.» (Італія) об'ємом 1,4 м ³ , продуктивність 2 л/хв, тиск 250/270/290 бар, швидкість обертання 1500-6000 об/хв *****
Ц-29 Ц-32 Ц-36	Пілотна проточна центрифуга	3	Пілотна проточна центрифуга CERA Z 41 «Біотехно» (Україна), протока мін/макс 20/500 л/год, габарити 81×117×35 см, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь 1.4571, швидкість до 20 000 об/хв, потужність 0,9 кВт, вага 290 кг, оснащена сорочкою та вакуумною системою [34]
З-31	Збірник для розділення залишків клітин та тілець включення	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 20 л, робочий об'єм 15 л, нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений сорочкою та перемішувачем пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *

З-35	Збірник для розчинення та ренатурації	1	Збірник NLF «Bioengineering AG» (Швейцарія) об'ємом 10 л. Робочий об'єм 6,5 л, габарити 0,2×0,4 м, нержавіюча сталь 316 L, потужність 0,75 кВт, оснащений гвинтовою мішалкою, швидкість обертання 200 об/хв **
З-40	Збірник для ферментативної конверсії та розчинення перед іонообмінною хроматографією	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 30 л, робочий об'єм 20 л, габарити 0,27×0,4 м, нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *
З-37	Збірник для 2-пропанолу	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 600 л, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт *
ФС-42 ФС-54	Пілотна система для мікрофільтрації	2	Пілотна система для мікрофільтрації УФ-201 «Біотехно» (Україна), місткість 120 л, швидкість подачі до 37,85 л/хв, габарити 749,3×548,6×1300 мм, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура корпусу до +60°C, вага 200 кг [35]
З-44 З-56	Збірник для буферного розчину для промивки	2	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 50 л, робочий об'єм 40 л, габарити 0,32×0,64 м, нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *
З-45 З-57	Збірник для сорбенту	2	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 30 л, габарити 0,27×0,4 м, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт *
З-47	Збірник для приготування розчину для елюювання	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 600 л, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *
ІХС-50	Іонний хроматограф середнього тиску	1	Іонний хроматограф середнього тиску ÄKTA pure 150 M «GE Healthcare» (США), швидкість потоку 0,01 – 300 мл/хв, габарити 535×470×629 мм, матеріал – скло, нержавіюча сталь, потужність до 250 Вт, тиск до 5 МПа, рН 0 – 14, вага 53 кг, оснащений клапаном вприскування [КВ], двома іонообмінними колонками [К1, К2], насосом [Н], ультрафіолетовим [УФД] та фотометричним [ВД]

			детекторами, монітором [М], фракційною камерою [Фр] [36, 37]
З-53	Збірник для розчинення перед ВЕРХ	1	Збірник «Стройторгсервіс» (Україна) об'ємом 30 л, робочий об'єм 20 л, габарити 0,27х0,4 м, нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, потужність мотора 1,5 кВт, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм, швидкість перемішування 100 об/хв *
ВРХС-60	Система для ВЕРХ	1	Система для ВЕРХ Prochrom Varicol 6-150 «Біотехно» (Україна), продуктивність 10 – 200 кг/тиждень, габарити (Ш×В×Г) 200×200×100 см, матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, тиск 50 – 100 бар, температура +15 – +50°C, діаметр колони 110 – 150 мм, кількість колон 5-6 шт, вага 500 кг, оснащений клапаном вприскування [КВ], двома іонообмінними колонками [К1, К2], насосом [Н1, Н2], ультрафіолетовим [УФД1, УФД2] та фотометричним [ВД1, ВД2] детекторами, монітором [М], фракційною камерою [Фр1, Фр2] [39]
ЛС-61	Ліофільна сушарка	1	Ліофільна сушарка LP50R «Біотехно» (Україна), місткість 60 л, габарити камери 800×800×20 мм, габарити полиць 800×800 мм, загальна площа полиць 2,8 м ² , матеріал - нержавіюча кислотостійка сталь AISI 316L, температура -40 – +75°C, об'єм конденсатора 50 л, кількість полиць 7 шт, вакуумний насос Edwards 841 л/хв [41]
ФМ-62	Фасувальна машина для сипучих матеріалів	1	Фасувальна машина для сипучих матеріалів НВП «Техновaги» (Україна), дозування від 2 до 500 г, вагове дозування, матеріал – нержавіюча сталь, дискретність 0,1 г, продуктивність до 10 уп./хв [43]
ЕПС-63	Електронно-променевий стерилізатор	1	Електронно-променевий стерилізатор ЕЛС-900 «НИИЭФА им. Д.В. Ефремова» (Україна), габарити (В х Ш х Д) 1200×800×2100 мм, габарити камери 600×300×100 мм, витрати води на охолодження 15 л/хв, середня енергія прискорених електронів 3 МеВ, потужність 12 кВт, вага 2500 кг [44]

Примітка: згідно джерел: * <https://stprom.com.ua/>, ** <http://www.bioengineering.su/>, ***

<https://tehnofilter.ub.ua/ua/>, **** <https://b-compressor.ru/>, ***** <https://prom.ua/>, *****

<https://flexmash.com/>, ***** <https://hydromarket.com.ua>

РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІНСУЛІНУ

Технологічна схема одержання інсуліну з *Escherichia coli* 20 IBA 1 включає допоміжні роботи – санітарну підготовку виробництва, підготовку аераційного повітря, підготовку реагентів, підготовку і стерилізацію розчинів титрувальних агентів, підживлюючих розчинів для процесу біосинтезу, розчинів мікроелементів, поживних середовищ для культивування в колбах на качалці, посівному апараті та ферментері, та саме технологічний процес - підготовку посівного матеріалу, біосинтез інсуліну, відділення біомаси, руйнування клітин *Escherichia coli* 20 IBA 1, розчинення та ренатурацію тілець включення, ферментативну конверсію, іонообмінну та високоефективну рідинну хроматографію, висушування інсуліну. Технологічна схема включає стадії пакування, а саме пакування та стерилізацію готового продукту, та знешкодження газоподібних, рідких і твердих відходів.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка миючих та дезінфікуючих засобів

ДР 1.1.1. Приготування 0,2% розчину хлорантоїну для дезінфекції

Робочий розчин хлорантоїну концентрацією 0,2% готують з порошку. У відро на 10 л вносять 20 г хлорантоїну та додають 9,98 л води питної. Перемішують до повного розчинення порошку.

ДР 1.1.2. Приготування 0,5% розчину миючого засобу "Десо"

Робочий розчин "Десо" концентрацією 0,5% готують з концентрованого розчину. Для ручної мийки у відро на 10 л вносять 500 мл засобу та додають 9,5 л води питної, перемішують. Для автоматичної мийки у збірник з нержавіючої сталі [3-2] об'ємом 50 л за допомогою об'ємного дозатора [Д-1] вносять 2,5 л концентрованого розчину. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв додають 47,5 л води питної. Зі збірника миючий розчин подають самопливом в апарати.

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІНСУЛІНУ		
Розроб.		Ткачова В. І.					
Перевір.		Скороцька О. І.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т. П.					
					Літ.	Арк.	Акрушіє
						136	22
					Кафедра БТМ		

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання

Використовуючи 0,2% розчин хлорантоїну (від ДР 1.1.1) прибирають підлогу, зовнішні поверхні обладнання, трубопроводів і комунікацій, змочують килимки при вході в усі приміщення. Якість прибирання контролюють роблячи змиви, КУО < 800/см².

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання

Використовуючи 0,2% розчин хлорантоїну (від ДР 1.1.1) прибирають підлогу, двері, стіни, вікна, зовнішні поверхні обладнання, трубопроводів і комунікацій, змочують килимки при вході в усі приміщення. Після прибирання звільняють приміщення та вмикають ультрафіолетову лампу. Якість прибирання контролюють роблячи змиви, КУО < 300/см².

ДР 1.3. Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1. Миття

Миття здійснюють за допомогою 0,5% розчину мийного засобу «Десо» (від ДР 1.1.2). Збірники вмістом до 50 л включно та посівний апарат розбирають та миють ручним способом впродовж 15 хв, потім ополіскують водою впродовж 5 хв за температури 60°C. В ферментер, центрифуги, фільтрувальні установки, гомогенізатор, хроматографічні системи, збірники об'ємом більше 50 л, ліофільну сушарку миючий засіб подають самопливом зі збірника [3-2], потім ополіскують водою. Відпрацьовану воду зливають в каналізацію.

ДР 1.3.2. Технічний огляд

Технічний огляд здійснюють візуально. У разі знаходження видимих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.3. Перевірка на герметичність

На апараті закривають усю запірну арматуру, подають аераційне повітря до надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Перекривають вентиль подачі повітря та фіксують покази манометра та час витримки (30–60 хв) в операційному журналі. Якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа, вважають, що апарат герметичний. У

випадку перевищення цього значення здійснюють пошук неущільнень в апараті та місцях з'єднання запірної арматури з комунікаціями галогеновими течієпошукачами. Перед набором тиску вносять чотирихлорний карбон, закривають всю запірну арматуру, апарат нагрівають (до 80°C) та збільшують тиск в апараті (до 0,2 МПа). При цьому пари чотирихлорного карбону проникають через неущільнення і виявляються у разі наближення щупа течієпошукача до них. Тривалість перевірки одного апарату становить 60 хв.

ДР 1.3.4. Стерилізація

В сорочку апарата подають насичену пару та прогрівають апарат до температури 80–90°C. Відкривають усю запірну арматуру на відкритих трубних закінченнях та підведених до апарата комунікаціях і подають гостру пару безпосередньо в апарат через барботер або нижній спуск, попередньо відкривши вентиль виходу відпрацьованого повітря для видалення повітря з апарату. При досягненні в апараті температури стерилізації ($t = 130\text{--}135^\circ\text{C}$) закривають усю запірну арматуру на апараті, крім парової, і витримують заданий час стерилізації (60 хв). При стерилізації апарата паралельно стерилізують індивідуальні фільтри стерильного та відпрацьованого повітря. Закривають усю запірну арматуру та арматуру подачі пари в апарат. У сорочку подають холодна вода. Для компенсації падіння тиску (утворення вакууму при конденсації пари в апараті) в апарат подають стерильне повітря. Процес охолодження здійснюють до досягнення температури 30–40°C і надлишкового тиску $P = 0,003\text{--}0,005$ МПа.

ДР 2. Підготовка аераційного повітря

ДР 2.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби повітрезабірником [ПЗ-3], який знаходиться на 3 м вище від рівня даху будівлі, де розміщене обладнання для стиснення та очищення повітря.

ДР 2.2. Очищення повітря від пилу і механічних часток

Першочергово повітря очищають від пилу ($\delta > 50$ мкм) на тканинних фільтрах грубого очищення [Ф-4]. Ступінь очищення становить 80%.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Проводять стиснення повітря в компресорі [К-5] до тиску $P=0,35$ МПа, під час чого повітря нагрівається до температури 120-250°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря та видалення вологи

Охолодження стисненого повітря до температури "точки роси" (25-30°C), за якої волога повітря конденсується, здійснюють у водяному теплообміннику [Т-6]. Зайву вологу видаляють у краплевловлювачі ресивера [Р-7], де зменшують пульсації руху повітря, що можуть негативно впливати на роботу наступних фільтрів очищення повітря. Вологість повітря має становити 60-70%.

ДР 2.5. Нагрівання повітря

Повітря нагрівають до температури 45-50°C паром теплообмінника [Т-8] для стабілізації показників тиску та температури. Вологість повітря має становити 50%.

ДР 2.6. Очищення повітря на головному фільтрі

Очищають повітря у головних ємнісних набивних фільтрах [Ф-9], які встановлюють поблизу ферментаційних відділень, до ступеня очищення $E = 95\%$.

ДР 2.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Повітря від головних фільтрів подають через трубопроводи до індивідуальних фільтрів [Ф-11, Ф-16, Ф-19, Ф-21], встановлених безпосередньо перед кожним апаратом, в якому необхідне повітря. При цьому повітря очищають до ступеня очищення $E = 99,99\%$.

ДР 3. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 3.1. Приготування розчинів хлоридної кислоти

ДР 3.1.1. Приготування 16% розчину хлоридної кислоти для посівного апарату об'ємом 10 л

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 50 мл вносять 6,8 мл води дистильованої, тільки після чого піпеткою при постійному перемішуванні додають 5,2 мл 37% розчину хлоридної кислоти. Для уникнення сильної екзотермічної реакції рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.2. Приготування 16% розчину хлоридної кислоти для ферментера об'ємом 100 л

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 250 мл вносять 68 мл води дистильованої, після чого за допомогою циліндра при постійному перемішуванні додають 52 мл 37% розчину хлоридної кислоти. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.3. Приготування 16% розчину хлоридної кислоти для стадій виділення інсуліну

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 500 мл вносять 158,9 мл води дистильованої, тільки після чого піпеткою при постійному перемішуванні додають 121,1 мл 37% розчину хлоридної кислоти. Для уникнення сильної екзотермічної реакції рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.4. Приготування розчину 2 М хлоридної кислоти

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 100 мл вносять 64,2 мл води дистильованої, тільки після чого піпеткою при постійному перемішуванні додають 15,8 мл 37% розчину хлоридної кислоти. Для уникнення сильної екзотермічної реакції рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.1.5. Приготування розчину 6 М хлоридної кислоти

Під витяжною шафою в колбу об'ємом 50 мл вносять 16,3 мл води дистильованої, тільки після чого піпеткою при постійному перемішуванні додають 23,7 мл 37% розчину хлоридної кислоти. Для уникнення сильної екзотермічної реакції рідини обов'язково змішують в такому порядку, а не навпаки. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2. Приготування та стерилізація розчинів амонію гідроксиду

ДР 3.2.1. Приготування та стерилізація 16% розчину амонію гідроксиду для посівного апарату об'ємом 10 л

На технічних вагах зважують 1,9 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 50 мл. Доливають 10,1 мл води дистильованої, перемішують. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2.2. Приготування та стерилізація 16% розчину амонію гідроксиду для ферментера об'ємом 100 л

На технічних вагах зважують 19 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 50 мл. Доливають 101 мл води дистильованої, перемішують. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2.3. Приготування та стерилізація 16% розчину амонію гідроксиду для стадій виділення інсуліну

На технічних вагах зважують 51,2 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 1 л. Доливають 268,8 мл води дистильованої, перемішують. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 3.2.4. Приготування та стерилізація розчину 5 М амонію гідроксиду

На технічних вагах зважують 8,75 г амонію гідроксиду, вносять у колбу об'ємом 100 мл. Доливають 31,25 мл води дистильованої, перемішують. Стерилізують фільтрацією з використанням гладкого фільтрувального паперу. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4. Підготовка розчинів реагентів

ДР 4.1. Приготування розчину 20 мМ Тріс

На технічних вагах зважують 75 г тріс (гідроксиметил) амінометану та вносять в колбу на 500 мл. Доливають 175 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4.2. Приготування розчинів 50 мМ Тріс-гідрохлориду

ДР 4.2.1. Приготування розчинів 50 мМ Тріс-гідрохлориду для промивання тілець включення

На технічних вагах зважують 78 г Тріс-гідрохлориду та вносять в колбу на 1 л. Доливають 422 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою. Готують 3 таких розчини.

ДР 4.2.2. Приготування розчинів 50 мМ Тріс-гідрохлориду для розчинення перед хроматографією

На технічних вагах зважують 156 г Тріс-гідрохлориду та вносять в колбу на 1 л. Доливають 344 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою. Готують 2 таких розчини.

ДР 4.3. Приготування розчинів ЕДТА

ДР 4.3.1. Приготування розчину 1 мМ ЕДТА для розчинення перед гомогенізацією

На технічних вагах зважують 9 г етилендіамінтетраоцтової кислоти та вносять в колбу на 100 мл. Доливають 41 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою. Готують 2 таких розчини.

ДР 4.3.2. Приготування розчину 0,2 мМ ЕДТА

На технічних вагах зважують 1 г етилендіамінтетраоцтової кислоти та вносять в колбу на 100 мл. Доливають 49 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4.3.3. Приготування розчину 1 мМ ЕДТА для розчинення перед хроматографією

На технічних вагах зважують 6 г етилендіамінтетраоцтової кислоти та вносять в колбу на 100 мл. Доливають 44 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4.4. Приготування розчинів хлориду натрію

ДР 4.4.1. Приготування розчину 0,1 М хлориду натрію

На технічних вагах зважують 180 г хлориду натрію та вносять в колбу на 1 л. Доливають 320 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4.4.2. Приготування розчинів 0,5 М хлориду натрію

На технічних вагах зважують 292 г хлориду натрію та вносять в колбу на 1 л. Доливають 708 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою. Готують 3 таких розчини.

ДР 4.4.3. Приготування розчину хлориду натрію для елюювання

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-46] 12,8 кг хлориду натрію, вносять в збірник [З-47]. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 487,2 л води питної.

ДР 4.5. Приготування розчину 12 мМ гідрокарбонату натрію

На технічних вагах зважують 10 г гідрокарбонату натрію та вносять в колбу на 250 мл. Доливають 90 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4.6. Приготування розчину 1,5 мМ цинку

На технічних вагах зважують 1 г цинку та вносять в колбу на 100 мл. Доливають 49 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4.7. Приготування розчину 0,05 М ацетату натрію

На технічних вагах зважують 41 г ацетату натрію та вносять в колбу на 500 мл. Доливають 209 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Колбу закривають скляною пробкою.

ДР 4.8. Приготування буферних розчинів для промивання хроматографічних колонок

ДР 4.8.1. Приготування буферного розчину для промивання колонок іонообмінного хроматографа

На технічних вагах зважують 312 г Тріс-гідрохлориду, 12 г ЕДТА вносять в колбу на 2 л. Доливають 676 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Вміст колби вносять у збірник [З-44] об'ємом 50 л. Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-43] подають 12,8 л 99% розчину 2-пропанолу зі збірника [З-37] насосом [Н-41]. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 26,2 л води питної. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3).

ДР 4.8.2. Приготування буферного розчину для промивання колонок високоефективного рідинного хроматографа

На технічних вагах зважують 164 г ацетату натрію, вносять в колбу на 1 л. Доливають 336 мл води дистильованої. Перемішують на магнітній мішалці. Вміст колби вносять у збірник [З-56] об'ємом 50 л. Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-55] подають 4 л 99% розчину 2-пропанолу зі збірника [З-37] насосом [Н-41]. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 35,5 л води питної. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3).

ДР 5. Приготування та стерилізація підживлюючих розчинів для культивування в ферментері об'ємом 100 л

Через різне внесення глюкози протягом виробничого біосинтезу, необхідно приготування двох розчинів, вміст сухих компонентів наведено в *табл. 9.1*.

Таблиця 9.1

Компонент підживлюючого розчину	Концентрація, г/л	Загальний вміст компонента на 51 л середовища, г
Глюкоза	101,42	5 173,42
Пролін	149,9	7 644,9

ДР 5.1. Приготування та стерилізація 50% розчину проліну для підживлення при виробничому біосинтезі в ферментері об'ємом 100 л

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-15] в збірник [З-17] об'ємом 30 л вносять 7 644,9 г проліну. Додають 7,65 л води питної, перемішують до повного розчинення за допомогою мішалки (50-100 об/хв) при температурі 40°C. Стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112°C.

ДР 5.2. Приготування та стерилізація 40% розчину глюкози для підживлення при виробничому біосинтезі в ферментері об'ємом 100 л

Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-18] в збірник [З-20] об'ємом 30 л вносять 5 173,42 г глюкози. Додають 7,76 л води питної, перемішують до повного розчинення за допомогою мішалки (50-100 об/хв) при температурі 40°C. Стерилізують гострою парою 30 хв при температурі 112°C.

ДР 6. Приготування та стерилізація розчинів мікроелементів

ДР 6.1. Приготування та стерилізація концентрованого розчину мікроелементів

На технічних вагах зважують 2,5 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 мг H_3BO_3 , 10 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 мг $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 г MnCl_2 , 10 мг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 мг біотину та 0,1 г тіаміну, вносять у колбу об'ємом 2 л. Доливають 996 мл води дистильованої, перемішують. Вміст колби стерилізують фільтрацією з

використанням гладкого фільтрувального паперу та закривають ватно-марлевою пробкою.

ДР 6.2. Приготування та стерилізація концентрованого розчину тіаміну

На технічних вагах зважують 2 г тіаміну вносять у колбу об'ємом 250 мл. Доливають 98 мл води дистильованої, перемішують. Вміст колби закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 100°C.

ДР 7. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 7.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалці

На першій стадії необхідно приготувати 500 мл поживного середовища. Вміст тетрацикліну та обох розчинів мікроелементів дуже малий, тому при розрахунку об'ємів композицій вони не враховуються. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в *табл. 9.2*.

Таблиця 9.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 500 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 500 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Глутамінова кислота	1,0	0,5	А	150
Пролін	0,6	0,3		
Манітол	10,0	5,0		
K ₂ HPO ₄	1,0	0,5	В	100
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2	0,1	С	250
CaCl ₂	0,04	0,02		
Всього 500 мл				

ДР 7.1.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 0,5 г глютамінової кислоти, 5,0 г манітолу, 0,3 г проліну. Наважки вносять в колбу на 500 мл, додають 144 мл води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 112°C.

ДР 7.1.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 0,5 г K_2HPO_4 . Наважку переносять в колбу на 250 мл, додається 99,5 мл води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131°C.

ДР 7.1.3. Приготування і стерилізація композиції С

На технічних вагах зважують 0,1 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02 г $CaCl_2$. Наважки переносять в колбу на 500 мл, додають 249,9 мл води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 40 хв при 131°C.

ДР 7.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті на 10 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті на 10 л потребує 5,6 л поживного середовища. Вміст тетрацикліну та мікроелементів дуже малий, тому при розрахунку об'ємів композицій вони не враховуються. Крім того, 10% (0,5 л) припадає на посівний матеріал, 10% композиції В (0,5 л) - на конденсат, який утворюється під час стерилізації середовища, що також враховується при складанні композицій. Вміст компонентів для цієї стадії наводимо в *табл. 9.3*.

Таблиця 9.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,6 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 5,6 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
--------------------------------	-------------------	--	------------	----------------------

Глутамінова кислота	1,0	5,6	А	100
Пролін	0,6	3,36		
Манітол	10,0	56		
K ₂ HPO ₄	1,0	5,6	В	5 000
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2	1,12		
CaCl ₂	0,04	0,22		
Всього 5,1 л				

ДР 7.2.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 5,6 г глутамінової кислоти, 56 г манітолу, 3,36 г проліну. Наважки вносять в колбу на 250 мл, додають 35 мл води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 112°C.

ДР 7.2.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 1,12 г MgSO₄ • 7H₂O, 0,22 г CaCl₂, 5,6 г K₂HPO₄. Наважки вносять в збірник [3-10] об'ємом 10 л. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 4,5 л води питної. Паралельно в збірник подають глуху пару для підвищення температури в збірнику до рівня 40°C, оскільки при такій температурі розчинність солей буде краща. Після розчинення композицію подають в посівний апарат [ПА-12] об'ємом 10 л самопливом, де підкислюють 16% розчином хлоридної кислоти (від ДР 3.1.1) до рН 4,0 – 4,5 з метою запобігання утворенню нерозчинних комплексів. Стерилізують композицію подачею гострої пари 40 хв при температурі 131°C.

ДР 7.3. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу проінсуліну в ферментері на 100 л

Для процесу біосинтезу необхідно 51 л поживного середовища, K₃ = 0,51. Вміст композицій при процесі біосинтезу дещо змінюється. Вміст мікроелементів дуже малий, тому при розрахунку об'ємів композицій вони не враховуються. Крім того,

10% (5 л) припадає на посівний матеріал та 10% композиції В (1,6 л) і 10% підживлюючих розчинів (2,8 л) - на конденсат, який утворюється під час стерилізації гострою парою, що також враховується при складанні композицій. При розрахунку об'єму композицій необхідно також враховувати об'єм підживлюючих розчинів, що використовують при біосинтезі. Вміст компонентів для цієї стадії наведено в *табл. 9.4*.

Таблиця 9.4

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 51 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 51 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, л
Глюкоза	8,0	408	А	2,5
Глутамінова кислота	1,0	51		
Манітол	10,0	510		
K ₂ HPO ₄	1,0	51	В	15,9
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2	10		
CaCl ₂	0,04	2		
Глюкоза			Підживлюючі розчини	28,2
Пролін				
Разом:				46,6 л

ДР 7.3.1. Приготування і стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 408 г глюкози, 51 г глутамінової кислоти, 510 г манітолу. Наважки вносять в колбу на 5 л, додають 1,53 л води дистильованої, перемішують, колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Стерилізують в автоклаві 30 хв при температурі 112°C.

ДР 7.3.2. Приготування і стерилізація композиції В

На технічних вагах зважують 10 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 г CaCl_2 , 51 г K_2HPO_4 . Наважки вносять в збірник [З-14] через об'ємно-ваговий дозатор [Д-13] об'ємом 30 л. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв через об'ємно-ваговий дозатор подають 15,3 л води питної. Паралельно в збірник подають глуху пару для підвищення температури в збірнику до рівня 40°C, оскільки при такій температурі розчинність солей буде краща. Після розчинення солі подають в ферментер [ФР-22] об'ємом 100 л самопливом, де підкислюють 16% розчином HCl (від ДР 3.1.2) до рН 4,0 – 4,5 з метою запобігання утворенню нерозчинних комплексів. Стерилізують композицію подачею гострої пари 40 хв при температурі 131°C.

ТП 8. Підготовка посівного матеріалу

ТП 8.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Escherichia coli* 20 ІВА 1 зберігають в ампулах з гліцерином при температурі -80°C. У роботі з колекційною культурою дотримуються асептичних умов.

ТП 8.2. Одержання культури в рідкому середовищі

Для активації колекційної культури, що зберігають в ампулах з гліцерином, необхідно додати в ампулу стерильне рідке середовище LB в кількості 1 мл. Суспензію з середовищем перемішують в ампулі, переносять в пробірку з 5 мл рідкого стерильного LB. Вміст пробірки ретельно перемішують. Відбирають пробу 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти.

ТП 8.3. Одержання робочої культури

Вміст пробірки (від ТП 8.2) кількістю 0,2 мл піпеткою переносять в пробірки з напіврідким стерильним LB. Вирощують 24 год при 30°C. Після цього відбирають проби по 0,1 мл з пробірки на встановлення мікробіологічної чистоти.

ТП 8.4. Вирощування культури в колбах на качалці

В колбу з композицією С (від ДР 7.1.3) в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 7.1.1), композицію В (від ДР 7.1.2), 0,5 мл концентрованого розчину мікроелементів (від ДР 6.1), 0,05 мл концентрованого розчину тіаміну (від

ДР 6.2) та 5 мл розчину тетрацикліну. Середовище розливають по 150 мл в 2 колби ємністю 750 мл для вирощування на качалці.

З пробірок із робочою культурою *Escherichia coli* 20 IBA 1 відбирають піпетками бактеріальну суспензію та вносять в колби з поживним середовищем, при чому одна пробірка використовується для засіву однієї колби. Культивування проводять 18 год [4] за температури 30°C при перемішуванні 200 об/хв. Після цього відбирають проби по 0,1 мл з колби на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (має бути 0,5-1,0 г/л).

Після проведення мікробіологічного контролю посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу об'ємом 1 л.

ТП 8.5. Вирощування культури в посівному апараті 10 л

В стерильну засівну колбу на 1 л в асептичних умовах вносять композицію А (від ДР 7.2.1), 5,6 мл концентрованого розчину мікроелементів (від ДР 6.1), 0,56 мл концентрованого розчину тіаміну (від ДР 6.2) та 56 мл розчину тетрацикліну.

В посівний апарат [ПА-12] зі стерильною композицією В (від ДР 7.2.2) в асептичних умовах вносять вміст засівної колби. Додають 16% розчин NH_4OH (від ДР 7.2.1) для доведення рН до 7,0, після чого з засівної колби вносять посівний матеріал (від ТП 8.4).

Культивування проводять 18 год [4] за температури 30°C при перемішуванні 200 об/хв. Кожні 9 год відбирають проби по 0,1 мл на встановлення мікробіологічної чистоти, а також проби для визначення рівня біомаси (на кінець культивування має бути 0,5-1,0 г/л).

ТП 9. Біосинтез

Виробниче культивування здійснюють в ферментері [ФР-22] з робочим об'ємом 53 л. В ферментер, зі стерильною композицією В (від ДР 7.3.2) в асептичних умовах подають композицію А (від ДР 7.3.1) та 53 мл концентрованого розчину мікроелементів (від ДР 6.1). Для нейтралізації середовища в ферментер подають 16% розчин NH_4OH (від ДР 3.2.2) до значення рН рівного 7,0. Через трубу перетиснення з посівного апарату [ПА-12] в ферментер подають посівний матеріал (від ТП 8.5).

Культивування триває 20 год при температурі 37°C з постійною аерацією, перемішуванням 200 об/хв. Перші 15 год культивування зі збірника [З-17] самопливом вносять підживлюючий розчин проліну (від ДР 5.1) по 24 мл/л кожні 1 год 15 хв. 40% розчин глюкози (від ДР 5.2) подають зі збірника [З-20] самопливом кожну годину. Перші 15 год підтримують концентрацію глюкози на рівні 8 г/л, далі на годину припиняють подачу, останні 4 години підтримують глюкозу на рівні 3 г/л.

Кожні 5 годин з ферментера відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси. Показники умов культивування регулюються за допомогою автоматичних датчиків температури, тиску, рН протягом всього процесу виробничого культивування. Виробничий біосинтез завершують при досягненні концентрації біомаси 56 г/л та концентрації інсуліну – 14,5 г/л.

ТП 10. Відділення біомаси центрифугуванням культуральної рідини

Після виробничого біосинтезу з ферментера [ФР-22] насосом [Н-23] подають культуральну рідину у кількості 50,5 л на проточну центрифугу [Ц-24] зі швидкістю 200 л/год до повного спустошення ферментера. Центрифугування проходить при 15 000 об/хв при 4°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Центрифугат направляють на знешкодження відходів.

ТП 11. Руйнування клітин *Escherichia coli* 20 ІВА 1

ТП 11.1. Розчинення біомаси в холодному буферному розчині

Від центрифуги біомасу у кількості 2,79 л подають в збірник [З-26] насосом [Н-25]. Через гребінку вносять розчини Тріс (від ДР 4.1), ЕДТА (від ДР 4.3.1) та хлориду натрію (від ДР 4.6.1). При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 23,4 л води питної. Розчинення проводять при температурі 10°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3).

ТП 11.2. Руйнування клітинної оболонки на гомогенізаторі з подальшим центрифугуванням

Суспензію у кількості 27,9 л пропускають через гомогенізатор [Г-28] самопливом, після чого подають на центрифугу [Ц-29] зі швидкістю 100 л/год до

повного спустошення гомогенізатора. Центрифугування проходить при 18 400 об/хв при 4°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Центрифугат направляють на знешкодження відходів.

ТП 11.3. Відділення тілець включення

ТП 11.3.1. Перше промивання осаду з подальшим центрифугуванням

Концентровану суспензію у кількості 1 л подають в збірник [З-31] насосом [Н-30]. Через гребінку вносять розчини тріс-гідрохлориду (від ДР 4.2.1) та хлориду натрію (від ДР 4.4.2). Потім подають 1 л 99% розчину Тритону Х-100. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 6,5 л води питної. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3). Розчинення проводять при температурі 10°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Суспензію подають на центрифугу [Ц-32] самопливом зі швидкістю 100 л/год до повного спустошення збірника. Центрифугування проходить при 15 000 об/хв при 4°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Центрифугат направляють на знешкодження відходів.

ТП 11.3.2. Друге промивання осаду з подальшим центрифугуванням

Концентровану суспензію у кількості 0,8 л подають в збірник [З-31] насосом [Н-33]. Через гребінку вносять розчини тріс-гідрохлориду (від ДР 4.2.1) та хлориду натрію (від ДР 4.4.2). При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 5,7 л води питної. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3). Розчинення проводять при температурі 10°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Суспензію подають на центрифугу [Ц-32] самопливом зі швидкістю 100 л/год до повного спустошення збірника. Центрифугування проходить при 15 000 об/хв при 4°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Центрифугат направляють на знешкодження відходів.

ТП 11.3.3. Третє промивання осаду з подальшим центрифугуванням

Концентровану суспензію у кількості 0,6 л подають в збірник [З-31] насосом [Н-33]. Через гребінку вносять розчини тріс-гідрохлориду (від ДР 4.2.1) та хлориду натрію (від ДР 4.4.2). При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 3,9 л води

питної. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3). Розчинення проводять при температурі 10°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Суспензію подають на центрифугу [Ц-32] самопливом зі швидкістю 100 л/год до повного спустошення збірника. Центрифугування проходить при 15 000 об/хв при 4°C. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Центрифугат направляють на знешкодження відходів.

ТП 12. Розчинення тілець включення

Тіляця включення у кількості 0,58 кг після центрифугування передають у збірник [З-35] насосом [Н-33]. Через патрубки вносять розчини гідрокарбонату натрію (від ДР 4.5) та ЕДТА (від ДР 4.3.2). При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 5,05 л води питної. рН доводять до 11,9 5 М гідроксидом амонію (від ДР 3.2.4). Перемішують 45 хв за кімнатної температури. Потім рН доводять до 10,8 за допомогою 2 М хлоридної кислоти (від ДР 3.1.4).

ТП 13. Ренатурація з подальшим центрифугуванням

Для ренатурації розчин залишають в тому ж збірнику на 18 год при постійному перемішуванні та аерації [Ф-34]. Потім рН доводять до 9,0 за допомогою 2 М хлоридної кислоти (від ДР 3.1.4). Центрифугування проводять на проточній центрифугі [Ц-36] 20 000 об/хв при 4°C до повного спустошення збірника. Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Центрифугат направляють на знешкодження відходів.

ТП 14. Ферментативна конверсія

Попередник інсуліну у кількості 0,55 кг після центрифугування передають в збірник [З-40] насосом [Н-38]. Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-39] вносять розчин Тріс-гідрохлориду (від ДР 4.2.2). При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 5,8 л води питної. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3). На технічних вагах зважують 0,25 г трипсину (1:8000; вагове співвідношення трипсин:гібридний білок) та 1 г карбоксипептидази В (1:2000; вагове співвідношення, карбоксипептидаза В:гібридний білок), вносять у збірник через дозатор. Додають розчин цинку (від ДР 4.6). Реакцію ведуть протягом 16 год. при 8°C

і зупиняють шляхом корекції рН до 2,5 за допомогою 6 М хлоридної кислоти (від ДР 3.1.5). Для підтримання температури в сорочку подають холодну воду. Для осадження інсуліну через об'ємно-ваговий дозатор у збірник вносять 2,95 кг хлориду натрію. Після осадження інсуліну надосадову рідину зливають через боковий вентиль.

ТП 15. Очищення інсуліну

ТП 15.1. Іонообмінна хроматографія

ТП 15.1.1. Розчинення інсуліну в буферному розчині

В той же збірник до осаду вносять розчини Тріс-гідрохлориду (від ДР 4.2.2) та ЕДТА (від ДР 4.3.3) через об'ємно-ваговий дозатор [Д-39]. При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 6,4 л 99% розчину 2-пропанолу зі збірника [З-37] насосом [Н-41], а потім 12,5 л води питної. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3).

ТП 15.1.2. Фільтрування

Зі збірника [З-40] розчин самопливом подають на фільтрувальну систему [ФС-42] з фільтром 0,5 мкм до повного спустошення збірника.

ТП 15.1.3. Подача фільтрату на колонку

Колонки самопливом промивають 40 л буфера (від ДР 4.8.1) через об'ємно-ваговий дозатор [Д-49]. Колонки заповнюють 19 л сорбенту М атрех РЕІ-300 зі збірника [З-45] самопливом через дозатор. Відфільтрований розчин інсуліну подають насосом [Н-48] на іонообмінну хроматографічну систему [ІХС-50] через клапан вприскування [КВ], з якого він потрапляє у колонки [К1, К2] зі швидкістю 300 мл/хв. Після адсорбції інсуліну колонки відмивають 40 л буфера (від ДР 4.8.1) для врівноваження.

ТП 15.1.4. Елюювання фракцій

Поліпептид елюють градієнтом (0-0,3 М) концентрацій хлориду натрію. Для цього на іонообмінні колонки [К1, К2] подають розчин хлориду натрію (від ДР 4.4.3) насосом [Н-51] зі швидкістю 300 мл/хв. За допомогою ультрафіолетового [УФД] та фотометричного [ВД] детекторів реєструють вихід білкових піків. При цьому елюований розчин проходить послідовно крізь ці детектори, для чого від колонок його подають насосом [Н]. Результати з детекторів відображаються на під'єднаному

моніторі [М]. Після проходження детекторів білкові фракції направляють у фракційну камеру [Фр], де кожна фракція збирається окремо. Відбирають фракції в межах 0,1-0,2 М хлориду натрію.

ТП 15.2. Високоєфективна рідинна хроматографія

ТП 15.2.1. Розчинення інсуліну в буферному розчині

Інсулін вручну вносять у збірник [З-53]. Через об'ємно-ваговий дозатор [Д-52] подають розчин ацетату натрію (*від ДР 4.7*). При постійному перемішуванні 50-100 об/хв подають 2 л 99% розчину 2-пропанолу зі збірника [З-37] насосом [Н-41], а потім 16,9 л води питної. За необхідності коригують рН титрувальними розчинами (*від ДР 3.1.3, ДР 3.2.3*).

ТП 15.2.2. Фільтрування

Зі збірника [З-53] розчин самопливом подають на фільтрувальну систему [ФС-54] з фільтром 0,2 мкм до повного спустошення збірника.

ТП 15.2.3. Подача фільтрату на колонку

Колонки самопливом промивають 40 л буфера (*від ДР 4.8.2*) через об'ємно-ваговий дозатор [Д-59]. Колонки заповнюють 19 л сорбенту Diasogel SP-120-20-ODS-AP самопливом зі збірника [З-57] через дозатор. Відфільтрований розчин інсуліну подають насосом [Н-58] на високоєфективну рідинну хроматографічну систему [ВРХС-60] через клапан впорскування [КВ], з якого він потрапляє у колонки [К1, К2] зі швидкістю 0,8 л/хв й розподіляється рівномірно по колонкам. Всі наступні процеси в колонках відбуваються паралельно. Після адсорбції інсуліну колонки відмивають 40 л буфера (*від ДР 11.8.2*) для врівноваження.

ТП 15.2.4. Елюювання інсуліну

Елюють інсулін лінійним градієнтом 2-пропанолу (10-28%). Для цього на хроматографічні колонки [К1, К2] подають 99% розчин 2-пропанолу зі збірника [З-37] зі швидкістю 0,8 л/хв. За допомогою ультрафіолетових [УФД1, УФД2] та фотометричних [ВД1, ВД2] детекторів реєструють вихід білкових піків. При цьому елююваний розчин проходить послідовно крізь ці детектори, для чого від колонок його подають насосом [Н1, Н2]. Результати з детекторів відображаються на під'єднаному моніторі [М]. Після проходження детекторів білкові фракції

направляють у фракційні камери [Фр1, Фр2], розташовані під колонками, де кожна фракція збирається окремо. Чистота інсуліну складає 98-99%. Вологий інсулін зберігається в холодильнику до проходження всіх циклів та отримання взагалом 14,5 кг вологого інсуліну.

ТП 16. Висушування інсуліну в ліофільній сушарці

Елюйований інсулін з усіх циклів у кількості 14,5 кг вручну розкладають на полицях ліофільної сушарки [ЛС-61]. Закривають камеру, вмикають сушарку. Висушування проходить за температур -30 – $+30^{\circ}\text{C}$. Після завершення висушування (через 5 год) сушарку вимикають, порошок інсуліну вручну розвантажують із сушарки.

ПМВ 17. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 17.1. Фасування сухого інсуліну в пластикові банки

Сухий порошок інсуліну в кількості 13,6 кг після сушарки вручну засипають у фасувальну машину [ФС-62]. Ставлять дозування 500 г. Вниз апарата ставлять пластикову банку, вмикають апарат, він дозує і засипає порошок в банку. Банку закривають кришкою. Повторюють фасування до повної розфасовки продукту.

ПМВ 17.2. Гама-стерилізація сухого розфасованого інсуліну

Розфасований в пластикові банки інсулін вручну складають в камеру електронно-променевого стерилізатора [ЕПС-63]. Вмикають стерилізатор та запускають проходження гама-променів через продукцію. Після завершення роботи стерилізатора вручну розвантажують його.

ПМВ 17.3. Маркування

Пластикові банки з інсуліном маркують. В маркуванні вказують назву товару, фірмове найменування виробника та місце його знаходження, склад та основні властивості товару, спосіб застосування та умови зберігання, вага, дата та місце виробництва, пакування, правила та умови безпечного використання, термін придатності, наносять ідентифікаційний штрих-код.

ПМВ 17.4. Пакування в картонні коробки

Промарковані пластикові банки з інсуліном вручну складають у картонні коробки, заклеюють коробки клейкою лентою та відвантажують.

ЗВ 18. Знешкодження відходів

ЗВ 18.1. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьоване повітря направляють на фільтруючі системи, де воно очищується. Перевіряють чистоту повітря та потім використовують повторно.

ЗВ 18.2. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи, в тому числі суспензії з залишками біомаси та зруйнованих клітин для знешкодження направляють на біофільтр. Після очищення вони перевіряються на чистоту, після чого можуть бути використані повторно для технічних цілей або спущені у водойми.

ЗВ 18.3. Знешкодження твердих відходів

Відпрацьований фільтрувальний матеріал направляють в контейнер для горючих відходів. Контейнер направляється на установку термічного знешкодження відходів.

Бракований пакувальний матеріал збирають в картонні коробки та без попередньої обробки направляють до пунктів прийому вторинної сировини.

РОЗДІЛ 10. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Таблиця 10.1

10.1. Карта контрольних точок виробництва інсуліну

<i>Номер контрольної точки та назва стадії</i>	<i>Об'єкт контролю та показник, що визначається</i>	<i>Засоби та методи контролю</i>	<i>Періодичність перевірки та відбору проб</i>	<i>Нормативні значення показника</i>
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт ДР 1.1.2. <i>Приготування 0,5% розчину миючого засобу "Десо"</i>	Розчин миючого засобу Частота обертів мішалки	Тахометр технічний	Визначається безперервно	$\omega = 50-100$ об/хв
Км ДР 1.2.1 <i>Щоденне прибирання</i>	Підлога, стіни Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Після прибирання	КУО < 800/см ²
Км ДР 1.2.2 <i>Генеральне прибирання</i>	Підлога, стіни Мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Після прибирання	КУО < 300/см ²
Кт ДР 1.3.1 <i>Миття</i>	Обладнання та комунікації Температура мийного розчину, час миття	Термометр, годинник	Під час миття	t = 60°C, 20 хв

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		
Розроб.		Ткачова В. І.					
Перевір.		Скороцька О. І.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т. П.					
					Лім.	Арк.	Акрушіє
						158	21
					Кафедра БТМ		

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
КТ ДР 1.3.2 <i>Технічний огляд</i>	Обладнання та комунікації Неуцільнення	Візуальний огляд	-	Відсутність неуцільнень
КТ ДР 1.3.3 <i>Перевірка на герметичність</i>	Обладнання та комунікації Тиск, час перевірки, герметичність обладнання	Годинник, манометр	Тиск визначається безперервно під час перевірки	P = 0,2 МПа, 60 хв
КТ, КМ ДР 1.3.4 <i>Стерилізація</i>	Обладнання та комунікації Температура, час стерилізації, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації	t = 130-135°C, 60 хв, відсутність мікробіоти
КТ ДР 2.2 <i>Забір атмосферного повітря</i>	Атмосферне повітря Висота забору	-	При установці труби	H = 8 м
КТ ДР 2.2 <i>Очищення повітря від пилу і механічних часток</i>	Повітря на виході з фільтру грубого очищення Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	E = 80%
КТ ДР 2.3 <i>Стиснення повітря</i>	Стиснене повітря Температура, тиск	Термометр, манометр	Вимірюється після стиснення	t = 120-250°C, P = 0,35 МПа

Кт ДР 2.4 <i>Охолодження повітря та видалення вологи</i>	Охолоджене повітря Температура повітря, частка вологи	Термометр, психрометричний метод	Після охолодження та видалення зайвої вологи	$t = 25-30^{\circ}\text{C}$, $w = 60-70\%$
Кт ДР 2.5 <i>Нагрівання повітря</i>	Нагріте повітря Температура повітря, частка вологи	Термометр, психрометричний метод	Після нагрівання	$t = 50^{\circ}\text{C}$, $w = 50\%$
Кт ДР 2.6 <i>Очищення повітря на головному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	$E = 95\%$
Кт ДР 2.7 <i>Очищення повітря в індивідуальному фільтрі</i>	Очищене повітря Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після проходження через фільтр	$E = 99,99\%$
Кт, Км ДР 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 <i>Приготування та стерилізація розчинів амонію гідроксиду</i>	Розчин амоній гідроксиду Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Мікробіологічний контроль після приготування	відсутність мікробіоти
Кт ДР 4.2 <i>Приготування розчинів 50 мМ Тріс-гідрохлориду</i>	Розчини Тріс-гідрохлориду Кількість розчинів	Візуально	Після приготування	$n = 5$
Кт ДР 4.4.2 <i>Приготування розчинів 0,5 М хлориду натрію</i>	Розчини хлориду натрію Кількість розчинів	Візуально	Після приготування	$n = 3$

Кт ДР 4.4.3 <i>Приготування розчину хлориду натрію для елюювання</i>	Розчин хлориду натрію Частота обертів мішалки	Тахометр технічний	Визначається безперервно	$\omega = 50-100$ об/хв
Кт, Кх ДР 4.8.1 <i>Приготування буферного розчину для промивання колонок іонообмінного хроматографа</i>	Буферний розчин Частота обертів мішалки, рН	Тахометр технічний, датчик рН	Частота обертів мішалки визначається безперервно, рН після приготування	$\omega = 50-100$ об/хв, рН = 8,3
Кт, Кх ДР 4.8.2 <i>Приготування буферного розчину для промивання колонок високоєфективного рідинного хроматографа</i>	Буферний розчин Частота обертів мішалки, рН	Тахометр технічний, датчик рН	Частота обертів мішалки визначається безперервно, рН після приготування	$\omega = 50-100$ об/хв, рН = 3,0
Кт, Км ДР 5.1 <i>Приготування та стерилізація 50% розчину проліну</i>	Розчин проліну Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км ДР 5.2 <i>Приготування та стерилізація 40% розчину глюкози</i>	Розчин глюкози Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 6.1 <i>Приготування та стерилізація концентрованого розчину мікроелементів</i>	Концентрований розчин мікроелементів Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Мікробіологічний контроль після стерилізації	відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 6.2 <i>Приготування та стерилізація концентрованого розчину тіаміну</i>	Розчин тіаміну Температура, час стерилізації, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 100^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 7.1.1, 7.2.1, 7.3.1 <i>Приготування та стерилізація композиції А</i>	Композиція А Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ хв, відсутність мікробіоти

Кт, Км ДР 7.1.2 <i>Приготування та стерилізація композиції В</i>	Композиція В Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх ДР 7.2.2, 7.3.2 <i>Приготування та стерилізація композиції В</i>	Композиція В Температура, час, рН, стерильність	Термометр, годинник, датчик рН, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура та рН визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, рН = 4,0-4,5, відсутність мікробіоти
Кт, Км ДР 7.1.3 <i>Приготування та стерилізація композиції С</i>	Композиція С Температура, час, стерильність	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40$ хв, відсутність мікробіоти
Кт ТП 8.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура E. coli 20 ІВА 1 Температура	Термометр	Температура визначається безперервно	$t = -80^{\circ}\text{C}$

Кт, Км ТП 8.2 <i>Одержання культури в рідкому середовищі</i>	Колекційна культура <i>E. coli</i> 20 ІВА 1 Температура, морфологічна однорідність, мікробіологічна чистота культури, відсутність неконтрольованих мутацій	Термометр, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура визначається безперервно, мікробіологічний контроль після активації	t = 15-20°C, відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна чистота
Кт, Км ТП 8.3 <i>Одержання робочої культури</i>	Посівний матеріал, Тривалість вирощування, температура, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Температура контролюється і підтримується автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 4 годин	t = 30°C, τ = 18 год, відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна чистота
Кт, Км ТП 8.4 <i>Вирощування культури в колбах на качалці</i>	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси та тілець включення	Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу, спектрофотометр	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 4 годин, концентрація біомаси визначається спектрофотометричним методом, концентрація тілець включення визначається методом УВЕРХ	t = 30°C, τ = 18 год, ω = 200 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, OD=0,5-1,0, концентрація тілець включення ≈ 0,145 г/л

Кт, Кх, Км ТП 8.5 <i>Вирощування культури в посівному апараті 10 л</i>	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів мішалки, рН середовища, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси та тілець включення	Годинник, термометр технічний, тахометр технічний, датчик рН, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу, спектрофотометр	Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування, мікробіологічний контроль кожні 4 години, концентрація біомаси визначається спектрофотомет-ричним методом, концентрація тілець включення визначається методом УВЕРХ	$t = 20^{\circ}\text{C}$, $\tau = 16$ год, $\omega =$ 200 об/хв, $\text{pH} = 7,0$, відсутність сторонньої мікробіоти, $\text{OD}=5-10$, концентрація тілець включення $\approx 1,45$ г/л
Кт, Кх, Км ТП 9 <i>Виробниче культивування у ферментері об'ємом 100 л</i>	Культуральна рідина, тривалість культивування, температура, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, концентрація глюкози, концентрація клітин <i>Esherichia coli</i> 20 ІВА 1, концентрація тілець включення	Датчик рН, годинник, термометр технічний, тахометр технічний, мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу, спектрофотометр	Температура, рН і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування; концентрація глюкози визначається колориметричним методом; мікробіологічний контроль кожні 4 години, концентрація біомаси визначається спектрофотомет-ричним методом, концентрація тілець включення визначається методом УВЕРХ	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20$ год, $\omega =$ 200 об/хв, $\text{pH} = 7,0$, c (глюкози) = 0,7-1,2 г/л; 0,3-0,5 г/л, відсутність сторонньої мікробіоти, мікробіологічна чистота, кінцева концентрація біомаси = 56 г/л, кінцева концентрація тілець включення = 14,5 г/л

Кт ТП 10 <i>Виділення біомаси центрифугуванням культуральної рідини</i>	Культуральна рідина Температура, частота обертів центрифуги, швидкість подачі культуральної рідини	Термометр технічний, тахометр технічний, спідометр технічний	Всі показники визначаються безперервно	$w = 200$ л/год, $t = 4^{\circ}\text{C}$, $\omega = 15\,000$ об/хв
Кт, Кх ТП 11.1 <i>Розчинення біомаси в холодному буферному розчині</i>	Розчин біомаси Частота обертів мішалки, рН, температура	Тахометр технічний, датчик рН, термометр технічний	Частота обертів мішалки та температура визначається безперервно, рН після розчинення	$\omega = 50-100$ об/хв, рН = 7,5, $t = 10^{\circ}\text{C}$
Кт, Кх ТП 11.2 <i>Руйнування клітинної оболонки на гомогенізаторі з подальшим центрифугуванням</i>	Розчин біомаси Температура, частота обертів центрифуги, швидкість подачі культуральної рідини, тиск	Термометр технічний, тахометр технічний, спідометр технічний, манометр технічний	Всі показники визначаються безперервно	$w = 220$ л/год, $P = 60$ МПа, $w = 100$ л/год, $t =$ 4°C , $\omega = 18\,400$ об/хв
Кт, Кх ТП 11.3.1, 11.3.2, 11.3.3 <i>Промивання осаду з подальшим центрифугуванням</i>	Розчин тілець включення Температура, рН, частота обертів мішалки та центрифуги, швидкість подачі культуральної рідини	Термометр технічний, тахометр технічний, спідометр технічний, датчик рН	Всі показники визначаються безперервно, рН після розчинення	$\omega = 50-100$ об/хв, $t = 10^{\circ}\text{C}$; $w = 100$ л/год, $t = 4^{\circ}\text{C}$, $\omega =$ $15\,000$ об/хв, рН = 8

Кт, Кх ТП 12 <i>Розчинення тілець включення</i>	Розчин тілець включення Частота обертів мішалки, час, рН	Датчик рН, годинник, тахометр технічний	Частота обертів мішалки та час визначаються безперервно, рН після розчинення в буфері та після розчинення тілець включення	$\omega = 50-100$ об/хв, рН = 11,9; $\tau = 45$ хв, рН = 10,8
Кт, Кх ТП 13 <i>Ренатурація з подальшим центрифугуванням</i>	Розчин тілець включення Температура, час, частота обертів мішалки та центрифуги, швидкість подачі культуральної рідини, рН	Термометр технічний, годинник, тахометр технічний, спідометр технічний, датчик рН	Всі показники визначаються безперервно, рН після ренатурації	$\tau = 18$ год, $\omega = 100$ об/хв, рН = 9,0; $t = 4^{\circ}\text{C}$, $\omega = 15\,000$ об/хв, $w = 100$ л/год
Кт, Кх ТП 14 <i>Ферментативна конверсія</i>	Розчин попередника інсуліну Частота обертів мішалки, температура, час, рН	Термометр технічний, годинник, тахометр технічний, датчик рН	Температура, частота обертів мішалки та час визначаються безперервно, рН після приготування розчину та після ферментативної конверсії	рН = 8,0, $\omega = 50-100$ об/хв, $\tau = 16$ год, $t = 8^{\circ}\text{C}$; рН = 2,5
Кт, Кх ТП 15.1.1 <i>Розчинення інсуліну в буферному розчині</i>	Розчин інсуліну та домішкових білків Частота обертів мішалки, рН	Тахометр технічний, датчик рН	Частота обертів мішалки визначається безперервно, рН після розчинення	50-100 об/хв, рН = 8,3

Кт ТП 15.1.2 <i>Фільтрування</i>	Розчин інсуліну та домішкових білків Діаметр пор фільтру, тиск, швидкість подачі розчину	Відповідно до супровідного документу, спідометр технічний, манометр технічний	Діаметр перед фільтрацією, тиск та швидкість безперервно	$d = 0,5$ мкм, $w = 0,3$ л/хв, $P = 3,5$ атм
Кт ТП 15.1.3 <i>Подача фільтрату на колонку</i>	Розчин інсуліну та домішкових білків Швидкість подачі розчину	Спідометр технічний	Весь час подачі розчину	$w = 0,3$ л/хв
Кт, Кх ТП 15.1.4 <i>Елюювання фракцій</i>	Елюйовані білки Швидкість подачі елюату, концентрація елюату в розчині	Спідометр технічний	Весь час подачі елюату	Схл. н. = $0-0,3$ М, $w = 0,3$ л/хв
Кт, Кх ТП 15.2.1 <i>Розчинення інсуліну в буферному розчині</i>	Розчин інсуліну та домішкових білків Частота обертів мішалки, рН	Тахометр технічний, датчик рН	Частота обертів мішалки визначається безперервно, рН після розчинення	$50-100$ об/хв, рН = $3,0$
Кт ТП 15.2.2 <i>Фільтрування</i>	Розчин інсуліну та домішкових білків Діаметр пор фільтру, тиск, швидкість подачі розчину	Відповідно до супровідного документу, спідометр технічний, манометр технічний	Діаметр перед фільтрацією, тиск та швидкість безперервно	$d = 0,2$ мкм, $w = 0,8$ л/хв, $P = 3,5$ атм
Кт ТП 15.2.3 <i>Подача фільтрату на колонку</i>	Розчин інсуліну та домішкових білків Швидкість подачі розчину	Спідометр технічний	Весь час подачі розчину	$w = 0,8$ л/хв

Кт, Кх ТП 15.2.4 <i>Елюювання інсуліну</i>	Елюйований інсулін Швидкість подачі елюату, концентрація інсуліну та елюату в розчині	Спідометр технічний, контроль концентрації інсуліну згідно пункту 6.4 цього розділу	Швидкість та концентрація елюату весь час подачі розчину, концентрація інсуліну після елюювання	Спроп = 10-28%, w = 0,8 л/хв, Сінс = 98-99%
Кт ТП 16 <i>Висушування інсуліну в ліофільній сушарці</i>	Вологий інсулін Температура, час	Термометр технічний, годинник	Всі показники визначаються безперервно	t = -30-+30°C, τ = 5 год
Кт ПМВ 17.1 <i>Фасування сухого інсуліну в пластикові банки</i>	Порошок інсуліну Маса порошку в одній банці	Дозатор фасувального апарату	Під час зважування порошку інсуліну	m = 500 г
Кт ПМВ 17.3 <i>Маркування</i>	Інсулін в поліетиленових пакетах Правильність маркування	Правильність маркування згідно вимог до маркування	Після нанесення маркування	Правильність маркування
Кт ПМВ 17.4 <i>Пакування в картонні коробки</i>	Промаркований інсулін в поліетиленових пакетах Кількість упаковок у коборці	Підрахунок	Підрахунок під час пакування	Кількість упаковок у коборці
Кт, Км ЗВ 18.1 <i>Знешкодження газоподібних відходів</i>	Знешкоджені газоподібні відходи Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Мікробіологічний контроль після знешкодження газоподібних відходів	Відсутність мікробіоти

Кт, Км ЗВ 18.2 <i>Знешкодження рідких відходів</i>	Знешкоджені рідкі відходи Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Мікробіологічний контроль після знешкодження рідких відходів	Відсутність мікробіоти
Кт, Км ЗВ 18.3 <i>Знешкодження твердих відходів</i>	Знешкоджені тверді відходи Стерильність	Мікробіологічний контроль згідно пункту 6.3 цього розділу	Мікробіологічний контроль після знешкодження твердих відходів	Відсутність мікробіоти

10.2. Контроль процесу виробництва інсуліну

10.2.1. Технологічний контроль

Ефективне проведення біотехнологічних процесів тісно пов'язане з вдосконаленням методів контролю і управління. В загальному підхід до контролю процесу біосинтезу проінсуліну є системним для точного та ефективного культивування. Сучасні процеси потребують реєстрації та аналізу безлічі швидкоплинних факторів (концентрації субстрату, біомаси та продукту в культуральній рідині, рН, температури, парціального тиску кисню та ін.). Це викликає необхідність використання техніки, що дозволяє проводити легке керування процесом культивування. Принципи їх дії базуються на зчитуванні показань з датчиків та перетворення цієї інформації в легкодоступну форму. Також розроблено методи автоматичного контролю окремих параметрів процесу [45].

10.2.2. Мікробіологічний контроль

10.2.2.1. Мікроскопіювання нативних препаратів

Для мікроскопування використовують препарати «роздавлена крапля». Препарат «роздавлена крапля» готують на знежиреному предметному склі, на яке наносять маленьку краплю конденсату з обладнання, культуральної рідини чи стерильного поживного середовища, накривають накривним скельцем і розглядають зі збільшенням $\times 400$ та $\times 900$ (з імерсійною олією).

В препаратах з культуральної рідини мають бути наявні палички $1,1-1,5 \times 2,0-6,0$ мкм, поодинокі або в парах, рухливі, що рухаються парами за допомогою перитрихіальних джгутиків, або нерухомі. В препаратах зі стерильного поживного та конденсату середовища не має бути мікроорганізмів.

10.2.2.2. Висів на поживні середовища

З метою перевірки або підтвердження наявності сторонньої мікробіоти, пробу з поверхонь приміщення, конденсату з обладнання, культуральної рідини чи стерильного поживного середовища мікробіологічною петлею висівають методом виснажуючого штриха для отримання ізольованих колоній на МПА для виявлення бактерій та на середовище Сабуро для виявлення грибів. Інкубацію проводять 24 год при температурах $30-35^{\circ}\text{C}$ та $20-25^{\circ}\text{C}$ відповідно.

При висівах культуральної рідини мають бути наявні невеликі прозорі сірувато-блакитного відтінку колонії на МПА, на середовищі Сабуро росту не повинно бути. При висівах зі стерильного поживного середовища та конденсату не має бути колоній на жодному з середовищ. При висівах проб після прибирання загальна кількість КУО має бути не більше 800/см² після щоденного прибирання та не більше 300/см² після генерального прибирання.

10.2.3. Показники росту і синтезу цільового продукту

10.2.3.1. Концентрація біомаси

Контроль концентрації біомаси *Escherichia coli* 20 ІВА 1 здійснюють вимірюванням оптичної густини на спектрофотометрі при довжині хвилі 600 нм в кюветі на 1 см. Показники оптичної густини за отримання посівного матеріалу в колбах на качалці мають становити OD=0,5-1,0, а при виробничому культивуванні - OD=50,0-60,0. Концентрацію біомаси визначають за допомогою калібрувального графіка, який готують на основі стандартних розчинів [4, 5].

10.2.3.2. Концентрація цільового продукту

Концентрацію білку інсуліну визначають з використанням високоефективної рідинної хроматографії [4].

Відділення та розчинення тілець включення: Пробу культуральної рідини у кількості 100 мл центрифугують на центрифугі з охолодженням за наступних параметрів: 15 000 об/хв, тривалість 15 хв, температура 4°C. Супернатант зливають, до осаду клітин додають 20 мл буферу для лізису (50 мМ Тріс-гідрохлориду, рН 8,0, 500 мМ хлориду натрію, 1 мМ ЕДТА, 0,043% лізоциму). Бактеріальну суспензію обережно перемішують протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Потім додають 20 мл Triton X-100 і суспензію перемішують протягом 10 хвилин. Клітини лізують за допомогою гомогенізатора високого тиску і піддають центрифугуванню. Отримані гранули тричі промивають з подальшим центрифугуванням: один раз з додаванням 20 мл буфера складу: 50 мМ Тріс-гідрохлориду, рН 8,0, 500 мМ хлориду натрію і 1% Тритону X-100 та двічі промивають з додаванням 20 мл буфера складу: 50 мМ Тріс-гідрохлориду, рН 8,0, 500 мМ хлориду натрію. Після цього супернатант зливають, а осад тілець включення розчиняють в 20 мл карбонатного буфера: 12 мМ

гідрокарбонату натрію з 0,2 мМ ЕДТА. рН розчину доводять до 11,9 за допомогою 5 М гідроксиду натрію і перемішують протягом 45 хв при кімнатній температурі. Потім рН доводять до 10,8 за допомогою 2 М хлоридної кислоти. Суспензію піддають центрифугуванню при 24 000 об/хв протягом 15 хв при 4°C для видалення нерозчинних домішок. Супернатант відливають в колбу на 250 мл та використовують для визначення вмісту інсуліну [4].

Для визначення вмісту гібридного білка після виділення з клітин використовують ультра високоефективну рідинну хроматографію [4].

Ультра високоефективна рідинна хроматографія (УВЕРХ) - це ефективний метод швидкого розділення складних сумішей речовин. Основою хроматографічного поділу є участь компонентів суміші, в складній системі міжмолекулярних Ван-дер-Ваальсових взаємодій на межі розподілу фаз. Основними перевагами методу УВЕРХ є збільшення пропускної здатності приладу, тобто зменшення часу аналізу кожної проби і економія розчинника до 80% [46].

Методика: Визначення гібридного білку проводять на колонці ACQUITY UPLC CSH™ C18 1,7 мкм, 2,1 x 50 мм з використанням системи Waters Acquity UHPLC та програмним забезпеченням Empower 3. Умови проведення аналізу: температура 23°C, швидкість потоку 0,713 мл/хв, детектування спектрофотометричне, 220 нм. Обсяг уприскування розчину становить 2 мкл. Використовують градієнт двох буферів А1 і В1. Елюент А1 складається з 9,66 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ і 24,58 г $\text{NaClO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл води, рН 2,5. Елюент В1 складається з 9,66 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл води, рН 2,5, змішаний з ацетонітрилом 1:1 (об./об.) [4].

10.2.3.3. Концентрація джерела вуглецю та азоту

Для визначення споживання джерел вуглецю та азоту проводять центрифугування культуральної рідини з метою відділення біомаси від поживного середовища. Пробу культуральної рідини у кількості 50 мл центрифугують на центрифугу з охолодженням за наступних параметрів: 6 000 об/хв, тривалість 20 хв, температура 4°C. Супернатант відливають в колбу на 100 мл та використовують для проведення досліджень [4].

Джерелом вуглецю при культивуванні *Escherichia coli* 20 IBA 1 з метою отримання проінсуліну є глюкоза. Кількісне визначення глюкози в поживному середовищі та культуральній рідині проводять методом розподільної високоефективної рідинної хроматографії [47].

Умови проведення: хроматографічна скляна колонка 9×500 мм, сорбент Ostin AN в Ca^+ -формі, температура в колонці 85°C, елюент 0,5 мМ нітрату кальцію, швидкість подачі 1,2 мл/хв, рефрактометричний детектор [47].

Методика: Пробу супернатанту в кількості 50 мкл вводять в клапан вприскування. Після адсорбції з сорбентом подають елюент із зазначеною швидкістю. При цьому глюкоза проходить через детектор, піки реєструються в системі та відображаються на комп'ютері. Глюкоза збирається по фракціям в окремі тари [47].

Джерелом азоту в середовищі є амінокислота пролін. Визначення проліну в середовищі проводять за допомогою розподільної високоефективної рідинної хроматографії. Метод заснований на розділенні компонентів за участю Ван-дер-Ваальсових сил на межі поділу фаз [48].

Умови проведення: колонка Luna C 18 розміром 150×3 мм, температура в колонці 17°C, сорбент – смола, склад елюенту: CH_3CN – 0,8% (об / об), H_3PO_4 – 0,1% (об / об), KH_2PO_4 – 10 мМ, $n(\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_3\text{Na})$ – 3 мМ, швидкість подачі 0,4 мл / хв, рефрактометричний детектор з довжиною хвилі 200 нм [48].

Методика: Пробу супернатанту в кількості 10 мкл вводять в клапан вприскування. Після адсорбції з сорбентом, подають попередньо приготовлений елюент із зазначеною швидкістю. Пролін випадає в піки та проходить через рефрактометричний детектор з встановленою зазначеною довжиною хвилі. В детекторі реєструються піки, які відображаються на комп'ютері. Пролін збираються фракціями в окремі тари [48].

10.3. Контроль готового продукту

10.3.1. Технологічний контроль

Технологічний контроль готового продукту має на увазі опис, контроль маркування та пакування і транспортування [49].

Контроль маркування проводиться згідно загально прийнятих вимог до всіх лікарських форм. Має бути вказано назву товару, фірмове найменування виробника та місце його знаходження, склад та основні властивості товару, спосіб застосування та умови зберігання, вага, дата та місце виробництва, пакування, правила та умови безпечного використання, термін придатності, наносять ідентифікаційний штрих-код.

Контроль пакування проводиться візуально. Кришки банок мають бути щільно закручені. Банки мають бути цілі, без зламів, тріщин, вигинів. Картонні коробки мають бути цілі, без зламів, подряпин [49].

Контроль транспортування проводиться перед відгрузкою продукту. Транспортування має проводитись в умовах низьких температур, а саме 4-8°C, в темному місці. Це необхідно для збереження властивостей гормону [50].

Опис – контроль зовнішнього виду препарату. Має бути порошок світлого кольору з гранулами різного розміру [49].

10.3.2. Фізико-хімічний контроль

Фізико-хімічні властивості включають в себе втрату в масі при висушуванні та кількісне визначення [49].

Розмір частинок не перевіряють.

Втрата в масі при висушуванні: Для проведення аналізу використовують бюкси діаметром 25 мм і висотою 35 мм. Точну наважку 0,15-0,20 г випробуваного зразка поміщають в бюкс і висушують (з відкритою кришкою), при температурі $60 \pm 1^\circ\text{C}$ та залишковому тиску не більше 0,667 кПа, протягом 3 годин. Відкритий бюкс разом з кришкою поміщають в ексікатор для охолодження на 40 хв, після чого закривають кришкою і зважують. Втрату в масі при висушуванні (X) у відсотках обчислюють за формулою:

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\% ,$$

де: m_1 - маса бюкса, доведеного до постійної маси, г; m_2 - маса бюкса з випробуванням зразком до висушування, г; m_3 - маса бюкса з випробуванням зразком після висушування, г [49].

Кількісне визначення: використовують високоефективну рідинну хроматографію. Розчинення: Пробу у кількості 10 г розчиняють в 190 мл розчину, який містить 50 мМ Tris-гідрохлориду, 1 мМ ЕДТА, рН 8,3 та 32% 2-пропанолу [7].

Методика: Розчин інсуліну фільтрують через 0,5 мкм фільтр і подають на колонку для іонообмінної хроматографії при швидкості потоку 50 мл/хв. Колонку заповнюють 200 мл сорбенту M atrex PEI-300. Після адсорбції інсуліну колонку відмивають двома обсягами буфера для врівноваження. Сорбент відправляють на регенерацію. Поліпептид елюють градієнтом (0-0,3 М) концентрацій NaCl [7].

Кількість інсуліну в пробі (чистота) має бути 98-99%.

10.3.3. Біологічний контроль

Показники біологічного контролю інсуліну: біологічна активність, біоідентичність та стерильність [50].

Стерильність: пробу інсуліну в кількості 1 г розводять в 10 мл води. По 1 мл піпеткою висівають на МПА для виявлення бактерій та на середовище Сабуро для виявлення грибів. Інкубацію проводять 24 год при температурах 30-35°C та 20-25°C відповідно. На середовищах не має бути росту.

Біологічна активність: перевіряють на тваринах (кроликах або мишах) методом зниження концентрації глюкози в крові. Описано методику з використанням кроликів [50].

Випробування проводять на кроликах породи Шиншила, масою тіла від 2,5 кг. Тварин утримують на стандартному раціоні з дотриманням санітарних правил. Для експерименту використовують не менше 24 кроликів. За 18-20 год до експерименту тварин позбавляють корму, а перед початком випробування прибирають воду. З досвіду виключають тварин, які відповідають судомами на введення інсуліну і тих, у яких зниження концентрації глюкози в крові становить менше 15% по відношенню до вихідного рівня [50].

Розчинення: основний розчин - 347 мг інсуліну розчиняють у 100 мл розчинника для отримання концентрації 100 МЕ/мл. Як розчинник застосовують 0,9% розчин натрію хлориду для ін'єкцій, підкислений 0,1 М розчином хлорводневої кислоти до рН 2,5-3,5. Безпосередньо перед дослідом готують чотири робочі розчини, перші два концентрацією 1 і 2 МЕ/мл. Для цього 1 і 2 мл основного розчину розводять в 99 і 98 мл розчинника такого ж складу відповідно. Третій і четвертий робочі розчин - до 3 мл основного розчину додають 0,6 мл хлорводневої кислоти. Звідти 1 і 2 мл розводять в 99 і 98 мл розчинника відповідно. При цьому концентрація третього розчину буде складати 0,83 МЕ/мл, а четвертого в два рази більше [50].

Тварин розподіляють на 4 рівні групи способом випадкового відбору. Кожна група тварин отримує робочі розчини в порядку, передбаченому схемою подвійного перехрещення (табл. 10.2). Першій та другій групам тварин підшкірно вводять перші два робочі розчини в обсязі 0,5 мл на тварину (мала - s_1 і велика - s_2 дози), а третій і четвертій групі - такий же обсяг третього і четвертого робочих розчинів (мала - u_1 і велика - u_2 дози). Другу постановку тесту («перехрещення») проводять не менше ніж через тиждень після першої [50].

Таблиця 10.2

Послідовність введення робочих розчинів тваринам

Випробування	Група 1	Група 2	Група 3	Група 4
I постановка (день I)	s_1	s_2	u_1	u_2
II постановка (день II)	u_2	u_1	s_2	s_1

Забір крові у тварин здійснюють тричі: безпосередньо перед введенням випробовуваних розчинів, через 1 та 2,5 години після ін'єкції препарату. Приблизно 50 мкл крові з крайової вени вуха збирають в мікроцентрифужну пробірку об'ємом 0,5 мл, що містить 10 мл розчину гепарину [50].

Концентрацію глюкози в крові тварин визначають глюкозооксидазним методом. Після кожного взяття крові проби центрифугують протягом 5 хв за температури 5°C і 1 500 об/хв. Від кожної проби відбирають по 10 мкл плазми і переносять в мікрокувету, проводять вимірювання оптичної щільності на ФЕК при

довжині хвилі 492 нм. Як розчин порівняння використовують стандартний розчин глюкози з концентрацією 5,55 ммоль/л, що входить до складу готового ензімо-хромогенного набору [50].

Концентрацію глюкози в крові розраховують за формулою:

$$c = \frac{A}{A_0} \cdot 100 \text{ мг\%},$$

де, A - оптична щільність проби; A_0 - оптична щільність глюкози в розчині порівняння.

Встановлюють середню величину, на яку знижується концентрація глюкози в крові через 1 і 2,5 години після введення робочих розчинів інсуліну у кожної тварини і висловлюють її у відсотках по відношенню до вихідної [50].

Біоідентичність: проводять таким же методом, як і біологічну активність з використанням 8 кроликів та без підрахунку середньої величини, на яку знижується концентрація глюкози в крові тварин. Препарат вважають пройшовшим випробування при активності 56% від очікуваної [50].

РОЗДІЛ 11. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА ІНСУЛІНУ

В сучасному світі між підприємствами розвивається сильна конкуренція. Для підвищення конкурентної спроможності підприємства, яке займається виробництвом інсуліну, необхідно впровадження автоматичного управління процесом. Автоматизація технологічних процесів дозволяє істотно збільшити випуск продукції, знизити її собівартість і при цьому домогтися підвищення якості.

Причин для таких змін кілька. Першочергово, метою цього процесу є прагнення знизити вплив людського фактору на помилки, що виникають в процесі виробництва. Неуважність співробітників, в тому, механічні помилки в процесі роботи – ці фактори можуть вплинути і на процеси виробництва, і на вихід готової продукції, і на ступінь задоволеності клієнтів компанії [51].

Автоматизація виробництва має на увазі заміну механічної праці людини машинними алгоритмами. Існує ряд рутинних процесів, що вимагають прорахунку або машинального виконання, з якими автоматизована система справляється набагато швидше та не допускає помилок, крім критичних помилок або ж «багів» в системі [51].

Таким чином, це може дозволити нам:

- Прискорити виконання рутинних процесів;
- Оптимізувати процес виходу готової продукції на споживчий ринок;
- Скоротити час на обробку великих масивів статистичних даних;
- Знизити фінансові витрати на наймання і навчання персоналу.

Важливе значення має автоматизація конкретно для виробництва інсуліну. Процес одержання інсуліну з клітин *E. coli* 20 ІВА 1 довгий та трудомісткий, а параметрів, які потребують контролювання дуже багато. В першу чергу це зумовлено властивостями інсуліну – поступовою інактивацією білку, що прискорюється зі збільшенням температури; необхідністю забезпечення певного рН

					НУХТ БТЕК 04.01.12 ДП ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 11. АВТОМАТИЗАЦІЯ ДІЛЯНКИ ВИРОБНИЦТВА		
Розроб.		Ткачова В. І.					
Перевір.		Скороцька О. І.					
Реценз.		Клименко О. М.					
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т. П.					
					Літ.	Арк.	Акрушів
						179	11
					Кафедра БТМ		

для успішного протікання процесів. Також має значення специфічність самого процесу одержання інсуліну – синтез і у вигляді тілець включення (внутрішньоклітинний), необхідність переведення білку в активну форму та очистка методом хроматографії.

На обраній виробничій ділянці для автоматизації проходить шість процесів, а точніше – два процеси, кожний з яких проходить тричі. Ділянка була зроблена таким чином, щоб зменшити кількість використовуваного обладнання та знизити собівартість готового продукту. Ці процеси відіграють важливу роль у виробництві інсуліну та мають багато параметрів, які необхідно контролювати.

Автоматизація обраної ділянки дасть змогу автоматизувати контроль одразу шести послідовних процесів, що значно полегшить роботу персоналу, зекономить час, ще більше знизить собівартість інсуліну та суттєво зменшить кількість можливих помилок на виробництві.

11.1. Опис апаратурно-технологічної схеми виробничої ділянки

Виробнича ділянка для автоматизації складається зі збірника та центрифуги, з'єднаних між собою трубами. Дана ділянка призначена для трикратного промивання осаду тілець включення з залишками зруйнованих клітин та подальшого центрифугування для відділення залишків клітин.

Першим апаратом є збірник. В збірнику проходить процес промивання (розведення) осаду тілець включення буферним розчином (1:10), що має на меті затримання залишків клітин в розчині під час центрифугування.

Тільця включення попередньо отримують з клітин *E. coli* 20 ІВА 1 за допомогою гомогенізації високого тиску та подальшого центрифугування. Опис цих процесів не наводимо, оскільки вони не входять до ділянки автоматизації. Промивають тільця включення буферним розчином, який складається з Тріс-НCl, NaCl та Тритону X-100 для першого промивання та Тріс-НCl і NaCl для другого і третього промивання. Для отримання заданих буферних розчинів в збірник подають попередньо розведені компоненти в кількостях 50 мМ Тріс-НCl, 500 мМ NaCl та 1% Тритону X-100 для

першого промивання та 50 мМ Тріс-НСl, 500 мМ NaCl для другого і третього промивання [4].

Процес розчинення проходить наступним чином:

1. З центрифуги в збірник поступає осад тілець включення;
2. В збірник заливають попередньо розведені реагенти в необхідній кількості;
3. Вмикають перемішування із заданою частотою обертів мішалки;
4. Відкривають кран для постугання води, заповнюють до необхідного об'єму;
5. Після завершення подачі води мішалку вимикають, розчин подають на центрифугу.

При промиванні контролюють такі параметри:

- ✓ **температура промивання** для збереження властивостей гормону;
- ✓ **pH буферного розчину** для затримання залишків клітин під час центрифугування та збереження властивостей гормону;
- ✓ **частота обертів мішалки** для рівномірного розподілу компонентів та підвищення ефективності проходження процесу;
- ✓ **кількість розчину** для контролю розчинення тілець включення у пропорції 1:10.

Значення параметрів, допустимі відхилення та вимоги до автоматизації процесу наведені в *табл. 1.1*.

Згідно параметрів протікання процесу, використовуємо збірник, обладнаний мішалкою, сорочкою та відповідними датчиками.

Другий апарат ділянки автоматизації – центрифуга. В центрифугі проходить процес розділення суспензії, а саме відділення тілець включення з суспензії, що має на меті концентрування та очищення продукту.

Принцип роботи центрифуги (*рис. 1.1*): суміш рідин подається в нижню частину ротора за сили тяжіння (самопливом). Всередині ротора кожна фракція рідин розташовується пошарово, відповідно до своєї щільності, за рахунок чого навіть найдрібніші домішки швидко і надійно осідають в роторі. Центрифугат піднімається через центр ротора до його вершини, після чого виходить очищеним. Дві фракції суміші рідин направляються в окремі ємності для збору [35].

Стадії процесу центрифугування:

1. Вмикання центрифуги;
2. Відкривання кранів подачі розчину на центрифугу для забезпечення певної швидкості потоку;
3. Поступання розчину в центрифугу, розділення компонентів;
4. Вихід центрифугату через вершину ротора, направлення його в каналізацію;
5. Завершення центрифугування, вмикання режиму відвантаження осаду;
6. Відвантаження осаду в збірник.

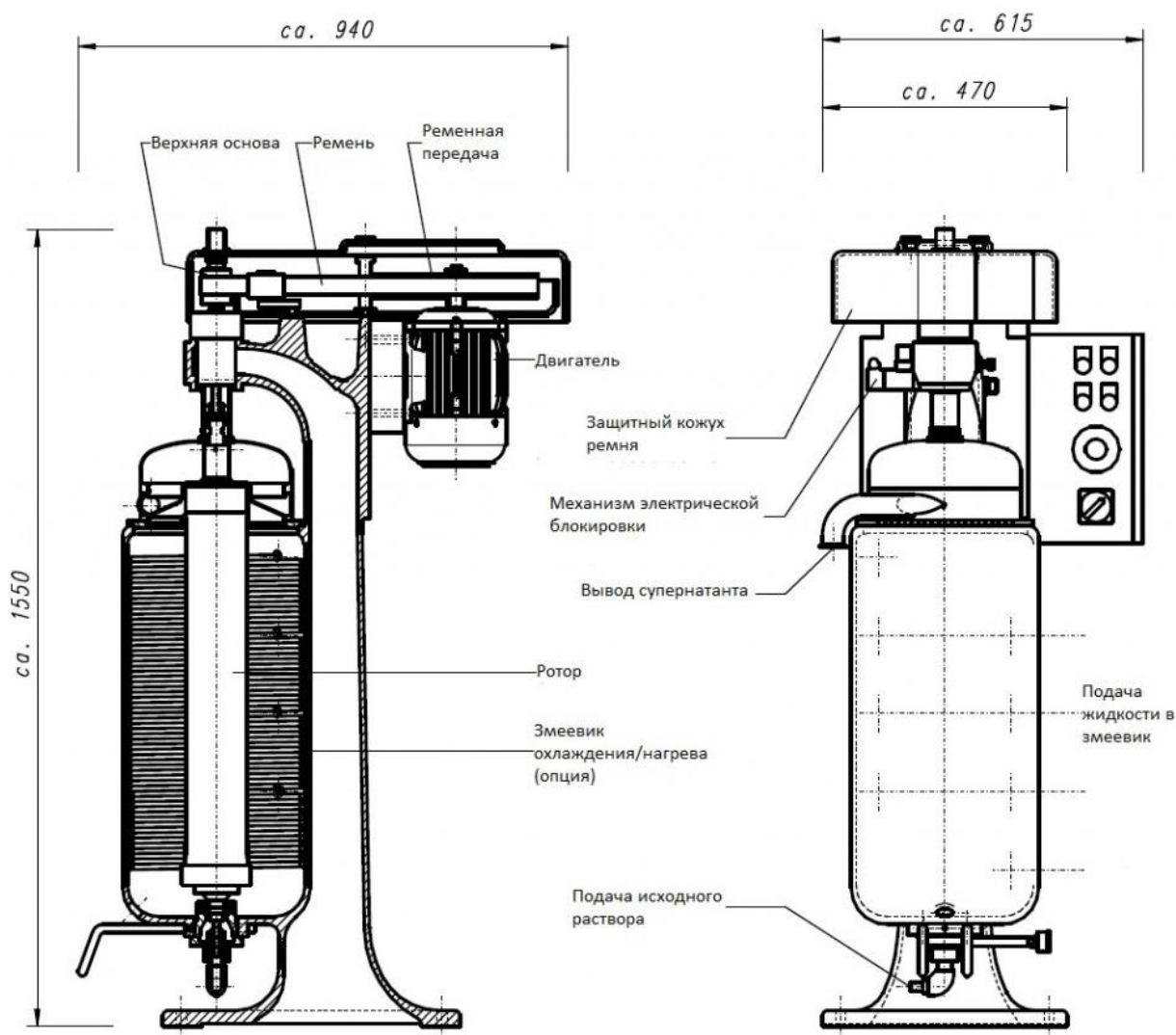


Рис. 11.1. Схематичне зображення та принцип роботи пілотної проточної центрифуги SEPA Z 41

При центрифугуванні контролюють такі параметри:

- ✓ **температура центрифугування** для збереження властивостей гормону;

- ✓ *швидкість подачі розчину на центрифугу* для забезпечення високої швидкості та підвищення ефективності проходження процесу;
- ✓ *частота обертів ротора* для ефективного розділення суспензії.

Значення параметрів, допустимі відхилення та вимоги до автоматизації процесу наведені в *табл. 11.1*.

Згідно параметрів протікання процесу, використовуємо центрифугу СЕРА Z 41, обладнану сорочкою та всіма необхідними датчиками [35].

Технологічні вимоги до системи автоматизації

№ п/п	Машина, апарат, агрегат	Параметр, місце відбору імпульсу	Значення параметру, допустимі відхилення	Система автоматизації		
				Вид системи автоматизації	Характер контролю, регулювання, управління	Засоби управління та контролю, реалізації управляючої дії
1	Збірник	Температура	10°C	Контроль Регулювання	Покази, реєстрація, стабілізація	АРМ оператора Вплив на витрату води в сорочку
2		pH	8,0	Контроль	Покази, запис, сигналізація	АРМ оператора
3		Рівень заповнення	10 л	Контроль Управління	Покази, запис, сигналізація	АРМ оператора Вплив на подачу води у збірник
4		Оберти перемішуючого пристрою	50-100 об/хв	Контроль Управління	Покази	Керування двигуном (дискретне)
5	Центрифуга	Температура	4°C	Контроль Регулювання	Покази, реєстрація, стабілізація	АРМ оператора Вплив на витрату води в сорочку
6		Швидкість подачі	100 л/год	Контроль Регулювання	Покази, реєстрація, стабілізація	АРМ оператора

						Вплив на швидкість подачі суспензії в ротор
7		Оберти ротора	15 000 об/хв	Контроль Управління	Покази	Керування двигуном (дискретне)

Примітка: * регулювання параметру ручне через малі об'єми титрувальних розчинів та подачу з колби.

11.2. Опис функціональної схеми автоматизації

У першому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати і регулювати температуру розчину під час розчинення та перед подачею на наступні технологічні апарати. Регламентоване значення температури 10°C. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора зі збереженням зареєстрованих значень в його архіві. Регулювання здійснюється вмиканням/вимиканням подачі води в сорочку апарату (1в).

У другому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати рН розчину під час розчинення та перед подачею на наступні технологічні апарати. Регламентоване значення рН 8,0. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора зі збереженням зареєстрованих значень в його архіві. При відхиленні показника відбувається сигналізація для сповіщення персоналу про необхідність коригування рН.

У третьому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати рівень заповнення збірника з сигналізацією про досягнення верхнього припустимого рівня та управляти клапаном подачі рідини в збірник (3в). В схемі використовуємо тільки один електрод, який встановлюємо в точці, що відповідає верхньому припустимому рівню. Сигналізація передбачається на АРМі оператора.

У четвертому контурі при натисканні кнопки «Пуск» на моторі (М1) відбувається перемішування суспензії в апараті із заданою частотою обертів.

У п'ятому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати і регулювати температуру розчину під час центрифугування. Регламентоване значення температури 4°C. Спостереження за зміною передбачається на АРМі оператора зі збереженням зареєстрованих значень в його архіві. Регулювання здійснюється вмиканням/вимиканням подачі води в сорочку апарату (4в).

У шостому контурі автоматичного контролю і управління необхідно контролювати швидкість подачі суспензії на центрифугу та управляти клапаном подачі рідини в центрифугу (5г). Спостереження за зміною передбачається на АРМі

оператора зі збереженням зареєстрованих значень в його архіві. Регулювання здійснюється стабілізацією клапана подачі розчину на центрифугу.

У цьому контурі при натисканні кнопки «Пуск» на моторі (М2) відбувається обертання ротора центрифуги із заданою частотою обертів.

11.3. Специфікація засобів автоматизації

Засоби автоматизації для обраної виробничої ділянки представлені в таблиці:

Таблиця 11.2

Поз.	Параметр	Місце установки	Найменування характеристика приладу	Тип моделі	Завод виготовлювач
1а 4а	Температура	В агрегаті	Скляний рідинний термометр, вібростійкий, робоче середовище керосин, діапазон вимірювань: 0...200 ⁰ С, під'єднання G1/2, клас точності 1,0	СП-В	ПАО «Склоприбор», Україна
1б 3б 4б 5в	Температура Рівень Витрата	На щиті	Електро-пневматичний перетворювач з сигнал 4-20 мА в сигнал 20-100 кПа	Dwyer серія 2700	СВ Альтера м. Київ
1в 3в 4в	Температура Рівень	По місцю	Мембранний виконавчий механізм прямої дії для управління кранами та заслінками, управляючий сигнал – 20...100 кПа, крутячий момент – 5...30 нм/бар, кут повороту – 90°	KUP	Kobold
2а	рН	В агрегаті	рН електроди, матеріал скло, пластик, діапазон вимірювань рН 1...12, максимальна температура до 80 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 6бар	APS	Kobold
2б	рН	По місцю	Перетворювач вимірювання рН і окисно-відновного потенціалу, аналоговий вихід	APM-Z	Kobold

3а	Рівень	В агрегаті	Контактний датчик рівня, з вихідним сигналом по напрузі	SITR NS L Pointe k CLS 200	ДП «Сименс Україна» м.Київ
5а	Витрата	В точці контролю	Гідростатичний роторно-поршневий витратомір з аналоговим виходом, матеріал виготовлення латунь, межі в'язкості 5...100мм ² /с, діапазон вимірювань: 6-420л/год, точність 1% вимірюваної величини, максимальна допустима температура до 80 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 40бар, під'єднання G1/4	DRZ	Kobold
5б	Витрата	По місцю	Електрод для кондуктометричного реле рівня, матеріал: нержавіюча сталь; максимальна допустима температура 85 ⁰ С, максимальний допустимий тиск 20бар, під'єднання G3/4	NEK	Kobold
5г	Витрата	По місцю	Комутатор для кондуктометричного датчика-реле рівня, 2 контрольні точки, вихідний сигнал дискретний	NE-304	Kobold
KM1 KM2	Магнітний пускач	На щиті	Магнітний пускач, робочий струм 7А, потужність двигуна 3кВт, управляючий сигнал 220В	3RT20 15- 1AP01	SIEMENS
SA1 SA2	Перемикач	На щиті	Перемикач 3-х позиційний (автоматичний-ручний з щита – ручний по місцю) з фіксацією	3SB321 0- 2DA11	SIEMENS
SB1 SB2 SB3 SB4	Перемикач	На щиті	Двоклавішна кнопка станція «Пуск»-«Стоп» 1НО+1НЗ,	8LP2T B7113	Lovato

Запропонований спосіб автоматизації ділянки виробництва інсуліну дозволить полегшити роботу персоналу, спростити виробництво, знизити собівартість готового продукту та знизити теоретичну і практичну можливість помилок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Квіташвілі О., Кабінет Міністрів України* Постанова «Про затвердження порядку відшкодування вартості препаратів інсуліну». – Затвер. 01.2016.
2. *Козак В.* Инсулиновый бизнес в Украине или реформы на бумаге // Ageyenko.ua. – Оpubл. 29.11.2016.
3. *Сысуев Б.Б., Покровская Ю.С.* Рекомбинантные микроорганизмы и клеточные культуры в технологии получения препаратов белков // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 4(13). – С. 96-109.
4. *Zieliński M., Romanik-Chruścielewska A., Mikiewicz D., Łukasiewicz N., Sokołowska I., Antosik J., Sobolewska-Ruta A., Bierczyńska-Krzysik A., Zaleski P., Płucienniczak A.* Expression and purification of recombinant human insulin from E. coli 20 strain // Protein Expression and Purification. – 2019. – Vol. 157. – P. 63-69. – doi:10.1016/j.pep.2019.02.002.
5. *Способ* получения рекомбинантного инсулина человека / Калинин Ю.Т., Ураков Н.Н., Иванов В.Т., Степанов А.В., Мирошников А.И., Гавриков В.Г., Баирамашвили Д.И., Донецкий И.А., Коробко В.Г., Костромина Т.И., Гуляев В.А., Литвиненко М.А., Байдусь А.Н., Коробов В.И., Красильников В.А., Борисов Н.В., Шматченко Н.А., Воротникова И.И., Горкун О.Г., Дербышев В.И., Ноздрин В.Н., Дунайцев И.А., Липин М.Ю., Бекмуратова И.И., Кобелева В.А., Шепелин А.П., Мартовецкий М.Н., Федюкин В.С., Абросимова Л.И. – Оpubл. 25.05.1999. Грант.
6. *Polez S., Origi D., Zahariev S., Guarnaccia C., Tisminetzky SG., Skoko N., et al.* A Simplified and Efficient Process for Insulin Production in *Pichia pastoris* // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11 № 12. – doi:10.1371/journal.pone.0167207.
7. *Способ* получения рекомбинантного инсулина человека / Лазарев А. П., Костецкий И. Е., Лисовский И. Л., Лесик И. П. – С12N 15/17. – Оpubл. 03.06.2010. – 33 с.

8. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2-х томах. Т. 2. Пер. с англ.: – М.: Мир, 1993. – 415 с.
9. Инсулин // Химик. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.xumuk.ru/encyklopedia/1707.html>
10. Шевчук В.Г. Фізіологія: підручник – 4-те вид. – В.: Нова книга, 2012. – 456 с.
11. АТС – класифікатор // Державний формуляр лікарських засобів. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://preparaty.org/atc>
12. Гой А.М., Воскобойнікова Г.Л., Гапон Н.В. Концептуальні підходи до визначення методології проектного менеджменту сучасного фармацевтичного виробництва парентеральних лікарських форм на основі рекомбінантних білків // Фармаком. – 2016. – № 2. – С. 63-70.
13. ХУМОДАР® P100P: інструкція // Компендіум. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://compendium.com.ua/info/168465/khumodar-sup-sup-r100r/>
14. Державний реєстр лікарських засобів. Офіційне видання: в 2 т М.: Медична рада, 2010. - Т.2, ч.1 - 568 с.; ч.2 - 560 с.
15. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підруч. – 2-е вид., доп. і перероб. – К.: НУХТ., 2010. – 632 с.
16. Insulin, human // European pharmacopoeia 5.0. – 2005 – № 1. – Р. 1800-1802.
17. Панкратова Н.А., Табакова Д.А., Гусева Е.В. Исследование процесса культивирования E-Coli в реакторе периодического действия // Успехи в химии и химической технологии. – 2017. – Т. XXXI, № 9. – С. 32-33.
18. Процеси і апарати біотехнологічних виробництв: Метод. рекомендації до вивчення дисципліни, виконання курсових і контрольних робіт для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Уклад.: Зав'ялов В.Л., Зоткіна Л.В., Немирович П.М., Бодров В.С., Запорожець Ю.В., Попова Н.В., Мисюра Т.Г. – К.: НУХТ, 2012. – 98 с.
19. Р – пилотный ферментер // Bioengineering AG. [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://www.bioengineering.su/oborudovanie/fermenteryi-promyishlennyye/p-%E2%80%93-pilotnyij-fermenter.html>

20. *Пирог Т. П., Карлаш Ю. В., Красінько В. О.* Основи проектування біотехнологічних виробництв // методичні рекомендації до викон. курс. проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання. – К.: НУХТ, 2015. – 92 с.
21. *Средство* для чистки и дезинфекции Grass "Deso" (C10), 1 л. // Prom.ua. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://prom.ua/p539228589-sredstvo-dlya-chistki;all.html>
22. *Deso* // Реєстр Дезсредств. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dezr.ru/preparat/deso>
23. *Министерство сельского хозяйства и продовольствия* Постановление «Об утверждении Ветеринарно-санитарных правил по мойке и дезинфекции технологического оборудования». – Утвер. 08.11.2007.
24. *Хлорантоин* методические рекомендации (инструкция по применению) [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://dezmed.com.ua/ru/instrukcii/765-khlorantoin-metodicheskie-rekomendacii-instrukciya-po-primeneniyu>
25. *Средство* универсальное моющее-дезинфицирующее "Антибакт т.м. Киилто" ("Kiilto Antibact") // Электронный эколог. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://e-ecolog.ru/reestr/evrazes/RU.77.99.88.002.%D0%95.049616.12.11>
26. *Гігієнізер.* [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://bizera.com.ua/Lvov/p15193-Gigienizer-na-baze-30-perekisi-vodoroda/>
27. *Хемодез* НУК // Хемос. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://hemos.zp.ua/p_nukp.html
28. *Фильтровальная бумага* (гладкая и тесненная) // Сартокарат. [Електронний ресурс] Режим доступу: [http://sartorius.com.ua/filtrovalnaja_bumaga/filtrovalnaja_bumaga_\(gladkaja_i_tesnennaja\).html](http://sartorius.com.ua/filtrovalnaja_bumaga/filtrovalnaja_bumaga_(gladkaja_i_tesnennaja).html)
29. *Тиамин.* Витамин В1. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.dompitomci.ru/doc/spr/maindoc/rmp_txt/1013.html

30. *Горизонтальный* простой медицинский автоклав WS-YDA. [Электронный ресурс]
Режим доступа: <http://m.ua.sumerscience.com/medical-equipment/autoclave-steam-sterilizer/horizontal-sample-medical-autoclave-ws-yda.html>
31. Калуняц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудование микробиологических производств. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.
32. *Пілотна* проточна центрифуга СЕРА Z 61/Z 61 GP // Біотехно. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/ceparatsiya/pilotnaya-protchnaya-tsentrifuga-сера-z-61/>
33. *Ariete* NS3006 / GEA. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.gea.com/ru/products/homogenizers-ariete-series.jsp>
34. *Пілотна* проточна центрифуга СЕРА Z 41/Z 41 GP // Біотехно. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/karta/pilotnaya-protchnaya-tsentrifuga-сера-z-41/>
35. *Пілотна* система для мікро- і ультрафільтрації УФ-201 // Біотехно. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/pilotnaya/pilotnaya-sistema-dlya-mikro-i-ultrafiltratsii-uf-201/>
36. *Система* жидкостной хроматографии GE Healthcare АКТА pure 150 M. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://labsnab.by/catalog/oborudovanie-dlya-khromatografii/sistema-zhidkostnoy-khromatografii-ge-healthcare-akta-pure-150-m/>
37. *Хроматографическая* система среднего давления (50 бар) АКТА pure 150, препаративная очистки биомолекул, GE. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.dia-m.ru/catalog/lab/hromatografiya-zhidkostnaya-oborudovanie/khromatograficheskie-sistemy-srednego-davleniya-akta-pure-150-preparativnaya-ochistka-biomolekul/>
38. *АКТА* pure. Chromatography systems. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://alamed.ru/upload/iblock/285/285d8394a6c349106232b536c43f7334.pdf>

39. Система Prochrom Varicol® Multicolumn для непрерывной хроматографии // Биотехно. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/karta/sistema-prochrom-varicol-multicolumn/>
40. Abrial M. Prochrom Varicol: 系统 多柱连续色谱系统 公斤级到吨级满足成本效益的手性分离 // Novacer. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://image.rystech.com/%EF%BC%882%EF%BC%897628%20Varicol%20HD1.pdf>
41. Промышленная полочная лиофильная сушарка LP50R // Биотехно. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://biotechno.ru/catalog/karta/promyshlennaya-plochnaya-liofilnaya-sushilka-lp50r-/>
42. Пластиковая упаковка - лучшие упаковочные материалы. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://alfa-pack.com.ua/catalog/plastikovaya-upakovka>
43. Вібраційна фасувальна машина для сипучих продуктів. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://technowagy.com.ua/product/vibratsionnaya-nastolnaya-fasovochnaya-mashina-dlya-sypuchih-produktov-kofe-chaj-v-gotovoyu-taru/>
44. Электронно-променевый стерилизатор ЕЛС-900 // НИИЭФА им. Д.В. Ефремова. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.niiefa.spb.su/site/right/sterilization/medicine/els-900/?lang=ru>
45. Волова Т.Г. Биотехнология. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
46. Ультра високоефективна рідинна хроматографія // Журнал КИПИС. [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.kipis.ru/info/index.php?ELEMENT_ID=1391821
47. Ле Ань Туан Применение психотолерантных дрожжей для биоконверсии вторичных ресурсов переработки растительного сырья: автореферат дисс. на соиск. ст. к.т.н. – ФГБОУ ВО «КНИТУ». – 2016. – 167 с.

48. *Способ* получения L-аминокислот с использованием бактерий с оптимизированным уровнем генной экспрессии / Каташкина Ж. И., Лунц М. Г., Дорошенко В. Г., Фомина С. А., Скороходова А. Ю., Ивановская Л. В., Машко С. В. – С12Р 13/04. – Оpubл. 20.01.2006. – 19 с.
49. ОФС.1.4.1.0010.15 Порошки // Фармакоп. [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-4-1-0010-15-poroshki/>
50. ОФС.1.2.4.0001.15 Биологические испытания инсулина // Фармакоп. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0001-15-biologicheskie-ispytaniya-insulina/>
51. *Автоматизація* виробничих процесів і SCM на підприємстві // ABM Cloud. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://abmcloud.com/avtomatizatsiya-proizvodstvennyh-protsesov-kompaniy/>



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ (МОЗ України)

вул. М. Грушевського, 7, м. Київ, 01601, тел. (044) 253-61-94, E-mail: moz@moz.gov.ua,
web: http://www.moz.gov.ua, код ЄДРПОУ 00012925

2019 № 04.3-10-17/1543/ЗПІ-19

Ткачова В.
tkachovaslava@gmail.com

Департамент реалізації політик Міністерства охорони здоров'я України (далі – Департамент) розглянув Ваш запит щодо доступу до публічної інформації стосовно кількості дітей та дорослих в Україні за 2018 і 2019 роки, які хворіють на цукровий діабет, та повідомляє.

Наказом МОЗ України від 04.10.2018 р. №1802, зареєстрованим у Міністерстві юстиції України 31 жовтня 2018 р. за № 1240/32692 «Про затвердження Змін до наказу МОЗ України від 10 липня 2007 року № 378», форма звітності № 12 «Звіт про число захворювань, зареєстрованих у хворих, які проживають у районі обслуговування лікувального закладу», яка містить дану інформацію, за вказівкою керівництва МОЗ України скасована. Тому, інформація щодо неінфекційної захворюваності населення України з 2018 року відсутня.

Також інформуємо, що Реєстр пацієнтів, які потребують інсулінотерапії, ведеться ДП «Державний експертний центр МОЗ України». Кількість пацієнтів у всіх регіонах України, які фактично отримали інсулін, за період з 01.01.2019 по 20.09.2019 склала 204 526 пацієнтів.

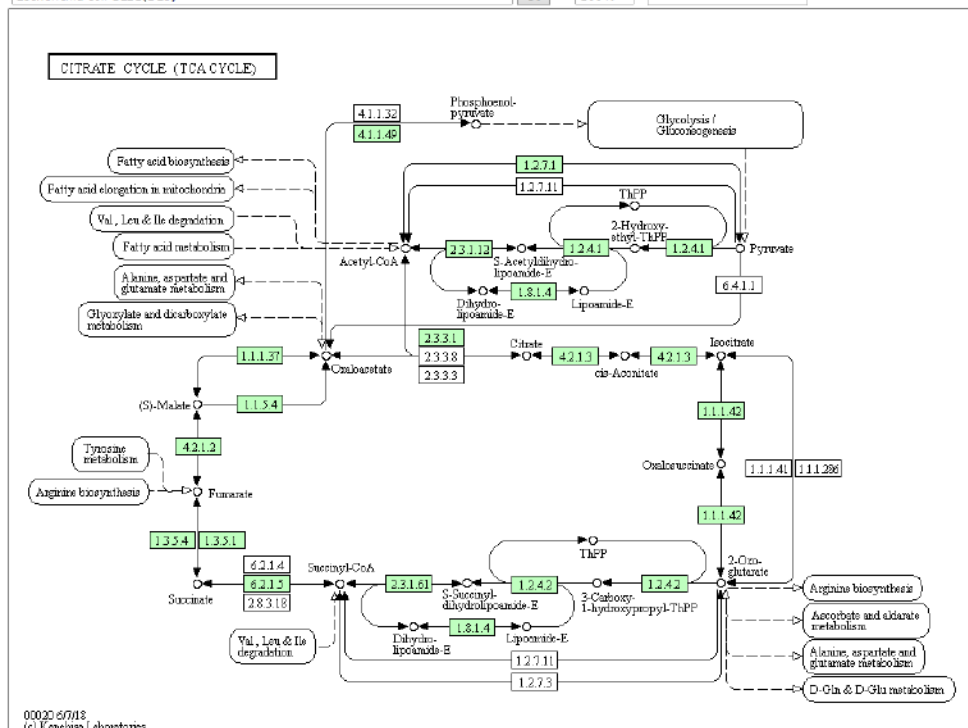
Відпуск лікарських засобів здійснюється аптечними закладами (суб'єктами господарювання), перелік яких визначається структурними підрозділами з питань охорони здоров'я Автономної Республіки Крим, обласних, Київської та Севастопольської міських держадміністрацій або розпорядниками коштів місцевих бюджетів, визначених рішеннями про такі бюджети згідно із законодавством, на рівних умовах, відповідно до укладених договорів, на підставі рецептів на препарати інсуліну, виписаних закладами охорони здоров'я за місцем диспансерного обліку пацієнта згідно з реєстром пацієнтів, що потребують інсулінотерапії.

На сьогодні чинним є Реєстр препаратів інсуліну станом на 01 лютого 2019 року, затверджений наказом МОЗ України від 25.03.2019 № 666.

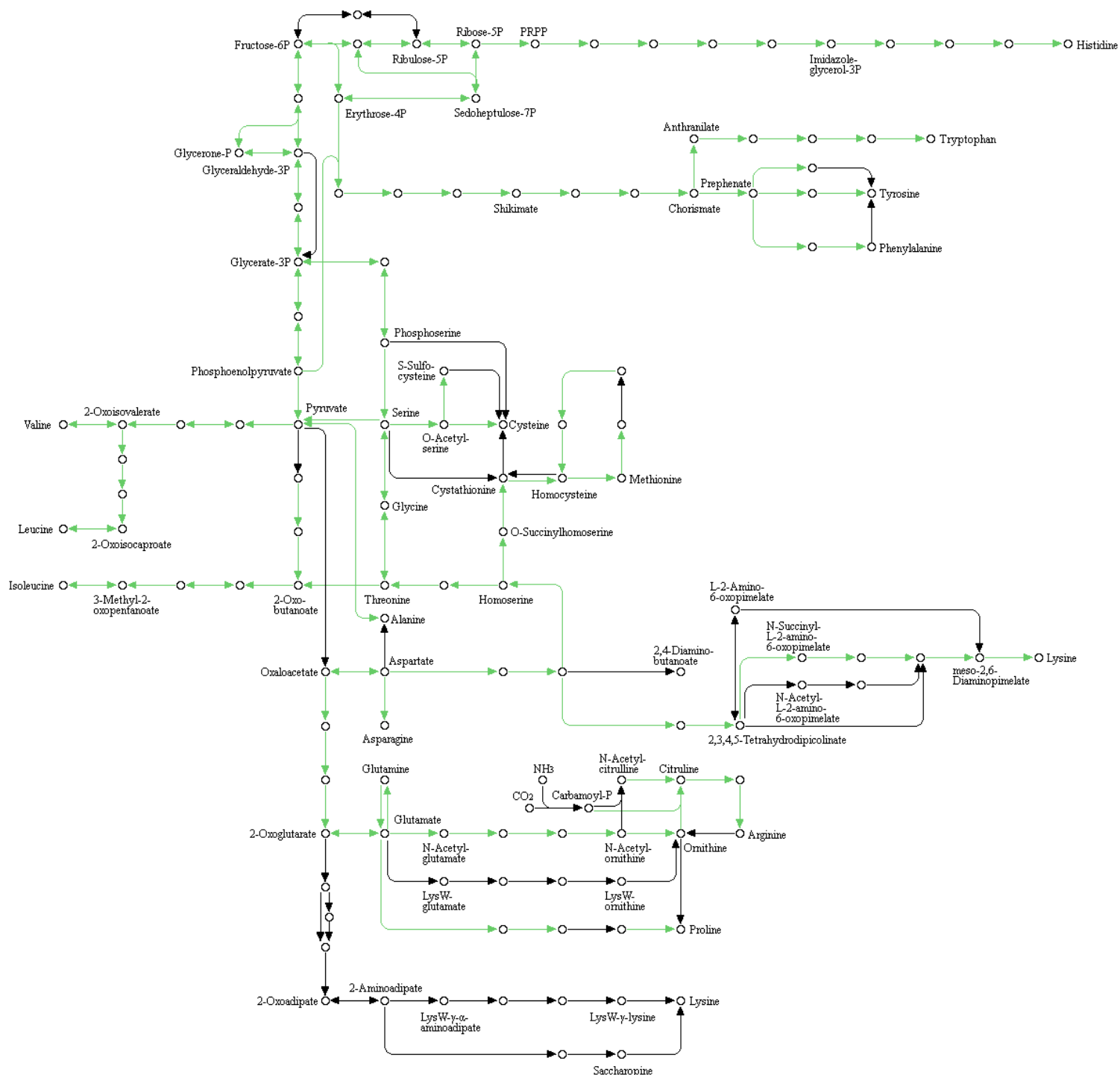
**В.о. директора Департаменту
реалізації політик**

А. Кожушко

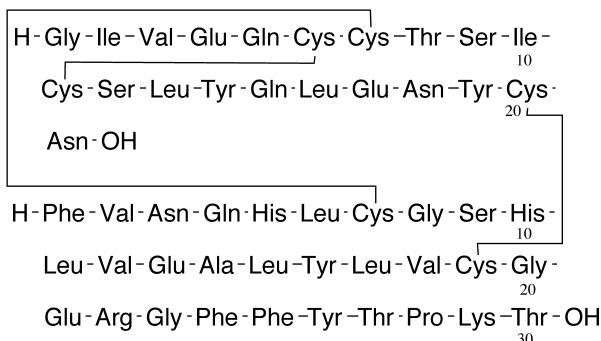




BIOSYNTHESIS OF AMINO ACIDS



01/2005:0838 B. Peptide mapping (2.2.55).

INSULIN, HUMAN**Insulinum humanum** $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ M_r 5808**DEFINITION**

Human insulin is a 2-chain peptide having the structure of the antidiabetic hormone produced by the human pancreas.

Content: 95.0 per cent to 105.0 per cent of human insulin $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ plus A21 desamido human insulin (dried substance).

By convention, for the purpose of labelling insulin preparations, 0.0347 mg of human insulin is equivalent to 1 IU of insulin.

PRODUCTION

Human insulin is produced either by enzymatic modification and suitable purification of insulin obtained from the pancreas of the pig or by a method based on recombinant DNA (rDNA) technology.

Human insulin is produced under conditions designed to minimise the degree of microbial contamination.

For human insulin produced by enzymatic modification of insulin obtained from the pancreas of the pig, the manufacturing process is validated to demonstrate removal of any residual proteolytic activity. The competent authority may require additional tests.

For human insulin produced by a method based on rDNA technology, prior to release the following tests are carried out on each batch of the final bulk product, unless exemption has been granted by the competent authority.

Host-cell-derived proteins. The limit is approved by the competent authority.

Single chain precursor. The limit is approved by the competent authority. Use a suitably sensitive method.

CHARACTERS

Appearance: white or almost white powder.

Solubility: practically insoluble in water and in ethanol (96 per cent). It dissolves in dilute mineral acids and with decomposition in dilute solutions of alkali hydroxides.

IDENTIFICATION

A. Examine the chromatograms obtained in the assay.

Results: the principal peak in the chromatogram obtained with the test solution is similar in retention time to the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a).

SELECTIVE CLEAVAGE OF THE PEPTIDE BONDS

Test solution. Prepare a 2.0 mg/ml solution of the substance to be examined in 0.01 M hydrochloric acid and transfer 500 µl of this solution to a clean tube. Add 2.0 ml of HEPES buffer solution pH 7.5 R and 400 µl of a 1 mg/ml solution of *Staphylococcus aureus* strain V8 protease R. Cap the tube and incubate at 25 °C for 6 h. Stop the reaction by adding 2.9 ml of sulphate buffer solution pH 2.0 R.

Reference solution. Prepare at the same time and in the same manner as for the test solution but using human insulin CRS instead of the substance to be examined.

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION. Liquid chromatography (2.2.29).

Column:

- size: $l = 0.10$ m, $\varnothing = 4.6$ mm,
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (3 µm) with a pore size of 8 nm,
- temperature: 40 °C.

Mobile phase:

- mobile phase A: mix 100 ml of acetonitrile for chromatography R, 200 ml of sulphate buffer solution pH 2.0 R and 700 ml of water R; filter and degas;
- mobile phase B: mix 200 ml of sulphate buffer solution pH 2.0 R, 400 ml of acetonitrile for chromatography R and 400 ml of water R; filter and degas;

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 60	90 → 30	10 → 70
60 - 65	30 → 0	70 → 100
65 - 70	0	100

Flow rate: 1 ml/min.

Detection: spectrophotometer at 214 nm.

Equilibration: at initial conditions for at least 15 min. Carry out a blank run using the above-mentioned gradient.

Injection: 50 µl.

System suitability:

- the chromatograms obtained with the test solution and the reference solution are qualitatively similar to the chromatogram of human insulin digest supplied with human insulin CRS,
- in the chromatogram obtained with the reference solution, identify the peaks due to digest fragments I, II and III:

symmetry factor: maximum 1.5 for the peaks due to fragments II and III,

resolution: minimum 3.4 between the peaks due to fragments II and III.

Results: the profile of the chromatogram obtained with the test solution corresponds to that of the chromatogram obtained with the reference solution.

NOTE: the retention time of fragment I is the same for porcine insulin and for human insulin. The retention times of fragments II and IV are the same for all insulins. The retention time of fragment III is the same for bovine insulin and for porcine insulin.



ScienceDirect



Завантажити

Поділитися

Експорт

Експресія та очищення білка

Том 157 , травень 2019, Сторінки 63-69Травень 2019 , стор. 63-69

Експресія та очищення рекомбінантного людського інсуліну від штаму *E. coli* 20

Marcin Zieliński , Agnieszka Romanik-Chruścielewska , Діана Mikiewicz , Наталія Лукасевич , Івона Sokołowska , Jarosław Антосик , Agnieszka Sobolewska-Рута , Анна Bierczyńska-Krzysik , Петро Залеський , Анджей Płucienniczak

 Показати більше<https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.02.002>

Отримайте права та вміст

Під ліцензією Creative Commons [ліцензії](#)

відкритий доступ

Основні моменти

- Новий штам господаря бактерій (*Escherichia coli* 20).
- Новий вектор експресії pIBAINS, що забезпечує більшу ефективність.
- Високий вихід рекомбінантного людського інсуліну на літр середовища.
- Наш інсулін є кандидатом на гіпоглікемічний лікарський засіб при догляді від діабету.
- Ця робота надає цінний альтернативний метод отримання рекомбінантного людського інсуліну.

Анотація

Кількість хворих на діабет оцінюється понад 370 мільйонів, у 2030 році вона зросте до 552 мільйонів. У Польщі кількість хворих на діабет оцінюється в 3,5 мільйона (9,1%). За підрахунками Міжнародної федерації діабету, відсоток пацієнтів у дорослому

ПОЛЬС

Незважаючи на появу аналогів інсуліну на фармацевтичному ринку, доставка інсуліну все ще є найбільш ефективним методом фармакотерапії у випадках надзвичайно високої гіперглікемії.

Новий штам господаря бактерій (*Escherichia coli* 20) було отримано в Інституті біотехнології та антибіотиків, і був сконструйований новий вектор експресії pIBAINS, який забезпечує більшу ефективність у виробництві рекомбінантного людського інсуліну. У департаменті біоінженерії МБА були зроблені успішні спроби виробити рекомбінантний людський інсулін в лабораторному та квартално-технічному масштабі, і кілька партій проводили в напівтехнічному масштабі. Процес виробництва був поділений на кілька етапів: 1. біосинтез інсуліну у ферментері, 2. виділення, очищення та розчинення тіл включення, 3. ренатурація білка, 4. ферментативна реакція трипсином, 5. багатоступеневе очищення інсуліну використовуючи методи низького тиску та ВЕРХ. На кожному етапі вироблення інсуліну проводили якісний та кількісний аналіз для підтвердження ідентичності та чистоти. Зокрема, вивчали молекулярну масу інсуліну, кількість інсуліну та вміст білкових домішок. Результати цих експериментів представлені в цій роботі.

[< Попередня](#)[Наступна >](#)

Ключові слова

Діабет; Гіперглікемія; Рекомбінантний людський інсулін; вектор експресії pIBAINS; Штам кишкової палички 20; Органи включення

1 . Вступ

Дефіцит інсуліну в організмі або відсутність реакції клітин на вироблений гормон призводить до цукрового діабету. Зазвичай ця невиліковна хвороба проявляється високим рівнем цукру в крові (гіперглікемія). Хронічна гіперглікемія може призвести до збурень і дисфункцій різних органів, включаючи нирки, серце, судини, нервову систему та сітківку [1]. За оцінками MFD (Міжнародної федерації діабету), відсоток пацієнтів у дорослому польському населенні зростає приблизно до 11% протягом наступних 20 років [2]. Це населення в майбутньому може стати одержувачем результатів нашого проекту. Замісна терапія інсуліном - це стандарт лікування пацієнтів із цукровим діабетом 1-го та передового типу. Подача інсуліну як і раніше є найбільш ефективним методом фармакотерапії у випадках надзвичайно високої гіперглікемії. Свиняча тканина і тканина підшлункової залози великої рогатої худоби були джерелом гормону протягом багатьох років, після чого йшов напівсинтетичний людський інсулін, отриманий модифікацією тваринного інсуліну. З розвитком технології рекомбінантних ДНК рекомбінантний (біосинтетичний) людський інсулін став доступний у великих

кільк



Завантажити

Поділитися

Експорт

забезпечують надійні запаси гормону по всьому світу за доступними цінами.

Рекомбінантний людський інсулін був одним із перших продуктів біотехнології. Було показано, що чистота та фармацевтична якість рекомбінантного людського інсуліну перевершує тваринний та напівсинтетичний інсулін, і пацієнти з діабетом можуть бути безпечно та ефективно переведені з тваринного чи напівсинтетичного людського інсуліну у рекомбінантний людський інсулін, не очікуючи змін дози інсуліну [3].

Людський інсулін - це гормон, що виробляється в β -клітинах острівців підшлункової залози, що відповідає за **регуляцію обміну** глюкози [4]. Людський інсулін - це поліпептид з молекулярною масою 5808 Да. Гормон складається з двох ланцюгів: ланцюга А (21 амінокислота) і ланцюга В (30 амінокислот), з'єднаних двома **дисульфідними** містками. Крім того, ланцюг А містить внутрішньоланцюговий **дисульфідний зв'язок** [5]. В Інституті біотехнології та антибіотиків був отриманий новий штам господаря бактерій (*E. coli* 20). Також новий вектор **експресії** PIBAINS була побудована. Про новий штам та вектор експресії повідомили у польському патентному відомстві. Результати цих експериментів представлені в цій роботі.

2 . Матеріал та методи

2.1 . Матеріали

Штам *Escherichia coli* 20 IBA 1 є лабораторним похідним *E.coli* CSH50R [ATCC: 39111] [[6],[7],[8]]. Антипіна 204, L-пролін, **тіамін** гідрохлорид, тетрациклін гідрохлорид, основа тризми, тритон X-100, **лізоцим** , EDTA, бікарбонат натрію, цитраконовий ангідрид, етаноламін, **апротинін** були придбані у Sigma. **Гептагідрат сульфату магнію** , глюкоза, хлорид амонію, **ізопропіловий спирт** , ацетонітрил походили з Avantor Performance Materials Poland SA Дигідрат **хлориду** кальцію був від JTBaker. Хлорид натрію, гідроксид натрію, двокалієвий водень**фосфат**, дигідрофосфат **калію** , 37% соляна кислота, **трипсин** , **карбоксипептидаза В** , хлорид цинку, **сульфат натрію** були придбані у Merck. **DEAE Sepharose** Fast Flow, Q Sepharose Fast Flow, **Sephadex** G-25 були від GE Healthcare. **Залізо цитрат** амонію був придбаний у Alfa Aesar. **Екстракт дріжджів** був від Becton Dickinson. ВЕРХ з оберненою фазою C18-300 був придбаний у ACE TOB Bioflo celligen 310 **біореактор** був з Еппендорф.

2.2 . Хост напруги

E.coli , 20 штаму IBA 1 (F- лямбда-ара Δ (про лакові) RPSL Thi Гесаа cytR) є похідним від *кишкової палички* штаму CSH50R. Це лабораторний штам, отриманий з *E.coli* K-12 , **Gram (-) негативної бактерії**, що належить до сімейства *Enterobacteriaceae* . Це штам, який використовується для трансформації. Росте у вигляді рівномірної суспензії в рідкому середовищі LB (бульйон лізогену). Оптимальна температура росту - 37 ° C. Штам також зростає на мінімальному середовищі (ММ) у присутності тіаміну (2 мкг / мл) та L-проліну (в межах концентрації 50–200 мкг / мл). Штам утворює круглі, плоскі, гладкі колонії на багатому субстраті TSA (триптиказа соєвий агар). *кишкова паличка*штам IBA 1 має

делег



Завантажити

Підписатися

Експорт

S12, пов'язана зі стійкістю до стрептоміцину (зростання на середовищі зі стрептоміцином у кінцевій концентрації 50 мг / мл). Штам також має мутацію в гені *cytR*, що кодує регулятор транскрипції, який зв'язується з ДНК. З послідовності генів, довжиною 1026 bp, було виділено 145 bp. Ефективний спосіб отримання рекомбінантного людського інсуліну з використанням бактеріального штаму *E. coli* 20, у якого відсутній репресор цитру, описаний у польському патенті № PL 180,818 [9].

2.3 . Побудова гена інсуліну людини

Експресійна плазмід рІВАІNS є похідним плазмиди рBR322 [ATCC: 31344]. Коротко, рІВА готували шляхом лігування двох фрагментів *HindIII* / *SmaI* і ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи плазмиду рBR322 як шаблон. Потім, використовуючи метод ПЛР, в цю плазмиду було вставлено 63 нуклеотиди з короткими місцями молекулярного клонування та синтетичний термінатор транскрипції *trpA* (Pharmacia Biotech 1995). Отриману плазмиду рІВА-1 розщеплювали за допомогою *EcoRI* / *NdeI*, а потім фрагментом ПЛР 945 bp, що містить промотор *deoP1P2* (також розщеплювали за допомогою *EcoRI* / *NdeI*) зв'язували за орієнтацією за годинниковою стрілкою, отримуючи плазмиду рІВА-2. Послідовність області промотору *deoP1P2* ампліфікували з хромосомної ДНК штаму *E. coli* K12 на основі нуклеотидної послідовності з бази генів [GenBank: AP009048]. Плазмиду рІВА-2 додатково обробляли *NdeI* / *XbaI* і лігували 363 bp *NdeI* / *XbaI* вставкою, що включає гібридний білок SOD_INS [10]. Використання кодону гена гібридного білка було оптимізовано для експресії в *E. coli* . Отримана в результаті плазмид рІВАІNS несе стійкість до тетрацикліну. Ініціація транскрипції знаходиться під контролем промотору *E. coli deoP1P2* . Побудовану плазмиду рІВАІNS використовували для трансформації штаму *E. coli* 20, отриманого в нашому інституті. Ми використовували штам *E. coli* 20 ІВА та вектор ІВА, оскільки володіння запатентованим штамом дозволяє комерціалізувати винахід.

2.4 . Культура клітин

Бактеріальні клітини для культури отримували із запасів гліцерину, що зберігався при -80 ° С. 20 клітин *E. coli* , що містять плазмиду рІВАІNS з геном інсуліну людини, вирощували протягом 18 год при 30 ° С в струшуючих колбах, що містять 50 мл середовища GMS [11], доповненої тетрацикліном (100 мкг / мл), проліном (600 мкг / мл) і тіаміну (2 мкг / мл), поки оптична щільність при 600 нм не становила приблизно 0,5–1,0. Колби використовували в якості прищепи для ферментатора Bioflo Celligen 310 7,5 л (вихідний середній об'єм GMS 4 л). У ферментері антибіотики не використовували. Клітини вирощували протягом 15-16 годин при 37 ° С. Під час стадії росту культури 40% глюкози та 12 мг / мл проліну були експоненціально додані як джерело вуглецю (для підтримки діапазону концентрації глюкози 7-12 мг / мл). РН контролювали протягом усього циклу додаванням 16% NH₄ OH. Коли OD 600 нм досягало приблизно 25–35, подача глюкози була обмежена до тих пір, поки її концентрація в середовищі не знизилася до 0 г / л. Потім подачу глюкози з'єднували з насосом з кислотою (рН-статичний контроль за допомогою каскаду). Контролер автоматично додавав глюкозу

КОЖН

Рівень [глюкози](#) підтримувався рН-статом у діапазоні концентрацій 3–5 мг / мл. Після індукції культуру вирощували протягом 4–5 год, поки OD 600 нм не становило приблизно 50–60, досягаючи стаціонарної фази росту.

2.5 . Виділення органів включення

Клітини збирали [центрифугуванням](#) при 15000 x g протягом 15 хв при 4 ° С. Гранульовані клітини суспендували в буфері [лізису](#) (50 мМ трис-НСІ рН 8,0, 500 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,043% лізоциму). Суспензію бактерій акуратно перемішували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Потім додавали 20 мл тритона X-100 і суспензію перемішували протягом 10 хв. Клітини лізирували гомогенізатором високого тиску і піддавали центрифугуванню при 18 400 x g протягом 15 хв при 4 ° С. Отримані гранули промивали 50 мМ трис-НСІ рН 8,0, 500 мМ NaCl і 1% тритона X-100 і знову центрифугували при 18 400 x g протягом 15 хв при 4 ° С. Потім гранули двічі промивали 50 мМ трис-НСІ рН 8,0, 500 мМ NaCl буфера. Нарешті, зупинення органів [включення](#) центрифугували при 15000 x g протягом 15 хв при 4 ° С. Отримані інклюзійні тіла заморожували при -30 ° С для подальшої підготовки.

2.6 . Розпуск органів включення

Тіла включення, що містять інсулін, розчиняли в 12 мМ карбонатного буфера (NaHCO₃) з 0,2 мМ EDTA. РН розчину доводять до приблизно 11,9 за допомогою 5 М NaOH і перемішують протягом 45 хв при кімнатній температурі. Потім рН доводять до 10,8 за допомогою 2 М HCl. Нарешті, суспензію центрифугували при 24000 x g протягом 15 хв при 4 ° С для видалення нерозчинного сміття.

2.7 . Ренатурація

Після розчинення зразку давали згортатися протягом наступних 18 годин, при інтенсивному перемішуванні та [аерації](#). Після закінчення [ренатурації](#) рН доводять до 9,0 за допомогою 2 М HCl. Ренатурацію вивчали при кімнатній температурі та при 8 ° С.

2.8 . Реакція цитраконуляції

Попередник інсуліну обробляли цитраконовим ангідридом з метою контролю ферментативного [травлення](#), необхідного для формування інсуліну та запобігання [деградації інсуліну](#). До розчину білка порціями додавали 1 мл цитраконового ангідриду та 5 М NaOH, так що рН розчину залишався в межах 8,7–9,3. Кількість ангідриду розраховували за формулою: $0,2 \times V$ розчин (дм³) x A280 нм. Після додавання загальної кількості цитраконового ангідриду розчин перемішували протягом 2,5 год. Потім додавали 3 мл 2 М розчину етаноламіну. Кількість розраховували за формулою: цитраконовий ангідрид $3 \times V$ і перемішували протягом 45 хв.

2.9 . Трипсинізація

Після

щоб електропровідність була нижче 5 мС. Потім додавали 70 мкл 1% розчину трипсину і розчин перемішували протягом 16-18 годин при кімнатній температурі. Кількість трипсину розраховували за формулою: $\text{розчин A280 нм} \times V (\text{дм}^3) / 75$. Реакцію гальмували 1 мг / мл апротиніну. Кількість доданого апротиніну розраховували за формулою: $V \text{ трипсин} / 21$.

2.10 . Хроматографія низького тиску на DEAE Sepharose

Зразок білка наносили на колонку, упаковану DEAE Sepharose і врівноважували 0,5 М Tris pH 8,6, а потім 20 мМ Tris pH 8,6, наносили пробу білка. Після нанесення колонку промивали буферами: DW I - 20 мМ Tris pH 8,6 (провідність 6 мС) і DW II - 20 мМ Tris pH 8,6 + 20% ізопропанол (провідність 3 мС). Інсулін елюювали буфером DE - 20 мМ Tris, pH 8,6 + 30% ізопропанол (провідність 6 мС).

2.11 . Децитраконструкція

Основну фракцію, елюйовану з колонки, 2 рази розбавляли H_2O і pH знижували до 2,9 2 М HCl. Зразок перемішували протягом 1 години і залишали при 4 ° С протягом ночі.

2.12 . Опади інсуліну

До зразка додавали 1М розчин хлориду цинку і pH доводять до 5,9. Розчин перемішували протягом 1 години. Кількість доданого хлориду цинку розраховували за формулою: $2 \times V \text{ см}^3 \text{ розчину} / 100$. Потім зразок центрифугували при 18 400 x g протягом 15 хв при 4 ° С. Осад може зберігатися при 4 ° С до 30 днів.

2.13 . Розчинення солі цинку

Осад інсуліну суспендували у воді. Обсяг розраховували за формулою: загальна кількість білка, отриманого після DEAE / 7. Потім 1М Tris pH 8,6 додавали до концентрації 30 мМ та 0,2 М EDTA (кількість, обчислена за формулою: загальна кількість білка, отриманого після DEAE / 190). Провідність зразка була нижче 3 мС.

2.14 . Хроматографія низького тиску на Q Sepharose

Зразок білка наносили на колонку, упаковану Q Sepharose і врівноважували 0,5 М Tris pH 8,6, а потім 20 мМ Tris pH 8,6. Після застосування колонку промивали буферами: QW - 20 мМ Tris, pH 8,6 + 20% ізопропанол (електропровідність 0,5 мС). Білки елюїровали буфером QE1 - 20 мМ трис pH 8,6 + 30% ізопропанолом (провідність 0,42 мС) і буфером QE2 - 20 мМ трис pH 8,6 + 30% ізопропанолом (провідність 3 мС).

2.15 . Реакція з карбоксипептидазою В

Основну фракцію, елюйовану з колонки, 2 рази розбавляли H_2O і додавали 50 мкл карбоксипептидази В (2,5 мг / мл) (10 мкл на кожні 150 АС загального білка, визначеного в основній фракції). РН зразка доводять до 8,8. Реакцію проводили протягом 16–18 год при кімнатній температурі.

2.16 .

[Завантажити](#)[Поділитися](#)[Експорт](#)

Поділ проводили на колонці ACE 5C18-300 з використанням градієнта ацетонітрилу.

Рухома фаза А: 2000 мл 0,2 М розчину сульфату натрію рН 2,3 попередньо нагрівають у теплій воді до 25 ° С - 30 ° С із 440 мл ацетонітрилу, рН 2,3. **Мобільна фаза В:** 1250 мл 0,2 М розчину сульфату натрію рН 2,3 попередньо нагрівають у теплій воді до 25 ° С - 30 ° С з 1250 мл ацетонітрилу, рН 2,3. Основну фракцію, елюйовану з колонки, 3 рази розбавляли H_2O , а потім інсулін осаджували хлоридом цинку.

2.17 . Хроматографія Sephadex G-25

Осад інсуліну суспендували у воді і рН доводять до 3,0. Для обміну буфера для зразків зразок білка наносили на колонку, наповнену Sephadex G-25, врівноваженою 5 мМ ацетатом амонію, рН 4,0. Інсулін елюювали тим же буфером.

2.18 . Вимірювання концентрації білка

Концентрацію білка вимірювали на довжині хвилі 280 нм. Спектрофотометр був відкалібрований водою.

3 . UHPLC хроматографічний тандем MALDI-TOF / TOF мас-спектрометрія

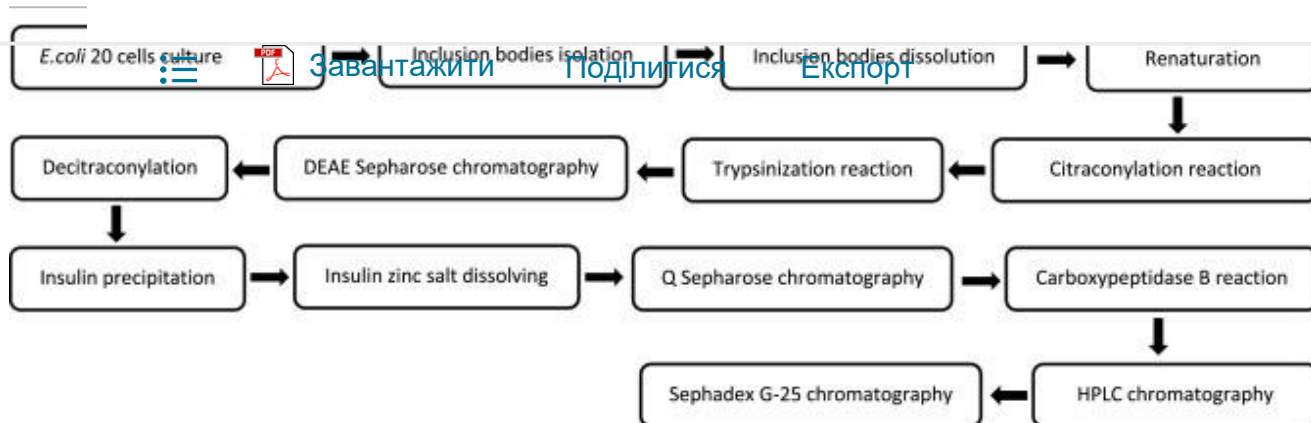
3.1 . UHPLC-хроматографія

Розділення зразків проводили за допомогою системи Waters Acquity UHPLC з програмним забезпеченням Empower 3, оснащеною ACQUITY UPLC[®] CSH[™] C18 1,7 мкм, 2,1 × 50 мм колоною. Аналізи проводили при 23 ° С зі швидкістю потоку 0,713 мл / хв та спектрофотометричним виявленням при 220 нм. Об'єм ін'єкції становив 2 мкл. Був використаний градієнт з двох буферів А1 і В1. Елюент А1 становив 9,66 г $NaH_2PO_4 \times H_2O$ і 24,58 г $NaClO_4 \times H_2O$ в 1000 мл води, рН 2,5. Елюент В1 становив 9,66 г $NaH_2PO_4 \times H_2O$ в 1000 мл води, рН 2,5, змішаний з ацетонітрилом 1: 1 (об / об).

3.2 . Масова спектрометрія MALDI-TOF / TOF

Мас-спектри були придбані за допомогою аналізатора 4800 MALDI TOF / TOF (Applied Biosystems). Прилад працював у режимі відбиття позитивних іонів. 0,5 мкл зразка помітили на планшет Opti-TOF MALDI 384 і змішали з 0,5 мкл насиченого розчину матриці альфа-ціано-4-гідроксицинамінової кислоти (CHCA) від Sigma-Aldrich, розчиненого у воді / 50 ацетонітрил 50:50 з 0,1% TFA - кінцева концентрація (Sigma-Aldrich). Калібрування було досягнуто калібрувальною сумішшю аналізатора [протеоміки](#) 4700, що надається Applied Biosystems. Для обробки набутих спектрів було застосовано програмне забезпечення Data Explorer версії 4.9.

Весь процес отримання рекомбінантного інсуліну проілюстрований на [рис. 1](#) .



Завантажити: [Завантажити зображення високої роздільної здатності \(257 КБ\)](#)

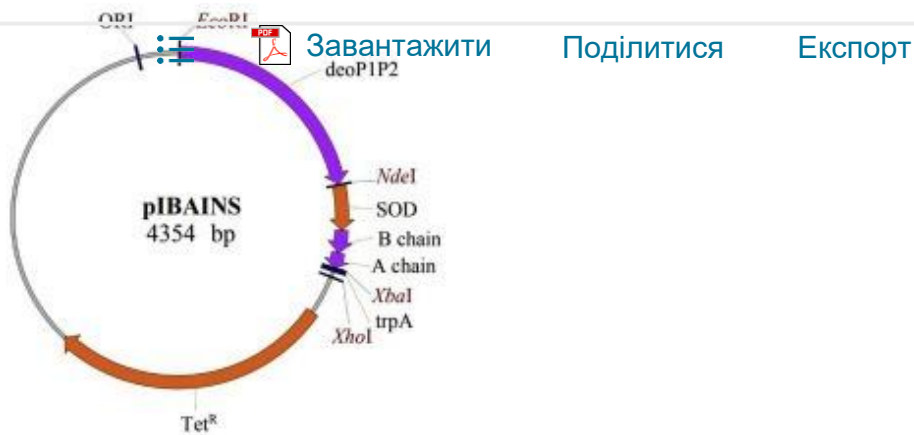
Завантажити: [Завантажити повнорозмірне зображення](#)

Рис.1 . Структурна схема процесу отримання рекомбінантного людського інсуліну з 20 клітин *E. coli* .

4 . Результати і обговорення

4.1 . Генетична побудова плазміді рІBAINS

Ген людського інсуліну складався за такою формулою: LBXA. У формулі L є первинним пептидом, представленим модифікованим геном SOD, B - це ланцюг інсуліну людини B, X - короткий пептид Lys-Arg, що з'єднує ланцюг B з ланцюгом A, A - ланцюг інсуліну людини A. Це описано в нашому патент [12]. У [плазмидній](#) рІBAINS, розмір 4354 п.н., складається з наступних регуляторних послідовностей і генів: від 7 п.о. до 942 п.о. регуляторної області з deoP1P2 промоторами , розташованим, з 946 п.о. до 1137 п.о., існує послідовність , що кодує фрагмент людський ген SOD, від 1138 bp до 1299 bp, включена послідовність, що кодує ланцюги A, B і ланцюга C (у формі лінкера Lys-Arg) рекомбінантного INS інсуліну людини ([нуклеотидна послідовність](#) інсуліну змінено відповідно до частоти [кодонів](#) у *E. coli*), від 1312 bp до 1338 bp, розташована область кодування термінатора транскрипції ter trpA, від 1508 bp до 2698 bp, розташований ген [стійкості](#) до [тетрацикліну](#) Tet . Структура плазміді рІBAINS, що містить ген, що кодує рекомбінантний людський білок інсуліну (інсулін INS), схематично показаний на [фіг. 2](#) .



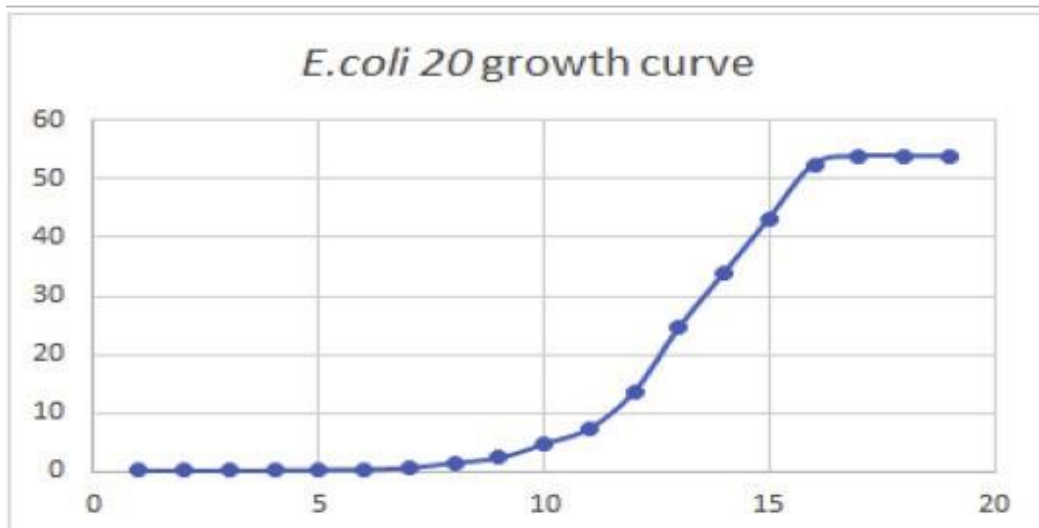
Завантажити: Завантажити зображення високої роздільної здатності (127 КБ)

Завантажити: Завантажити повнорозмірне зображення

Рис.2 . Схема побудови **плазмід** pIBAINS . Плазмід pIBAINS містить гібридний білок SOD: INS під контролем промотору *deoP1P2* . Використовувані скорочення: *deoP1P2* - промотор *deoP1P2* ; Tet^R - стійкий до тетрацикліну; *trpA* - термінатор транскрипції *trpA*; СОД - ген супероксиддисмутази; Ланцюг, ланцюг В - ланцюги гена інсуліну людини; ORI - **походження реплікації** .

4.2 . Культура клітин

В результаті клітинної культури *E. coli* 20 у ферментері (описано в «Матеріал і методи») ми отримали близько 224 г мокрої **біомаси** (56 г з 1 л середовища культури). Приклад кривої зростання показаний на **рис. 3** . Максимальний OD 600 нм становив 54,4.



Завантажити: Завантажити зображення високої роздільної здатності (179 КБ)

Завантажити: Завантажити повнорозмірне зображення

Рис.3 . Крива росту **кишкової палички** 20. Значення осі X - це години культури, значення осі y - **оптична щільність** (OD) 600 нм.



Завантажити

Поділитися

Експорт

4.3 . Виділення органів включення

Після виділення, проведеного згідно з протоколом, описаним у «Матеріал і методи», ми отримали близько 58 г тіл для включення (14,5 г з 1 л носія культури).

4.4 . Розпуск органів включення

Аликвоту з 17,9 г тіл, що включають, розчинили, як описано в «Матеріал та методи», і ми отримали 5460 АС білка.

4.5 . Ренатурація

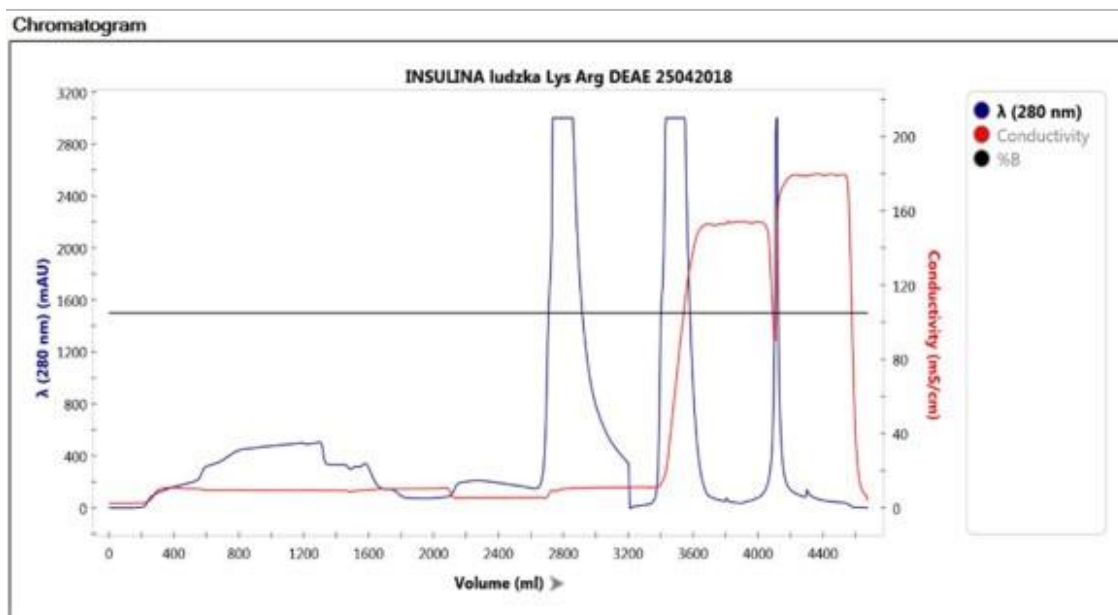
У разі ренатурації при кімнатній температурі вихід становив близько 95–96%, а при 7–8 °С вихід близько 99%. Ми отримали 5450 АС білка. Процес повторного згортання завершився через 18-19 годин, і було показано, що він залежить від окислювально-відновного потенціалу та значення рН, але не від температури.

4.6 . Реакція цитраконуляції та трипсинізація

Цитраконічний ангідрид дозволив здійснити зворотне блокування залишків амінокислот Lys / Arg для контролю триптичного травлення . Правильність реакцій цитраконуляції та трипсинізації перевіряли за допомогою мас-спектрометрії.

4.7 . Хроматографія низького тиску на DEAE Sepharose

Відразу після реакції з трипсином білок наносили на колонку, наповнену DEAE Sepharose . В результаті було отримано 250 мл фракції інсуліну. Концентрація білка становила 8,57 АС / мл Хроматограма з хроматографією інсуліну DEAE Sepharose Fast Flow показана на [рис. 4](#) .



3а

Завантажити:  Завантажити розмір  Підписатися  Експорт

Рис.4 . Хроматограма із хроматографії інсуліну DEAE Sepharose Fast Flow. Першим кроком було 3 CV 100% DW I та 3 CV 100% DW II для елюювання незв'язаних білків. Другим кроком було 2 CV 100% DE для елюювання білка, що цікавить. Пік інсуліну становить приблизно від 2650 до 3200 мл (вісь x). Наступним кроком було 2 CV 1 М NaCl і потім 0,5 М NaOH для елюювання всіх білків з колонки. Буфер DW I: 20 мМ Трис рН 8,6 (електропровідність 6 мС), буфер DW II: 20 мМ Трис рН 8,6 + 20% ізопропанол (електропровідність 3 мС), буфер DE: 20 мМ Трис рН 8,6 + 30% ізопропанол (провідність 6 мЗ), витрата: 15 мл / хв.

4.8 . Децитраконструкція

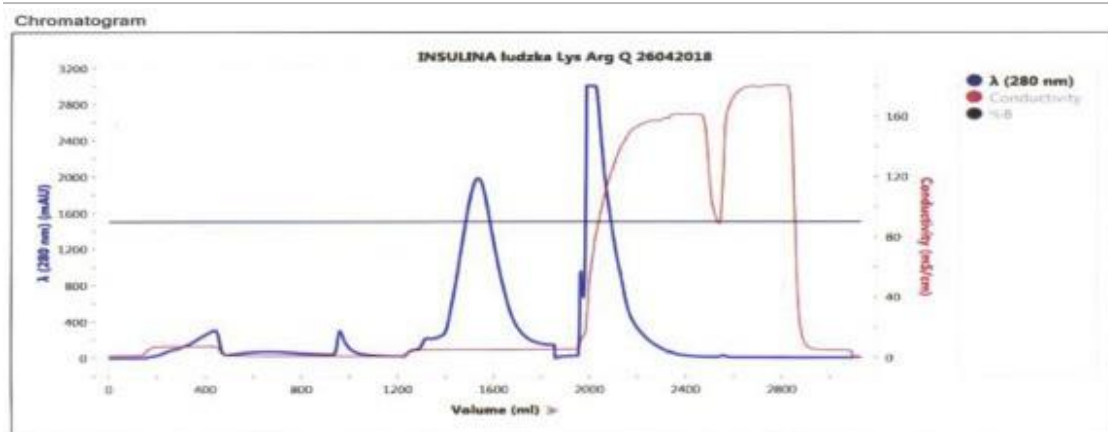
Основну фракцію, елюювану з колонки, 2 рази розбавляли H_2O і рН знижували до 2,9 2 М HCl. Цитраконічний ангідрид (2-метилмалейновий ангідрид) використовується для блокування первинних амінових груп при [значеннях лужного рН](#) (рН 7–9). При кислотному рН (3–4) амідна зв'язка гідролізується і цитраконова кислота виділяється, отримуючи вихідний амін.

4.9 . Осадження інсуліну та розчинення солі цинку

До зразка додавали 10 мл 1 М розчину хлориду цинку і рН доводять до 5,9. Розчин перемішували протягом 1 години. Після [центрифугування](#) (як описано в «Матеріал і методи») осад інсуліну суспендували в 285 мл води. Потім додавали 9,2 мл 1 М Tris рН 8,6 до концентрації 30 мМ та 11,3 мл 0,2 М ЕДТА.

4.10 . Хроматографія низького тиску на Q Sepharose

Відразу після розчинення цинкової солі білок наносили на колонку, наповнену Q Sepharose. В результаті було отримано 226 мл інсулінової фракції. Концентрація білка становила 2,77 АС / мл Хроматограма з хроматографії інсуліну Q Sepharose Fast Flow показана на [рис. 5](#) .



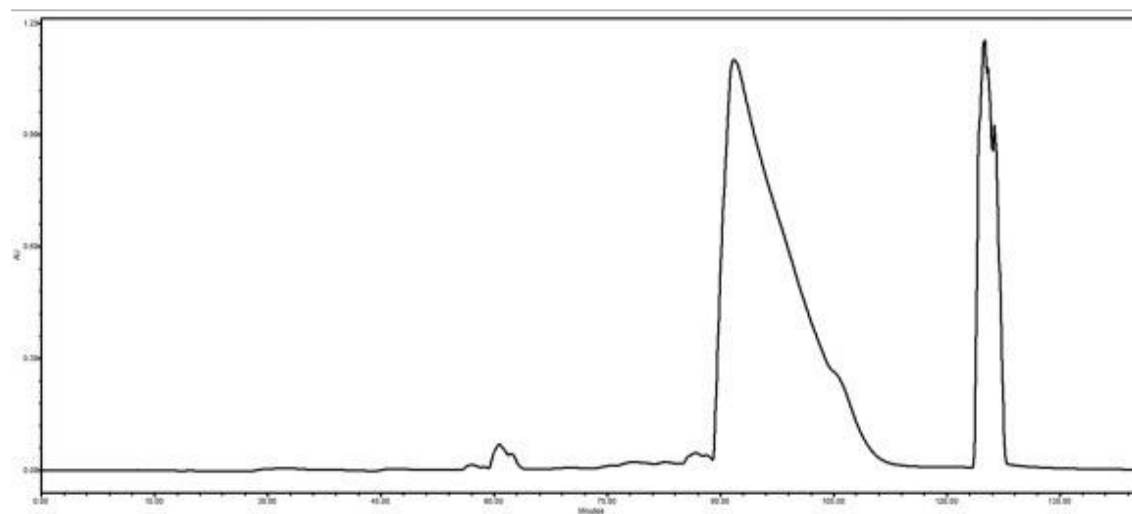
За

[Завантажити](#): [Завантажити зображення високої роздільної здатності \(115 КБ\)](#) [Завантажити повнорозмірне зображення](#) [Експорт](#)

Рис.5 . Хроматограма з хроматографії інсуліну Q Sepharose Fast Flow. Першим кроком було 2 CV 100% KB для елюювання незв'язаних білків. Другим етапом було 2 CV 100% QE I для елюювання слабо зв'язаних білків та 2 CV 100% QE II для елюювання білка, що цікавить. Пік інсуліну становить приблизно від 1400 до 1800 мл (вісь x). Наступним етапом було 1 CV 1 M NaCl і потім 0,5 M NaOH для елюювання всіх білків з колонки. Буфер QW: 20 mM трис pH 8,6 + 20% ізопропанол (електропровідність 0,5 мС), буфер QE I: 20 mM трис pH 8,6 + 30% ізопропанол (провідність 0,42 мС), буфер QE II: 20 mM трис pH 8,6 + 30% ізопропанол (провідність 3 мС), витрата: 10 мл / хв.

4.11 . Реакція з карбоксипептидазою В та хроматографією RP-HPLC

Карбоксипептидаза В каталізувала гідроліз лізину та аргініну (короткий пептид Lys-Arg, що з'єднує ланцюг В з ланцюгом А). Після реакції з карбоксипептидазою В, описаної в «Матеріал та методи», зразок наносили на колонку RP-HPLC ACE 5C18-300. В результаті було отримано 97 мл фракції інсуліну. Концентрація білка становила 2,42 АС / мл. Хроматограма з RP-HPLC-хроматографії інсуліну показана на рис. 6.



[Завантажити](#): [Завантажити зображення високої роздільної здатності \(115 КБ\)](#)

[Завантажити](#): [Завантажити повнорозмірне зображення](#)

Рис.6 . Хроматограма з RP-HPLC. Інсулін очищали в ізократичних умовах - **мобільна фаза А**: 2000 мл 0,2 М **розчину сульфату натрію** pH 2,3 попередньо нагрівали в теплій воді до 25 ° C - 30 ° C з 440 мл ацетонітрилу, pH 2,3. Мобільна фаза В: 1250 мл 0,2 М розчину сульфату натрію pH 2,3 попередньо нагрівають у теплій воді до 25 ° C - 30 ° C з 1250 мл ацетонітрилу, pH 2,3. Довжина хвилі детектора: 214 нм. Пік інсуліну становить приблизно від 90 до 105 хв (вісь x).

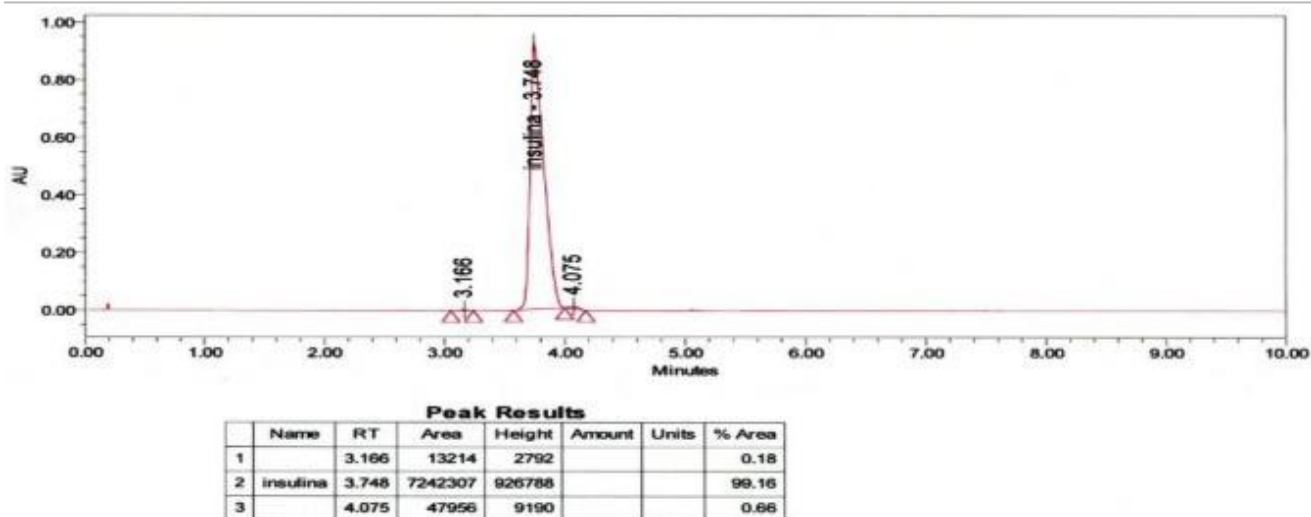
4.12 .

[Завантажити](#)[Поділитися](#)[Експорт](#)

Для обміну буфера для зразків та позбавлення від залишкового ацетонітрилу зразок білка наносили на колонку, наповнену [Sephadex G-25](#), врівноважену 5 мМ ацетатом амонію рН 4,0. В результаті було отримано 31 мл фракції інсуліну. Концентрація білка становила 3,59 АС / мл

4.13 . Підсумок очищення

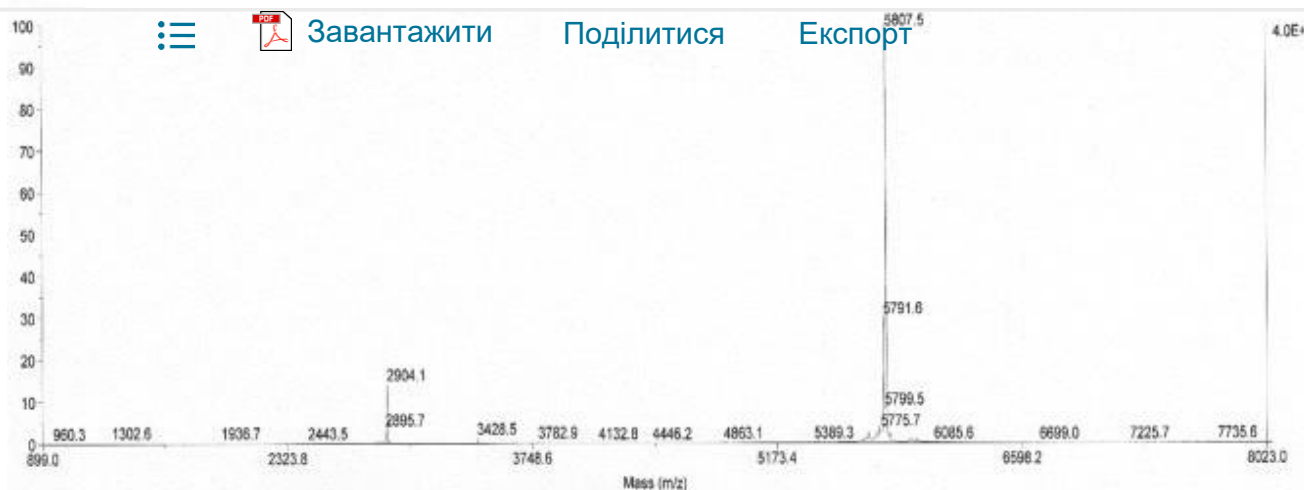
В кінці всього процесу ми отримали в середньому 2700 МО до 99% чистоти рекомбінантного людського інсуліну з 1 л культурального середовища методом триетапної [очистки](#), що складається з DEAE / Q Sepharose та RP-HPLC хроматографії. Молекулярна маса, отримана для інсуліну методом [ESI-MS](#), становила 5807,5 Да. Теоретично розрахована середня маса 5807,63 Да. Приклади результатів UHPLC та мас-спектрометрії показані на [фіг. 7](#) та [фіг. 8](#) .



[Завантажити](#): Завантажити зображення високої роздільної здатності (228 КБ)

[Завантажити](#): Завантажити повнорозмірне зображення

Рис. 7 . UHPLC аналіз очищеного рекомбінантного людського інсуліну. Значення RT інсуліну становить 3,748 хв. Чистота білка становить близько 99%.



Завантажити: Завантажити зображення високої роздільної здатності (479 КБ)

Завантажити: Завантажити повнорозмірне зображення

Рис.8 . Масовий спектр рекомбінантного людського інсуліну. Молекулярна маса, отримана для інсуліну методом **ESI-MS**, становила 5807,5 Да. Теоретична розрахункова маса становить 5807,63 Да.

5 . Висновки

Діабет належить до так званих "способів життя" або "цивілізаційних захворювань" - це головна загроза здоров'ю та добробуту людини в усьому світі. На сьогоднішній день найбільш ефективним методом лікування цього захворювання у разі **гіперглікемії** є все-таки доставка інсуліну. Таким чином, доцільно встановити ефективний та економічний протокол виробництва інсуліну. На закінчення ми тут повідомили про побудову нового вектора **експресії** PIBAINS та створення нового штаму бактерій-бактерій *E. coli* 20, який здатний виробляти людський інсулін з високою ефективністю. **Плазмиду** HE інтегрує в геном і залишається стабільним в протягом принаймні 80 поколінь без вибору антибіотика. Ми описали весь процес від культури клітин до кінця**включення** виділення та розчинення **організму** до **очищення** білка . У разі **ренатурації** при кімнатній температурі вихід був близько 95–96%, а при температурі 7–8 ° C вихід - близько 99%. Процес повторного згортання завершився через 18-19 годин, і було показано, що він залежить від **окислювально-відновного потенціалу** та значення рН, але не від температури. В результаті **бактеріальної культури** ми отримали в середньому 56 г мокрої **біомаси** та 14,5 г тіл включення, тоді як наприкінці всього процесу в середньому 2700 МО до 99% чистоти рекомбінантного людського інсуліну з 1 л культурального середовища шляхом тришагової процедури очищення, що складається з DEAE / Q Sepharose і RP - HPLC хроматографія, що є порівнянним результатом з іншими **системами експресії** [13]. Переваги використання нашого**штаму E. coli**20 полягає в тому, що право власності на запатентований штам дозволяє комерціалізувати винахід на ринку фармацевтичної промисловості. За оцінками MFD, відсоток хворих на цукровий діабет у дорослому

ПОЛЬС

населення в майбутньому може бути одержувачем результатів нашого проекту.

[Рекомендовані статті](#)[Цитуючи статті \(0\)](#)

Список літератури

- [1] М. Блаженство
Відкриття інсуліну
Університет Чикаго Прес , Чикаго (1982)
155 с
[Google Scholar](#)
- [2] <https://www.idf.org> .
[Google Scholar](#)
- [3] W. Landgraf , J. Sandow
Рекомбінантні людські інсуліни - клінічна ефективність та безпека при терапії діабету
Євро. Ендокринолог. , 12 (1) (2016) , стор 12 - 17
[Перегляд записів](#) [CrossRef](#) в [Google Академія Google](#)
- [4] P. Wang , NM Fiaschi-Taesch , RC Васавада , Д.К. Скотт , А. Гарсія-Осаїна , А.Ф. Стюарт
цукровий діабет - прогрес і проблеми в проліферації β-клітин людини
Нат. Преподобний ендокринолог. , 11 (4) (2015) , стор 201 - 212
[Перегляд записів](#) [CrossRef](#) в [Google Академія Google](#)
- [5] Р. Гільгенфельд , Г. Сейпке , Х. Берхтольд , Д. Р. Оуенс
Еволюція інсуліну гларгіну та його постійний внесок у догляд за діабетом
Наркотики , 74 (8) (2014) , стор 911 - 927
[Перегляд записів](#) [CrossRef](#) в [Google Академія Google](#)
- [6] YS Cheng , DY Kwoh , TJ Kwoh , BC BC Soltvedt , D. Zipser
Стабілізація білка, що розкладається шляхом його надмірної експресії в кишці
Гена , 14 (1–2) (1981) , стор 121 - 130
[Стаття](#) [Завантажити PDF](#) [Переглянути запис у](#) [службі Google Академія](#)

- [7] Так. Ченг, Відділення щільності білкових бактерій, що продукують білок, патент США 4, 480, 038, 1984.
[Google Scholar](#)
- [8] **Досліди**
Дж. Міллера

 [Завантажити](#) [Поліпшити](#) [Експорт](#)

Лабораторна преса «Холодна весна» (1972)
466 с

[Google Scholar](#)

- [9] Хартман Ж.Р., Менделловиц С., Горецький М. : Sposób Wytwarzania Insuliny Ludzkiej, Oraz Polipeptyd Hybrydowy. BIO-TECHNOLOGY GENERAL CORR, Iselin (США), патент PL 180818.
[Google Scholar](#)
- [10] PA Hallewell , FR Masiarz , RC Наджарян , JP Puma , М. Р. Кирогі , А. Рендолф , і ін.
КДНК людини Cu / Zn супероксиддисмутази: виділення клонів, що синтезують високий рівень активного або неактивного ферменту, з бібліотеки експресії
Нуклеїнові кислоти Res. , 13 (6) (1985) , С. 2017 - 2034
[Перегляд записів](#) [CrossRef](#) в [Google Академія Google](#)
- [11] JR Хартман, С. Менделловиц, М. Горецький, Покоління людського інсуліну, Міжнародний номер видання: Всесвітня міжнародна організація власності WO96 / 20724 A1.
[Google Scholar](#)
- [12] P. Borowicz, A. Płucienniczak, J. Mikołajczyk, T. Głąbski, D. Kurzynoga, D. Mikiewicz-Syguła та ін. Нові аналоги інсуліну тривалої активності. Європейська патентна заявка EP 2321344A2, 2009.
[Google Scholar](#)
- [13] Н. А. Baeshen , М. Н. Baeshen , А. Шейх , і ін.
Клітичні заводи для виробництва інсуліну
Мікроб. Фабрики клітин , 13 (2014) , с. 141
[Google Scholar](#)

© 2019 Автори. Опублікував Elsevier Inc.

ELSEVIER

Про ScienceDirect Віддалений доступ Магазинний візок Реклама Контакт та підтримка Правила та умови Політика конфіденційності

[використання печива](#) .

Авторські права ©2019 Elsevier BV або його ліцензіари або учасники. ScienceDirect® є зареєстрованою торговою маркою Elsevier BV 2019 Elsevier BV або його ліцензіати або учасники.

ScienceDirect® є зареєстрованою торговою маркою Elsevier BV

 RELX™

FEM 02438

Selective synthesis of polysaccharides by *Rhizobium trifolii*, strain TA-1

(*Rhizobium trifolii*; EPS; CPS; β -1,2-glucans)

L.P.T.M. Zevenhuizen

Laboratory of Microbiology, Agricultural University, Hesselink van Suchtelenweg 4, 6703 CT Wageningen, The Netherlands

Received 13 January 1986

Accepted after revision 19 February 1986

1. SUMMARY

Rhizobium trifolii strain TA-1, produces one of each of the exocellular polysaccharides EPS, CPS and β -1,2-glucans as a major product during cultivation in glutamic acid-mannitol-salts (GMS) medium at 25°. In batch culture, the major exocellular polysaccharide product was acidic exopolysaccharide (EPS) under conditions of air saturation; capsular polysaccharide (CPS) under conditions of N-limitation and moderate oxygen supply; and cyclic β -1,2-glucans at high cell density and severe oxygen limitation.

2. INTRODUCTION

Fast-growing rhizobia produce 3 different types of exopolysaccharides. These are, firstly, high-molecular-weight EPS, which are excreted into the medium and cause the cultures to become highly viscous; secondly, neutral insoluble CPS, which are deposited as voluminous masses around the cells; and thirdly cyclic β -1,2-glucans, which are accumulated in the cells and excreted into the medium.

Rhizobium leguminosarum and *R. trifolii* strains have been tested for polysaccharide production by

cultivation in 0.1% glutamic acid – 1% mannitol – salts medium (50 ml) in 100-ml Erlenmeyer flasks on a shaker at 25°. Most of the strains were found to produce mainly EPS and only little CPS, but *R. trifolii* strain TA-1, was exceptional in that it produced mostly CPS and only small amounts of EPS under these conditions [1,2]. When *R. trifolii* TA-1 was cultivated in a fermenter under forced aeration (100% oxygen concentration) a highly viscous culture was obtained, which contained EPS as the major product, and less CPS. These current experiments describe further the influence of cultural conditions on the ratios of EPS/CPS/glucans synthesised by *R. trifolii* TA-1.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Cultivation of organisms

GMS-medium was composed of (g/l) glutamic acid, 1; mannitol, 10; K_2HPO_4 , 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; $CaCl_2$, 0.04; trace elements (mg/l): $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 2.5; H_3BO_3 , 0.01; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.01; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.01; $MnCl_2$, 1.0; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.01; biotin, 10 $\mu g/l$; thiamine, 100 $\mu g/l$; pH 7.0. 4 $\times$ GMS medium was composed as follows (g/l): glutamic acid, 4; mannitol, 20; K_2HPO_4 , 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2;

Способ получения рекомбинантного инсулина человека

Abstract

Изобретение относится к биотехнологии. Способ заключается в том, что культивируют штамм-продуцент *E. coli* JM109/pPINS07, разрушают клетки дезинтеграцией, отделяют тельца включения, содержащие гибридный белок, растворяют их в буфере, содержащем мочевины и дитиотреитол, ренатурируют, очищают ренатурированный гибридный белок путем осаждения примесных соединений в 40% изопропанол с последующей хроматографией на КМ-сефарозе. Затем расщепляют гибридный белок трипсином, продукты трипсинолиза хроматографируют на СП-сефарозе с элюцией фракцией линейным градиентом хлористого натрия от 0 до 0,5 М в стартовом буфере, расщепляют карбоксипептидазой Б. Полученную фракцию инсулина очищают методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенных фазах с последующей гель-фильтрацией. Способ позволяет получить инсулин более высокого качества и степени очистки с чистотой не ниже 96% и активностью не ниже 26 Е/мг. Отсутствие принципиальных сложностей на всех промежуточных стадиях получения рекомбинантного инсулина человека, доступность используемых реактивов и надежность сорбентов открывает широкие возможности для промышленного освоения способа. 1 табл.

Images (1)

Таблица

Время, мин	Скорость элюции, см ³	% элютируемого с 0,1% ТФУ
0	3	26
5	3	27,5
15	3	28,5
20	3	30
25	3	70
30	3	26

Claims (1)

1.
- Способ получения рекомбинантного инсулина человека, включающий культивирование штамма-продуцента *Escherichia coli*, разрушение клеток дезинтеграцией, отделение телец включения, содержащих гибридный белок, их растворение в буфере, содержащем мочевины и дитиотреитол, ренатурацию и очистку ренатурированного гибридного белка, его расщепление трипсином и карбоксипептидазой Б с последующей очисткой и получением целевого продукта, отличающийся тем, что в качестве штамма-продуцента используют штамм *Escherichia coli* JM109/pPINS07, очистку ренатурированного гибридного белка осуществляют путем осаждения примесных соединений в 40% изопропанол с последующей хроматографией на КМ-сефарозе, расщепление гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой Б осуществляют последовательно, при этом продукты трипсинолиза хроматографируют на СП-сефарозе, уравновешенной 0,03 - 0,1 М аммоний-ацетатным буфером, рН 5,0 - 6,0, содержащим 6 М мочевины, с элюцией фракций линейным градиентом хлористого натрия 0 - 0,5 М в стартовом буфере, а полученную после расщепления карбоксипептидазой Б фракцию инсулина очищают методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенных фазах с последующей гель-фильтрацией.

Description

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к получению рекомбинантного инсулина человека для приготовления лекарственных форм различного срока действия при лечении сахарного диабета.

Инсулин - гормон поджелудочной железы, регулирующий процессы углеводного обмена и поддержания нормального уровня сахара в крови. Потребности в данном препарате не могут быть покрыты инсулином животного происхождения из-за ограниченности сырьевой базы. Кроме того, существует необходимость в использовании при лечении диабета различных препаратов инсулина. Поэтому разработка способов получения инсулина из рекомбинантных штаммов микроорганизмов является актуальной медицинской задачей.

Известен способ получения рекомбинантного инсулина человека, предложенный J. Nilsson с соавторами (1). Способ заключается в культивировании штамма-продуцента *E. coli*, продуцирующего проинсулин, содержащий два синтетических IgG связывающих домена стафилококкового белка А. Авторам удалось добиться высокой продуктивности штамма-продуцента за счет использования ими разработанной богатой питательной среды. Выход проинсулина составлял 3 г/л питательной среды. Схема выделения заключалась в разрушении бактериальных клеток, получении телец включения, содержащих проинсулин, растворении телец включения, окислительного сульфитолиза проинсулина, его ренатурации, очистке ренатурированного белка IgG-Sephareose аффинной хроматографией, расщеплении проинсулина протеолитическими ферментами (трипсином и карбоксипептидазой Б) и заключительной очистке инсулина высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографией.

Недостатками данного способа являются: использование богатой питательной среды для выращивания микроорганизма, длительное (около 34 часов) время выращивания, высокая себестоимость целевого продукта, обусловленная использованием для очистки аффинного сорбента, дорогого в производстве и недолговечного при промышленном использовании. Недостатком можно также считать использование в технологии получения инсулина

RU2141531C1

RU Grant

Find Prior Art Similar

Other languages: English

Inventor: Ю.Т. Калинин, Н.Н. Ураков, В.Т. Иванов, А.В. Степанов, А.И. Мирошников, В.Г. Гавриков, Д.И. Баирамашвили, И.А. Донецкий, В.Г. Коробко, Т.И. Костромина, В.А. Гуляев, М.А. Литвиненко, А.Н. Байдусь, В.И. Коробов, В.А. Красильников, Н.В. Борисов, Н.А. Шматченко, И.И. Воротникова, О.Г. Горкун, В.И. Дербышев, В.Н. Ноздрин, И.А. Дунайцев, М.Ю. Липин, И.И. Бекмуратова, В.А. Кобелева, А.П. Шепелин, М.Н. Мартовецкий, В.С. Федюкин, Л.И. Абросимова

Original Assignee: Российское акционерное общество открытого типа "Биопрепарат"

Priority date : 1999-05-26

Family: RU (1)

Date	App/Pub Number	Status
1999-05-26	RU99110299A	
1999-11-20	RU2141531C1	Grant

Info: [Non-patent citations \(1\)](#), [Cited by \(7\)](#), [Legal events](#), [Similar documents](#), [Priority and Related Applications](#)

External links: [Espacenet](#), [Global Dossier](#), [Discuss](#)

детергента Tween 20. Известно, что использование детергентов при выделении белков приводит к их сорбции на белок и присутствию детергента в конечном продукте.

В качестве ближайшего аналога принят способ получения рекомбинантного инсулина человека, заключающийся в том, что культивируют клетки штамма-продуцента *Escherichia coli* ДН5^q/pVK100, разрушают бактериальные клетки дезинтеграцией, отделяют фракцию телец включения, содержащих гибридный белок, от водорастворимых примесей при помощи центрифугирования, растворяют тельца включения в буфере, содержащем 8 М мочевины, 1 мМ дитиотреитола, 0,1 М трис HCl, pH 8,0, в течение 12 - 16 часов. Нерастворившиеся примеси удаляют центрифугированием, после чего увеличивают концентрацию дитиотреитола до 10 мМ и восстанавливают дисульфидные связи при 4°C в течение 1 часа. Раствор разбавляют в 5 раз холодной водой, на pH-метре доводят pH до 4,5 и выдерживают 2 часа при 4°C для формирования осадка. Осадок, содержащий гибридный белок, отделяют центрифугированием и ренатурируют, быстро растворяют в холодной воде при pH 10-12, после чего разводят 10 мМ глициновым буфером pH 10,8 и выдерживают при 4°C в течение ночи. После ультрафильтрации раствор подвергают гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50 и элюируют 10 мМ глициновым буфером. Собирают фракции, содержащие гибридный белок, проводят ультрафильтрацию и лиофильно высушивают. Полученный гибридный белок растворяют в 0,08 М трис HCl буфере, pH 7,5 до концентрации 10 мг/мл и расщепляют одновременно трипсином и карбоксипептидазой Б в соотношении 0,3:1:10 (белок карбоксипептидазы Б : белок трипсинат : гибридный белок) при 37°C в течение 30 минут. Затем добавляют изопропанол до 40%. Смесь немедленно подвергают хроматографической очистке на колонке с ДЭАЕ-сефадексом A-25 и элюируют 0,05М трис HCl буфером, pH 7,5 с 40% изопропанола с линейным градиентом хлористого натрия от 0 до 0,1М. После испарения изопропанола концентрацию хлористого натрия увеличивают до 25% и сдвигают pH до 2,0, добавляя 4 N соляную кислоту. Собирают осадок целевого продукта-инсулина (2).

Однако известный способ имеет ряд существенных недостатков. Использование гель-фильтрации на начальных стадиях вызывает значительные сложности при масштабировании процесса очистки, так как требует больших объемов сорбента. В полученном таким образом материале должны содержаться примеси небелковой природы, о которых не сообщается. Они могут существенно затруднить проведение регенерации сорбента. Известно также, что расщепление гибридного белка трипсином наряду с аргинин- и диаргинининсулином образуется и дезтреонининсулин из-за наличия в положении 29 В-цепи инсулина лизина. Разделение дезтреонининсулина и инсулина представляет определенную проблему из-за близости свойств данных полимеров. Авторы не сообщают, анализировалось ли содержание дезтреонининсулина, хотя при столь высоком соотношении трипсин : гибридный белок (1:10) вероятность его накопления в препарате очень велика.

Задачей изобретения является создание способа получения высокоочищенного рекомбинантного инсулина человека, позволяющего упростить технологию его производства.

Сущность изобретения состоит в том, что в способе получения рекомбинантного инсулина человека, включающем культивирование штамма-продуцента *Escherichia coli*, разрушение бактериальных клеток дезинтеграцией, отделение телец включения, содержащих гибридный белок, их растворение в буфере, содержащем мочевины и дитиотреитол, ренатурацию и очистку ренатурированного гибридного белка, его расщепление трипсином и карбоксипептидазой Б с последующей очисткой и получением целевого продукта, в качестве штамма-продуцента используют штамм *Escherichia coli* JM109/pPINS07, очистку ренатурированного гибридного белка осуществляют путем осаждения примесных соединений в 40% изопропанол с последующей хроматографией на КМ-сефарозе, расщепление гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой Б осуществляют последовательно, при этом продукты трипсинолиза хроматографируют на СП-сефарозе, уравновешенной 0,03-0,1 М аммоний-ацетатным буфером pH 5,0-6,0, содержащим 6 М мочевины, с элюцией фракций линейным градиентом хлористого натрия от 0 до 0,5 М в стартовом буфере, а полученную после расщепления карбоксипептидазой Б фракцию инсулина очищают методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенных фазах с последующей гель-фильтрацией.

Использование изобретения позволяет получить следующий технический результат.

Предлагаемый способ позволяет получить высокоочищенную субстанцию рекомбинантного инсулина человека с чистотой не ниже 96% и содержанием бактериальных пептидов и проинсулина требуемого уровня (10 ppM). При этом активность полученного инсулина составляет не ниже 26 Е/мг.

В предлагаемом способе все промежуточные стадии получения рекомбинантного инсулина человека не содержат принципиальных сложностей, препятствующих их масштабированию. Используемые реактивы широко доступны, сорбенты выдерживают многократные циклы. Полученная высокоочищенная субстанция инсулина соответствует требованиям зарубежных фармакопей, что открывает широкие возможности промышленного освоения способа.

Разработанная авторами определенная последовательность и сочетание технологических приемов выделения и очистки гибридного белка, в том числе его поэтапное расщепление трипсином и карбоксипептидазой Б с проведением хроматографии продуктов трипсинолиза, а также использование высокоэффективной жидкостной хроматографии позволило получить инсулин более высокого качества и степени очистки.

Способ осуществляется следующим образом.

Для получения рекомбинантного инсулина человека используют рекомбинантный штамм бактерии *Escherichia coli* JM109/pPINS07-продуцент гибридного полипептида, содержащего проинсулин человека. Штамм депонирован в Центральной коллекции микроорганизмов Российского акционерного общества "БИОПРЕПАРАТ" ЦКМК "Б" под N ЦКМ В-66ИН. Он получен авторами изобретения.

Для получения штамма-продуцента гибридного полипептида, содержащего проинсулин человека, трансформируют компетентные клетки *Escherichia coli* JM109 рекомбинантной плазмидной ДНК pPINS07.

Рекомбинантная плазмидная ДНК pPINS07 кодирует гибридный белок, в котором последовательность IgG-связывающего домена В стафилококкового белка А соединена через пептидный линкер His₆GlySerArg с аминокислотной последовательностью проинсулина человека. Она содержит EcoRI/HindIII-фрагмент плазмиды pKK223-3, включающий гибридный тас-промотор, ген β-лактамазы (bla), участок инициации репликации (ori) и терминатор транскрипции рибосомного оперона *E. coli*, EcoRI/BamHI-фрагмент (220 п.о.), кодирующий IgG-связывающий домен белка А из *S. aureus* и гексагистидиновый домен, и синтетический BamHI/HindIII-фрагмент (271 п.о.), кодирующий последовательность аргинил-проинсулина человека.

Штамм *E. coli* JM109/pPINS07 характеризуется следующими признаками.

Культурально-морфологические признаки.

Грамотрицательные прямые палочки 1,1-1,5 x 2,0-6,0 мкм, одиночные или в парах, подвижные, движутся парами при помощи перитрихальных жгутиков, или неподвижные. На питательном агаре с ампициллином к 16 - 18 часам роста образуют слабовыпуклые колонии 1,5-2,0 мм в диаметре, гладкие, с блестящей поверхностью, с ровным краем, сероватого цвета.

Физиолого-биохимические признаки.

Клетки растут в пределах от 4 до 45°C при оптимуме pH 5,8-7,8. Сбраживают до кислоты глюкозу, мальтозу, маннит, маннозу, глицерин.

В качестве источника азота используют как минеральные соли в аммонийной и нитратной форме, так и в органической форме в виде пептона, аминокислот.

Нитраты восстанавливают до нитритов.

Желатину не разжижают.

Индол не образуют.

Уреазная активность не обнаруживается.

Устойчивость к антибиотикам.

Проявляет устойчивость к ампициллину.

Пример.

Культивирование клеток рекомбинантного штамма *Escherichia coli* JM109/pPINS07-продуцента гибридного полипептида (белка), содержащего проинсулин человека, в условиях, обеспечивающих накопление гибридного белка. Используют питательную среду следующего состава (г/л):

Гидролизат казеина солянокислотный - 20

Экстракт пекарских дрожжей - 14

Двухзамещенный фосфат калия трехводный - 6

Однозамещенный фосфат калия - 3

Сульфат магния - 0,5

Натрий хлористый - 5

Глюкоза - 10

Ампициллина натриевая соль - 0,05

Дистиллированная вода - Остальное

Данную среду разливают в 7 качалочных колб по 100 мл и засевают жидкозаконсервированной культурой штамма-продуцента. Колбы помещают на 18 часов в термостатируемую качалку при 24°C. Полученным инокулятом засевают посевной ферментер емкостью 10 л с 7 л питательной среды аналогичного состава. Выращивание культуры в ферментере проводят при температуре 37°C, pH 7,0, который поддерживают путем автоматической подтитровки 40% раствором гидроокиси натрия при концентрации растворенного кислорода (50±15)% от насыщения, которую поддерживают путем изменения количества оборотов мешалки (от 100 до 800 об/мин) и подачи воздуха от 0,2 до 1,5 объемов воздуха по отношению к объему питательной среды в ферментере в минуту. Продолжительность выращивания - 8 часов до достижения культуральной жидкостью оптической плотности, равной 7 оптических единиц, измеряемой на спектрофотометре при длине волны 540 нм, в кювете с длиной оптического пути, равной 1 см.

Культуральную жидкость из лабораторного ферментера используют для засева ферментера объемом 100 дм³, содержащего 70 литров вышеуказанной питательной среды. Процесс биосинтеза гибридного белка в ферментере проводят при соблюдении следующих параметров, которые поддерживают автоматически с регистрацией на самописцах:

температуре 37°C;

pH 7,0, который поддерживают путем автоматической подтитровки 40%-ным раствором гидроокиси натрия;

концентрации растворенного кислорода (pO₂) - 50% от насыщения, которую поддерживают путем изменения количества оборотов мешалки (от 100 до 800 об/мин) и подачи воздуха от 0,2 до 1,5 объемов воздуха по отношению к объему питательной среды в ферментере в минуту;

пеногашение - на уровне датчика пенообразования с использованием пропинола или другого силиконового пеногасителя.

Во время ферментации каждые 30 минут отбирают пробы для измерения оптической плотности культуральной жидкости на спектрофотометре при длине волны 540 нм и длине оптического пути в кювете спектрофотометра, равной 1 см. При достижении оптической плотности 7,5 обычно через 6 часов от начала культивирования в логарифмической фазе роста проводят индукцию синтеза гибридного белка введением в ферментер 70 см³ раствора, содержащего 2,6 г изопропилтио-бета-D-галактопиранозид. После введения в ферментер индуктора биосинтеза гибридного белка культивирование ведут в течение 5 часов до достижения культурой оптической плотности, равной 30 ОЕ. Полученную биомассу концентрируют сепарированием и замораживают.

Далее осуществляют выделение и очистку гибридного белка, включающие следующие этапы.

Получение телец включения, содержащих гибридный белок рекомбинантного инсулина человека.

100 г осажденных клеток *E. coli* штамма-продуцента JM109/pPINS07 с суммарным содержанием белка 10 г, определяемым методом Лоури, и содержанием гибридного белка 2 г, определяемым электрофорезом в ПААГ и высокоэффективной жидкостной хроматографией, суспендируют в 500 мл буфера, pH 7,5, содержащего 0,05 М трис-(гидроксиметил)-аминометана, 0,05 М этилендиаминотетрауксусной кислоты, 2 М мочевины, и дезинтегрируют на ультразвуковом дезинтеграторе или на дезинтеграторе Гаулина. После разрушения клеток фракцию телец включения отделяют центрифугированием при 9000 об/мин в течение 30 минут.

Растворение телец включения.

Полученные тельца включения растворяют в соотношении 1:4 (вес телец включения в граммах, объем буфера в см³) на магнитной мешалке при постоянном перемешивании в 0,05 М трис-HCl, pH 8,0, содержащем 8,0 М мочевины и 0,001 М дитиотреитол. Растворение проводят при температуре 18°C в течение 12 часов.

Восстановление дисульфидных связей гибридного белка.

Раствор гибридного белка помещают в водяную баню и по достижении температуры 37°C добавляют до 5 мМ сухого дитиотреитола при постоянном перемешивании. После полного растворения соли смесь инкубируют в течение часа при постоянном перемешивании.

Кислотное осаждение гибридного белка.

Раствор гибридного белка разбавляют при перемешивании на магнитной мешалке пятью объемами предварительно охлажденной до 4°C ультрачистой водой 0,1 N соляной кислотой, доводят pH раствора до 4,5 и при температуре 4°C инкубируют раствор гибридного белка в течение 3 часов. В процессе инкубации образуется осадок, содержащий гибридный белок, который отделяют центрифугированием при 9000 об/мин в течение 30 минут.

Ренатурация гибридного белка.

Осадок взвешивают на весах, растворяют в двойном объеме по отношению к весу осадка ультрачистой воды, доводя до pH 12 1 N NaOH, при постоянном перемешивании. Нерастворившийся материал отделяют центрифугированием при 9000 об/мин в течение 30 минут. Супернатант помещают в емкость и добавляют 0,05 М глицин-NaOH буфер, pH 10,8 в количестве, необходимом для получения концентрации белка 0,5 мг/мл. Раствор оставляют при температуре 14°C на 14 часов.

Спиртовое осаждение примесных белков.

1 N соляной кислотой на pH-метре доводят pH раствора до 7,5. К раствору добавляют изопропанол до конечной концентрации, равной 40%.

Смесь инкубируют при температуре 4°C в течение 14 часов. Образующийся осадок отделяют центрифугированием при 9000 об/мин в течение 30 минут.

Хроматография гибридного белка на КМ-сефарозе.

Супернатант подвергают хроматографической очистке на КМ-сефарозе. Колонку размером 26/30, содержащую 30 мл КМ-сефарозы, уравнивают 0,05 М трис-НСl буфером, pH 7,5, с добавлением 1,5 М мочевины. Наносят на колонку раствор гибридного белка и промывают уравнивающим буфером до достижения базовой линии контрольного оборудования для детекции белков. Сорбированный белок элюируют с колонки, пропуская через нее исходный буфер с добавлением 0,25 М NaCl. Фракции, содержащие гибридный белок, объединяют и используют для получения высокоочищенной субстанции инсулина.

Расщепление гибридного белка трипсином.

Определяют в растворе содержание гибридного белка методом Лоури, доводят его концентрацию на ультрафильтрационной ячейке до 5 мг/мл и добавляют раствор трипсина в соотношении гибридный белок:трипсин, равном 600:1. Для остановки реакции триптического расщепления гибридного белка в раствор вносят трифторуксусную кислоту до pH 3,85. Критерием выбора времени остановки реакции триптического расщепления белка является прекращение накопления диаргинининсулина и увеличение содержания других продуктов (особенно, дезамидоинсулина).

Хроматография продуктов трипсинолиза гибридного белка на СП-сефарозе.

Раствор с продуктами триптического расщепления гибридного белка наносят на колонку размером 26/30, содержащую 100 мл СП-сефарозы ФФ, предварительно уравнивленную 0,03 М аммоний-ацетатным буфером, pH 5,0 с 6 М мочевиной. Промывают уравнивающим буфером до достижения базовой линии контрольного оборудования для детекции белков. Сорбированный материал элюируют линейным градиентом хлористого натрия от 0 до 0,5 М в стартовом буфере в течение 8 часов при скорости протока элюента 180 мл/час. Объединяют фракции, содержащие диаргинининсулин без примеси дезтреонининсулина.

В качестве уравнивающего может быть использован 0,02 М аммоний-ацетатный буфер, pH 6,0 с 6 М мочевины.

Удаление концевых аргининов обработкой карбоксипептидазой Б.

Объединенный материал, полученный после хроматографии на СП-сефарозе, концентрируют методом ультрафильтрации, определяют содержание белка и приводят раствор к следующим условиям: концентрация диаргинининсулина 1 мг/мл, мочевины 3 М, трис-НСl буфер, pH 7,85. Превращение диаргинининсулина в инсулин достигается путем его расщепления карбоксипептидазой Б в соотношении 1: 500 (количество белка карбоксипептидазы Б: количество белка диаргинининсулина). Для этого при комнатной температуре в раствор диаргинининсулина вносят при перемешивании расчетное количество карбоксипептидазы Б. Для остановки реакции под контролем pH-метра при непрерывном перемешивании в реакционную смесь добавляют 10%-ный раствор трифторуксусной кислоты, доводя pH раствора до 3,85. Критерием выбора времени остановки реакции является полное превращение диаргинининсулина в инсулин, определяемое аналитически методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Очистка инсулина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенных фазах.

Полученный раствор инсулина концентрируют ультрафильтрацией до концентрации 8 мг белка в 1 мл и подвергают хроматографической очистке на обращенных фазах.

Очистку инсулина проводят на стандартном оборудовании для обращенно-фазовой жидкостной хроматографии высокого давления любой из фирм, производящих такое оборудование. Для проведения работ устанавливают колонку для хроматографии "Диасорб" C₁₆T, 25 x 250, 6 - 7 мкм или аналогичную другой фирмы-производителя. Колонку уравнивают водным раствором, содержащим 10% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты. В подготовленную колонку при помощи петли и инжектора вводят пробу, содержащую инсулин в количестве 1,0 г белка. Разделение ведут по программе, представленной в таблице.

Регистрацию процесса разделения ведут при 220 нм на проточном спектрофотометре при чувствительности прибора 0,1. Собранные фракции основного пика инсулина анализируют на содержание примесей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Фракции инсулина, не содержащие примесей дезамидоинсулина, используют для дальнейшей очистки.

Получение высушенного инсулина.

Из объединенных фракций, содержащих инсулин, удаляют ацетонитрил путем выпаривания на ротормном испарителе, после чего препарат лиофильно высушивают.

Очистка инсулина методом гель-фильтрации.

Гель-фильтрацию инсулина проводят на колонке размером 26/60, содержащей 250 мл сефадекса G-50. Колонку уравнивают 1 М раствором уксусной кислоты. Препарат инсулина человека в 1 М растворе уксусной кислоты доводят до оптической плотности 90-100 единиц при длине волны, равной 277 нм. При необходимости, если раствор инсулина мутный, производят корректировку pH до 3,0 концентрированной уксусной кислотой. Перед введением раствора инсулина в хроматографическую колонку его фильтруют через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Раствор инсулина вводят в верхнюю часть колонки с помощью перистальтического насоса со скоростью 4,8 мл/см² в час. После введения раствора инсулина в колонку подают элюент, 1 М раствор уксусной кислоты, с той же скоростью. Раствор 1 М уксусной кислоты пропускают через колонку с носителем до отсутствия поглощения в ультрафиолетовой части спектра при 277 нм. Фракции белка объединяют в соответствии с хроматографическими зонами на выходной кривой распределения белков. В объединенной фракции, используемой как субстанция инсулина, спектрофотометрически определяют содержание белка и биологическую активность, которая составляет 26,5 Е/мг инсулина.

Таким образом, проведение хроматографической очистки на нейтральных носителях позволяет получить инсулин человека с чистотой не ниже 96% и активностью не ниже 26 Е/мг.

Подлинность полученного целевого продукта подтверждена по следующим параметрам:

по совпадению времени удержания основного пика целевого продукта и международного референс-стандарта USP (Фармакопия USP 23, США);
по определению биологической активности целевого продукта (ВФС 42-3045-98), которая составляет не менее 26 Ед/мг;
по совпадению аминокислотного состава целевого продукта и референс-стандартного образца фирмы "Эли Лилли", США. Определение аминокислотного состава проводили по НД-42-8098-97 фирмы "Ново Нордикс", Дания;
по совпадению аминокислотных последовательностей с С- и N-концов (по 15 аминокислот), которое проводили по стандартной методике (Methods in Enzymology, v. 25, 1967);
по совпадению пептидных карт целевого продукта и референс-стандарта USP (институт биоорганической химии РАН, в печати).

Чистота полученного целевого продукта подтверждена по фармакопии USP 23, США и составила:

по содержанию целевого продукта, определяемого методом ВЭЖХ, не менее 95%;
по содержанию проинсулина, менее 10 ppm;

по содержанию бактериальных пептидов, менее 10 ppm;
по содержанию дезамидоинсулина, менее 2%.

Источники информации

1. Nilson J., Jonasson P., Samuelsson E., Stahl S., Uhlen M. Integrated production of human insulin and its C-peptide. 1996, Journal of biotechnology, v. 48, p. 241-250.

2. Chen J. -Q. , Zhang H.-T., Hu M.-H., Tang J.-G. Production of human insulin in an E. coli system with met-lys-human proinsulin as the expressed precursor. 1995, Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 55, p. 5-15.

Non-Patent Citations (1)

Title
Chen J.-O. et al. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1995, v.55, p.5-15. *

* Cited by examiner, † Cited by third party

Cited By (7)

Publication number	Priority date	Publication date	Assignee	Title
WO2005066208A2 *	2004-01-09	2005-07-21	Instytut Biotechnologii i Antybiotykow	Method for production of recombinant growth hormone in form of hybrid protein
WO2009041858A1 *	2007-09-24	2009-04-02	Obschestvo S Ogranichennoi Otvetstvennostyu 'gerofarm'	Procédé de fabrication de c-petide recombinante de la proinsuline humaine
WO2009133529A2 *	2008-04-30	2009-11-05	Wockhardt Research Centre	Processes for refolding of insulin
EP2502633A1	2011-03-24	2012-09-26	Winsort Management Inc.	Recombinant plasmid DNA pMSIN4, encoding a hybrid polypeptide comprising human insulin precursor, E. coli strain BL21 (DE3) / pMSIN4 - producer of recombinant human insulin, the method for the recombinant human insulin production
US8394921B2	2006-07-25	2013-03-12	Lipoxen Technologies Limited	N-terminal derivatisation of proteins with polysaccharides
RU2491345C2 *	2008-02-06	2013-08-27	Байокон Лимитид	Ферментационная среда и способ для получения рекомбинантных белков
RU2520810C2 *	2006-11-08	2014-06-27	Вайет	Рационально разработанные среды для культивирования клеток
Family To Family Citations				

* Cited by examiner, † Cited by third party, ‡ Family to family citation

Similar Documents

Publication	Publication Date	Title
von Ehrenstein	1967	[76] Isolation of sRNA from intact Escherichia coli cells
Anastasi et al.	1971	Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibiansBombina andAlytes
Frolik et al.	1983	Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta
Magalhaes et al.	2005	Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin
Hansson et al.	1994	Single–Step Recovery of a Secreted Recombinant Protein by Expanded Bed Adsorption
Salter et al.	1979	The origin of nitrogen incorporated into compounds in the rumen bacteria of steers given protein-and urea-containing diets
US5614379A	1997-03-25	Process for preparing anti-obesity protein
US5484887A	1996-01-16	Homogeneous interleukin 1
Goebel et al.	1958	COLICINE K: II. THE PREPARATION AND PROPERTIES OF A SUBSTANCE HAVING COLICINE K ACTIVITY
US5310663A	1994-05-10	Affnity peptides
Randazzo et al.	1992	[34] Preparation of recombinant ADP-ribosylation factor
Drapeau et al.	1972	Purification and properties of an extracellular protease of Staphylococcus aureus
Nakamura et al.	1976	Purification and chemical analysis of microbial cell flocculant produced by Aspergillus sojae AJ7002
Kurosky et al.	1977	Covalent structure of the beta chain of cholera enterotoxin.

Moks et al.	1987	Large-Scale Affinity Purification of Human Insulin-Like Growth Factor I from Culture Medium of Escherichia Coli
Dasmahapatra et al.	1981	Protein synthesis in yeast. I. Purification and properties of elongation factor 3 from Saccharomyces cerevisiae.
Bennick	1977	Chemical and physical characterization of a phosphoprotein, protein C, from human saliva and comparison with a related protein A
WO2011015926A1	2011-02-10	A process of fermentation, purification and production of recombinant soluble tumour necrosis factor alfa receptor (tnfr) - human igg fc fusion protein
Cseh et al.	1989	Alternative cleavage of the cachectin/tumor necrosis factor propeptide results in a larger, inactive form of secreted protein.
Henderson et al.	1983	A rapid, large scale purification procedure for gibbon interleukin 2.
WO1994000463A2	1994-01-06	Production of hyaluronic acid by transeformed microorganisms
US5219749A	1993-06-15	Process for isolating and preparing purified chitin deacetylase
US5424287A	1995-06-13	Extract of bacterial macromolecules, a process for its preparation and a pharmaceutical composition containing the same
Mitchell et al.	1983	Production of different pathogenic symptoms and different toxins by strains of Pseudomonas syringae pv. tomato not distinguishable by gel-immunodiffusion assay
US4649111A	1987-03-10	Process for the preparation of 5'-ribonucleotides

Priority And Related Applications

Priority Applications (1)

▲

Application	Priority date	Filing date	Title
RU99110299A	1999-05-26	1999-05-26	Способ получения рекомбинантного инсулина человека

Applications Claiming Priority (1)

▲

Application	Filing date	Title
RU99110299A	1999-05-26	Способ получения рекомбинантного инсулина человека

Legal Events

▲

Date	Code	Title	Description
2011-06-20	PD4A	Correction of name of patent owner	
2013-01-27	PD4A	Correction of name of patent owner	

Data provided by IFI CLAIMS Patent Services



Упрощенный и эффективный процесс производства инсулина в *Pichia pastoris*

Сулена Полез, Доменико Ориги, Сотир Захариев, Коррадо Гуарначча, Серхио Г. Тисминецкий, Наташа Скоко, Марко Баралл

Опубликовано: 1 декабря 2016 г. • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207>

Аннотация

Существенным барьером для инсулина является доступность. В этой рукописи мы описываем улучшения основных этапов процесса производства инсулина в *Pichia pastoris*, которые сокращают затраты и время. Стратегия извлечения и обработки человеческого предшественника инсулина была упрощена до двух этапов от биореактора до реакции транспептидации. На первом этапе прекурсор инсулина, секретируемый во время фазы индукции метанола, извлекается непосредственно из культурального бульона с использованием фильтрации в тангенциальном потоке с Prostack™ Модуль устранения трудоемких и трудоемких многоступенчатых осветлений, в том числе центрифугирования. На втором этапе белок наносит при очень высоких нагрузках на катионообменную смолу и элюируют в смеси воды и этанола с получением концентрированного предшественника инсулина, подходящего для использования непосредственно в реакции транспептидации. Общий выход предшественника инсулина человеческого инсулину составлял 51% и состоял из трех стадий хроматографии очистки. Кроме того, мы описываем способ извлечения избытка H-Thr (tBu)-OtBu из реакционной смеси для транспептидации, одного из более дорогостоящих реагентов в процессе, наряду с его успешным повторным использованием.

Образец цитирования: Полез С., Ориги Д., Захариев С., Гуарначча С., Тисминецкий С. Г., Скоко Н. и др. (2016) Упрощенный и эффективный процесс производства инсулина в *Pichia pastoris*. PLOS ONE 11 (12): e0167207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207>

Редактор: Израиль Силман, Научный институт Вейцмана, ИЗРАИЛЬ

Получено: 5 июля 2016 г.; **Принят:** 10 ноября 2016 г.; **Опубликовано:** 1 декабря 2016 г.

Авторское право: © 2016 Polez et al. Это статья открытого доступа, распространяемая в соответствии с условиями лицензии Creative Commons Attribution License, которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что авторы и источник были зачислены.

Доступность данных: все соответствующие данные находятся в документе и его файлах вспомогательной информации.

Финансирование: авторы не получили конкретного финансирования для этой работы. Ориги Доменико работает в Merck, производителе модуля Prostack, использованного в этом исследовании. Мерк оказывал поддержку в виде оклада автора ОД, но не играл никакой дополнительной роли в планировании исследования, сборе и анализе данных, принятии решения о публикации или подготовке рукописи.

Конкурирующие интересы: У нас есть следующие интересы: Ориги Доменико работает в Merck, производителе модуля Prostack, использованного в этом исследовании. Нет никаких патентов, продуктов в разработке или продаваемых продуктов, чтобы объявить. Это не меняет нашу приверженность всем политикам PLOS ONE в отношении обмена данными и материалами.

Вступление

Инсулин является относительно недорогим лекарством, однако хроническая природа диабета означает, что стоимость лечения инсулином высока, и вместе с растущим числом пациентов это финансовое бремя бросает вызов системам здравоохранения во всем мире. Снижение цен необходимо для улучшения его доступности, особенно в странах с доходами ниже среднего уровня [1].

В настоящее время используются два основных пути крупномасштабного производства рекомбинантного человеческого инсулина [2]. Один маршрут использует *E. coli* в качестве хозяина экспрессии, где сверхэкспрессированный предшественник инсулина (IP) образует тельца включения, требующие растворения и окислительного рефолдинга. Второй путь использует основанные на дрожжах системы экспрессии (главным образом *Saccharomyces cerevisiae*), где ИП непосредственно секретируется в супернатанте культуры в его правильно свернутой конформации. Половина мирового запаса инсулина происходит от *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Однако стандартный процесс восстановления и очистки человеческого инсулина, продуцируемого в *Saccharomyces cerevisiae* может включать до пятнадцати шагов [4].

Метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* показали ряд привлекательных характеристик для производства гетерологичного белка благодаря своей способности достигать высоких плотностей клеток и экспрессии больших количеств рекомбинантных белков под контролем сильных и строго регулируемых промоторов [5]. Используя эту систему, мы ранее описали простой двухфазный процесс культивирования, состоящий из партии глицерина и фазы партии с постоянной подачей метанола для производства секреторной IP, что приводит к ~2-кратному увеличению продукции IP по сравнению с самыми высокими зарегистрированными значениями, значительно увеличивая эффективность производства инсулина [6].

В этой рукописи, в то время как упрощенный протокол ферментации с подпиткой для производства IP, мы разработали оптимизированную и масштабируемую стратегию, использующую небольшой масштаб Prosta[™] прототип системы Tangential Flow Filtration (TFF) для извлечения IP из культурального бульона, исключая трудоемкие этапы центрифугирования бульона и вторичного осветления супернатанта. Впоследствии мы разработали новую и эффективную хроматографическую процедуру для очистки IP, используя катионообменную смолу с высокой загрузочной способностью и осуществляя элюирование IP в смеси вода / этанол, которая затем легко применима в реакции транспептидации без промежуточных стадий. Эти модификации позволили сократить весь процесс производства инсулина, от супернатанта культуры до конечного человеческого инсулина, до семи этапов. Представленные здесь решения сокращают время процесса и оказывают существенное влияние на финансовые и операционные планы в рамках процедуры масштабирования, минуя несколько этапов сублимационной сушки в процессе.

Материалы и методы

Штаммы и векторы

Построение вектора экспрессии IP pPIC9K проводили, как описано ранее [6]. Плазмида экспрессии pPIC9K-IP - линейаризовали ферментом рестрикции *Bgl*III и электропорации в *P. pastoris* GS115his деформации[™] (Invitrogen). Трансформанты отбирали на чашках с увеличивающейся концентрацией антибиотика G418 для отбора клонов мультиколии (протоколы *Pichia*, Invitrogen). Отобранные клоны выращивали в жидкой культуре и культуральный супернатант тестировали на продуцирование IP с помощью SDS-PAGE и RP-HPLC. Лучший продуктивный клон был выращен на 2 г л⁻¹ из G418. Определение фенотипа утилизации метанола проводили стандартным протоколом высева колоний на чашки с минимальной декстрозой (MD) и чашки с минимальным метанолом (MM). Отобранный клон нормально рос на чашке MD, но демонстрировал незначительный рост на чашке MM, что указывает на его фенотип Mut^s (медленное использование метанола), где ген AOX1 нокаутирован.

Условия роста культуры и производство IS

Предварительную культуру готовили путем инокуляции 100 мл YPG одной колонией из чашки пептон-декстрозы дрожжевого экстракта с 2 г л⁻¹ G418 и инкубирования в течение 24 часов при 30 ° C. Затем его разбавляли до 1,2 л и инкубировали, как указано выше. Предварительно посевной материал затем переносили в 30 л биореактор Sartorius BIOSTAT Cplus-C30 (Sartorius), содержащий 15 л автоклавированной питательной среды, доведенной до pH 5,0 с помощью 25% NH₄ OH. Состав питательной среды: глицерин 62,5 г л⁻¹, H₃PO₄ 26,7 мл л⁻¹, CaSO₄ × 2H₂O 0,93 г л⁻¹, K₂SO₄ 18,2 г л⁻¹, MgSO₄ × 7H₂O 14,9 г л⁻¹, KOH 4,13 г л⁻¹. Перед инокуляцией 4 мл биотина 0,2 г л⁻¹ и 4 мл PMT1 добавляли в питательную среду. Состав PTM1: CuSO₄ × 5H₂O 6 г л⁻¹, KI 0,08 г л⁻¹, MnSO₄ × H₂O 3 г л⁻¹, H₃BO₃ 0,02 г л⁻¹, CaSO₄ × 2H₂O 0,5 г л⁻¹, ZnSO₄ × 7H₂O 35,59 г л⁻¹, H₂SO₄ 5 мл л⁻¹ FeSO₄ × 7H₂O 65 г л⁻¹, CoCl₂ × 6H₂O 0,5 г л⁻¹, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4H₂O 0,2 г л⁻¹ [7]. Скорость аэрации поддерживалась на уровне 1,5 по объему для впускаемых газов (воздуха и кислорода), а скорость мешалки регулировалась в диапазоне от 200 до 800 об / мин, чтобы поддерживать концентрацию растворенного кислорода (DO) на 35% постоянной в течение всего процесса. Температуру поддерживали на уровне 30 ° C и pH на уровне 5,0 с помощью 25% NH₄ OH или H₃PO₄. В качестве пеногасителя использовали Schill and Schelinger Struktol J673A [8].

Через 23 часа, когда весь глицерин был истощен, на что указывает увеличение концентрации DO, фазу подачи глицерина с раствором глицерина (50% глицерина (вес / вес), 4 мл л⁻¹ раствора биотина 0,2 г л⁻¹ и 4 мл л⁻¹ (PMT1) при скорости 15 мл л⁻¹ ч⁻¹. Через 6 часов производство IP инициировали путем поэтапного добавления раствора метанола (99,2% (мас. / Мас.) Метанола и 4 мл л⁻¹ биотина, 0,2 г л⁻¹ и 4 мл л⁻¹ PTM1). В первые 6 часов скорость добавления метанола составляла 1,1 мл л⁻¹ ч⁻¹. Впоследствии скорость потока была увеличена до 6,6 мл л⁻¹ ч⁻¹ и поддерживается постоянным в течение следующих 6 дней. Количественное определение предшественника инсулина (IP) проводили с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ с использованием колонки Vydac 214 MS C4 (4,6 × 250 мм, 5 мкм). Подвижная фаза А представляла собой 0,1% (об. / Об.) TFA в воде, и элюирование проводили при 25 ° C с градиентом подвижной фазы В (0,1% TFA (об. / Об.) В ацетонитриле) следующим образом: 0–20% В (0–6 мин), 20–46% В (6–32 мин). Поток составлял 1 мл / мин, а выход колонки контролировали при 280 нм. Была проведена калибровочная кривая с CRS человеческого инсулина от Европейской Фармакопеи (EP) для экстраполяции количества предшественника инсулина и других видов инсулина.

Восстановление IP из культурального бульона с фильтрацией тангенциальным потоком

pH культурального бульона доводили до 3,0 с помощью 85% фосфорной кислоты. Культуральный бульон (4 л) осветляли в прототипе системы фильтрации тангенциального потока Prosta[™] (Merck Millipore). Модуль-прототип включает мембрану Durapore 0,22 мкм (PVDF) и имеет площадь поверхности 0,063 м². Вторичный насос размещен на отверстии для пермеата устройства, чтобы контролировать скорость извлечения пермеата и избежать возможного преждевременного закупоривания мембраны из-за высокой внутренней проницаемости, которая обычно проявляется микрофильтрационными мембранами в начале фильтрации.

Концентрацию образца затем проводили при скорости извлечения пермеата 27,5 лм / ч, 74% критического потока пермеата (CPF). Концентрацию останавливали при коэффициенте объемной концентрации (VCF), равном 2,7X. Диафильтрацию проводили с водой марки Milli-Q циклическим образом, добавляя объем, соответствующий концентрированному урожаю, удваивая первоначальный объем подачи и затем уменьшая объем подачи до исходного уровня (прерывистый режим). Это было сделано для того, чтобы избежать высокого давления (давление на входе и TMP, соответственно, 1,5 бар и 0,8–1 бар), и, таким образом, циклически ослабить поляризационный слой из-за высокого содержания твердых веществ, достигаемого после концентрации. Объем диафильтрации составлял 6,5 л, поэтому общий экстрагированный объем (пермеат и диафильтрат), содержащий молекулу IP, составлял 9 л.

IP очистка и концентрация

Очистку IP проводили с помощью катионообменной хроматографии с использованием смолы Toyopearl GigaCap S-650 M (Tosoh Bioscience) или смолы Sepharose SP Fast Flow (GE Healthcare). 110 мг IP загружали на каждый мл смолы Toyopearl GigaCap S-650 M (объем колонки 105 мл) непосредственно из системы TFF. Проводимость образца составляла 15 мСм / см. Подвижная фаза А: 20 ммоль л⁻¹ NaOAc, pH 4,0, подвижная фаза В: 20 ммоль л⁻¹ NaOAc, pH 4,0, EtOH 50% и подвижная фаза С: 20 ммоль л⁻¹ NaOAc, pH 4,0, EtOH 50 %, NaCl 0,5 моль л⁻¹. Образец загружали на колонку, предварительно уравновешенную в подвижной фазе А со скоростью потока 137,6 см ч⁻¹. После загрузки образца колонку

промывали 3 объемами колонки подвижной фазы А. Скорость потока уменьшали до 45,9 см ч⁻¹ и начинали элюцию подвижной фазой В для 3,5 объемов колонки. Связанный IP элюировали из колонки подвижной фазой С со скоростью потока 45,9 см ч⁻¹. Большинство IP элюировали в первой колонке объема и концентрации получали была 80 мг мл⁻¹.

Реакция транспептидации, снятие защиты и очистка человеческого инсулина

IP элюировали в 20 ммоль L⁻¹ NaOAc, pH 4,0, EtOH 50%, NaCl 0,5 моль L⁻¹, непосредственно подвергали транспептидации. Реакцию транспептидирования проводили в смеси, содержащей 2,5 г IP (8,27 ммоль л⁻¹), 0,1 г свиного трипсина (1/25, вес / вес по отношению к IP, 0,08 ммоль л⁻¹), 7 ммоль л⁻¹ CaCl₂, 0,4 моль L⁻¹ H-Thr (tBu) -OtBu.AcOH, 37,5% диметилформамид, pH доводят до 7,0 с помощью трис-основания. Реакцию проводили при 20 ° С в течение 24 часов.

Реакцию останавливали разбавлением смеси 100 ммоль L⁻¹ NaOAc-буфера, pH 4,0 до конечной концентрации IP 2 г L⁻¹ и загружали на смолу PLRP-S 300A 8 мкм (Agilent Technologies). Связанный сложный эфир инсулина элюировали со скоростью потока 62,4 см ч⁻¹ с помощью градиента, образованного путем смешивания растворов А (0,2 моль л⁻¹ аммонийсульфатного буфера, pH 2,0) и В (0,1 моль л⁻¹ аммонийсульфатного буфера с 40 % (об. / об.) 2-пропанола) следующим образом: 0–60% В, 60% В (2,3 объема колонки, CV), 60–75% В (4 CV), 75% В (0,5 CV), 75–81% В (4,7 CV). Эфир инсулина элюируется из колонки во время последней стадии градиента.

Очищенный сложный эфир инсулина кристаллизовали путем добавления 2 мг ZnCl₂ на каждый мг преинсулина, доведения до pH 6 и инкубации при + 4 ° С в течение 16 часов. Кристаллы сложного эфира инсулина извлекали центрифугированием при 5000 g в течение 20 минут при + 4 ° С (центрифуга Sorvall RC 5B plus, ротор SLA3000) и высушивали при комнатной температуре. Эфир инсулина был превращен в человеческий инсулин путем удаления третичных бутильных групп треонина в положении В30 путем ацидолиза трифторуксусной кислотой (реакция снятия защиты), как описано ранее [6]. После 60 минут снятия защиты реакционную смесь разбавляли 1 мг / мл в 50 ммоль L⁻¹ NaOAc и pH доводили до 2,8 для загрузки на смолу PLRP-S 300A 8 мкм. В качестве элюирования использовали 50 ммоль л⁻¹ Na₂ SO₄ + 10% 2-пропанол + 2% уксусная кислота в качестве подвижной фазы А и 50 ммоль L⁻¹ Na₂ SO₄ + 50% 2-пропанол + 2% уксусная кислота в качестве подвижной фазы В в градиентном режиме: 0–18% В (0,1 CV), 18% В (1 CV), 18–38% В (7,8 CV), 38–100% В (0,5 CV). Человеческий инсулин элюируется из колонки с шагом 18–38% В.

Все реагенты были приобретены у Sigma, кроме: H-Thr (tBu) -OtBu.AcOH (Unibiochem), Трис (Invitrogen), диметилформамид (Romil), CaCl₂ (Merck). Свиной трипсин был приобретен у Sigma (13000–20000 ед. Ед. / Мг, T0303).

Извлечение избытка H-Thr (tBu) -OtBu.AcOH

Проточный объем вплоть до первого пика белка из препаративной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ, посттранспептидация) собирали и подтверждали с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ и детектора испарительного рассеяния света (Alltech 3300 ELSD от Grace, Columbia), Штат Мэриленд, США), содержит H-Thr (tBu) -OtBu. Из этой фракции мы извлекли H-Thr (tBu) -OtBu путем экстракции водным органическим растворителем [9]. 1,8 л фракции «от прохождения к первому пику» смешивали с 150 г Na₂ CO₃ и 50 г NaCl. H-Thr (tBu) -OtBu экстрагировали 200 мл, а затем трижды по 100 мл EtOAc / Et₂O (1/1, об. / Об.). Верхние слои, содержащие H-Thr (tBu) -OtBu, собирали и снова экстрагировали 100 мл насыщенного раствора NaCl. Кроме того, собранный органический слой, содержащий H-Thr (tBu) -OtBu, сушили с 22 г Na₂ SO₄, фильтровали и нерастворимый Na₂ SO₄ на фильтре дважды промывали 30 мл EtOAc. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Остаток (прозрачное масло) высушивали при комнатной температуре в вакууме при остаточном давлении 0,5 мбар до постоянного веса (около 24 часов). Чистота экстрагированного H-Thr (tBu) -OtBu была подтверждена аналитическим анализом ОФ-ВЭЖХ на колонке Gemini 5RP18 4,6 × 150 мм (Phenomenex). Введенный образец составлял около 0,06 мг. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% (об. / Об.) TFA в воде, и элюцию проводили со скоростью 1 мл / мин с градиентом до подвижной фазы В (0,1% TFA (об. / Об.) В ацетонитриле) следующим образом: 5% (0–1 мин), 5–100% В (1–31 мин). Время удерживания H-Thr (tBu) -OtBu составляло 12,36 мин. и выход колонки контролировался УФ при 214 нм и детектором ELSD.

Масс-спектрометрии

Масс-спектрометрия с электрораспылением (ESI-MS) была выполнена с помощью масс-спектрометра с ионной ловушкой (amaZonSL, Bruker Daltonics). Образцы либо восстанавливали в 0,1% -ной муравьиной кислоте в 50% -ном ацетонитриле и непосредственно вливали, либо анализировали с помощью ЖХ-МС с использованием 0,1% подвижной фазы муравьиная кислота / вода и ацетонитрил. Спектры получали в режиме положительных ионов с использованием программного обеспечения Compass Trap Control и деконволютировали для получения моноизотопных или средних масс с использованием программного обеспечения Compass Data Analysis (Bruker Daltonics).

Результаты

Производство предшественника инсулина в периодической ферментации с подпиткой

Нуклеотидная последовательность IP человека была оптимизирована по кодонам для экспрессии в *Pichia pastoris*, химически синтезирована и сконструирована, как описано ранее [6]. Было применено N-концевое удлинение предшественника инсулина (EEAEAEAEPK), поскольку было показано, что это повышает эффективность эндопротеазы Kex2 и выход ферментации IP [10]. Ген IP - был слит в рамке с S - сигнальная последовательность α-фактора *cerevisiae* в интегративном векторе pPIC9K. Лучший IP продуцирующий клон преобразованного *P. pastoris* GS115 штамм был выбран на G418, содержащий пластину (2 г L⁻¹), и было обнаружено, что Mut^S. Ферментацию с высокой плотностью проводили в 30 л биореакторе с использованием 15 л питательных сред, как описано в материале и способах. Этот упрощенный метод ферментации без необходимости в детекторе метанола и постоянно определенном делении концентрации метанола в процессе работы приводил в среднем к 308 г л⁻¹ (в расчете на 3 ферментации) массы влажных клеток и уровню экспрессии IP в супернатанте культуры 2,26 г. Л⁻¹. Культуральный супернатант из биореактора в течение 6 дней индукции метанолом подвергали масс-спектрометрическому анализу и обнаруживали виды предшественников инсулина с разной длиной N-концевого удлинения EEAEAEAEPK (фиг.1 S1). Это было относительно неожиданно, так как было показано, что использование N-концевого удлинения предшественника инсулина (EEAEAEAEPK) повышает эффективность эндопротеазы Kex2 и введение Glu перед N-концевым Glu для ингибирования расщепления дипептидиламинопептидазой А (DPAPA) [10]. Более того, в этом исследовании наблюдалось, что удлинение N-конца защищает от действия Yarp3p путем

введения Pro перед Lys, не влияя на эффективность обработки Kex2. Тем не менее, никаких других видов, соответствующих продуктам разложения IP, обнаружено не было, что свидетельствует о том, что во время процесса не происходит значительного лизиса клеток или разложения IP ([S1 Рис](#)).

Эта секреторная продукция IP высокого уровня в культуральном супернатанте выгодно отличается от самых высоких выходов, ранее опубликованных от 1,5 до 3,84 г л⁻¹ [[6](#) , [7](#) , [11](#)], и значительно выше, чем у других опубликованных, которые находятся в диапазоне от 0,18 до 0,3 г л⁻¹ [[12](#) - [15](#)].

Выяснение культуры клеток биореактора в системе фильтрации с тангенциальным потоком

Для отделения клеток от культурального бульона использовалось устройство мембранных пластин с уложенным тангенциальным потоком (прототип малого масштаба Prostack[™], Merck Millipore) с открытыми каналами подачи в системе фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) [[16](#)]. Таким образом, мы обошли классическую процедуру осветления, которая включает комбинацию центрифугирования и глубокой фильтрации. Prostack[™] Устройство может обрабатывать потоки подачи с высокой вязкостью и высоким содержанием твердых частиц / твердых частиц из-за отсутствия экранов, усиливающих турбулентность, между мембранными пластинами, которые обычно присутствуют в других типичных устройствах TFF в кассетах. Ферментационный бульон с концентрацией клеток 34% мас. / Об. (9,5 кг массы влажных клеток в 28 л собранного культурального бульона) с мутностью > 1000 NTU использовали, так как это представляло лучший кандидат для подачи потока, будучи более концентрированным из Выполнено 3 ферментации для изучения концентрационных возможностей устройства Prostack[™].

Эксперимент по осветлению проводился с использованием небольшого прототипа модуля Prostack[™] от Merck Millipore ([рис. 1A](#)), который включает мембрану Durapore 0,22 мкм (PVDF) и предлагает преимущество небольшой эффективной площади (EFA), требующей более низких скоростей рециркуляции корма, чем связанные с наименьшими стандартными устройствами. Это операционное преимущество заключается в более простых операциях при проведении небольших лабораторных экспериментов с гибкостью, позволяющей удовлетворить недавний растущий спрос на осветление потоков сырья с постоянно увеличивающимся титром клеток. Эксперимент был проведен на 4 л образца *Pichia pastoris* ферментационный бульон, содержащий ИП. Исследование оптимизации (исследование критического потока пермеата - CPF) проводилось в режиме полной рециркуляции, чтобы установить начальные гидравлические условия для следующих фаз концентрации и диафильтрации. Первоначально мы определили значение потока пермеата, которое дестабилизирует систему TFF (критический поток пермеата), когда трансмембранное давление устройства (TMP) начинает быстро увеличиваться, достигая практического значения, равного 1,5–2 раза или более исходный TMP [[17](#)]. Исследование проводилось при трех параметрах поперечного потока: 4,5 л / мин, 3 л / мин и 1,5 л / мин, в результате чего критические потоки пермеата составили 37 лм / м² / ч, 28 лм / ч и 19 лм / ч соответственно ([рис. 1B](#)). Концентрацию и диафильтрацию затем проводили при средней скорости извлечения пермеата 26,3 лм / ч и 25,9 лм / ч соответственно, что сопоставимо примерно с 70% критического потока пермеата для работы со стабильными TMP ([рис. 1C](#) и [1D](#)). Концентрацию останавливали при коэффициенте объемной концентрации (VCF), равном 2,7X, так как на этом этапе TMP достигал 1 бар, и необходимо было избежать потенциального засорения модуля Prostack[™]. Разъяснение было успешным с хорошей визуальной четкостью пермеата (мутность 46 NTU против исходного > 1000). Объем пермеата составлял 2,5 л и содержал около 80% общего IP, как определено аналитической ОФ-ВЭЖХ. Это близко к теоретическому значению 87%, так как в 4 л культурального бульона 1,13 л соответствует объему клеток и всего 2,87 л супернатанту.

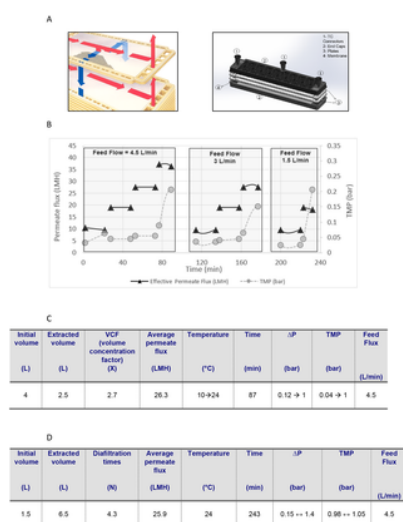


Рисунок 1.

(A) Левая панель: блок-схема для коммерческих устройств Prostack[™] (красная линия для ретентата подачи и синяя линия для пермеата). Правая панель: изображение в разобранном виде небольшого прототипа Prostack[™] (2 стак-0,063 м²). (B) Исследование критического потока пермеата (CPF) с мелкомасштабной прототипной системой фильтрации тангенциального потока Prostack[™] проводилось при трех настройках поперечного потока: 4,5 л / мин, 3 л / мин и 1,5 л / мин, с получением критических потоков пермеата соответственно 37 LMH (л / м² / ч), 28 LMH и 19 LMH. (C) Стадия концентрации процедуры разъяснения TFF с предоставлением критических данных. (D) Стадия диафильтрации процедуры осветления TFF с предоставленными критическими параметрами.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207.g001>

Концентрированный сбор (1,5 л) затем подвергали диафильтрации водой марки Milli-Q для завершения восстановления IP. Объем диафильтрации составлял 6,5 л и содержал около 20% IP, как определено аналитической ОФ-ВЭЖХ. Таким образом, проведенный метод осветления показал полное восстановление предшественника инсулина (из культурального

бульона 4 л) в общем объеме 9 л.

В целом, значительного снижения потока во время концентрации не наблюдалось, поток пермеата во время диафильтрации был стабильным, изменение TMP оставалось постоянным во времени от цикла диафильтрации к циклу, поддерживая постоянные условия, предоставляя косвенные доказательства отсутствия разрушения клеток или повреждения при сдвиге во время пробега. Действительно, аналитическая ОФ-ВЭЖХ не показала дополнительных пиков, обнаруженных после TFF, по сравнению с образцом до TFF (S2, фиг. Панели А, В и С). Поскольку образец имел чистый поток, его непосредственно загружали в хроматографическую колонку без какой-либо дополнительной стадии осветления. Эти результаты позволяют предположить, что использование устройства Prosta[™] с мембраной 0,22 мкм для фильтрации в тангенциальном потоке является многообещающим методом для очистки бульонов для культивирования биологических процессов высокой плотности.

IP очистка и концентрация

При оптимизации последующего процесса мы стремились повысить эффективность этапа захвата для IP. В дополнение к силе связывания было изучено элюирующее поведение IP, чтобы получить высокий титр IP, который можно было бы использовать непосредственно в реакции транспептидации, без необходимости дальнейшей концентрации или лиофилизации.

Материал, извлеченный с помощью TFF, загружали непосредственно в две разные катионообменные смолы для очистки, Sepharose SP Fast Flow и Toyopearl GigaCap S-650 M. Toyopearl GigaCap S-650 M продемонстрировал более высокую нагрузочную способность для IP (110 г / л⁻¹) вдоль с IP - связывания при относительно высокой проводимостью (15 мСм см⁻¹) по сравнению с сефарозы SP матрицы Fast Flow (36 г л⁻¹ емкости нагрузки на проводимость 8 мСм см⁻¹). Мы оптимизировали состав буфера для элюции, чтобы он был похож на смесь воды и органических растворителей, обычно используемых при транспептидации, и достигал степени очистки более 95% (таблица 1). ИП элюировали в 20 ммоль л⁻¹ NaOAc, pH 4,0, EtOH 50%, NaCl 0,5 моль л⁻¹ буфера с концентрацией 80 г л⁻¹ из Toyopearl GigaCap S-650 M (фиг. 2A , подвижная фаза C - пик 3 и фиг. 2B) и при 25 г. л⁻¹ из смолы Sepharose SP Fast Flow. Анализ 3 пиков, выходящих из колонки Toyopearl GigaCap S-650M (фиг. 2A), слева направо, выполняли с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ и показывают, что IP присутствует только в пике 3 (S2, фиг. D - G). Хранение IP в элюирующем буфере при + 4 ° C не ухудшало качество IP, как было определено с помощью ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии, даже через 6 месяцев (данные не показаны).

Steps	Insulin species	Molecular Mass (Da) ^a	mg ^a	Recovery ^b (%)	Purity (%)
Culture supernatant	Insulin precursor	7043.04	2000	0.307	100
Cation exchange	Insulin precursor	7043.04	2000	0.303	99
Transmembrane	Insulin ester	5819.42	1075	0.386	75
Reversed-phase Crystallization	Human insulin	5819.42	1040	0.209	98
Deprotection	Human insulin	5807.58	1040	0.176	95
Reversed-phase	Human insulin	5807.58	1040	0.182	91

IP was recovered from the culture supernatant by TFF. Cation exchange chromatography was performed on Toyopearl GigaCap S-650 M resin and reversed-phase chromatography on C18/ODS 100Å µm resin. Molecular mass of insulin precursor, insulin intermediates and human insulin is the experimental average mass that corresponds to the calculated average for each specimen.

^a Recovery and purity was determined by RP-HPLC. Recovery was calculated from the protein amount determined in HPLC.

^b Molecular mass of insulin species was determined by mass spectrometry. n.d., not determined.

doi:10.1371/journal.pone.0167207.t001

Таблица 1. Обзор процесса производства и очистки инсулина из ферментационной культуры *Pichia pastoris* .
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207.t001>

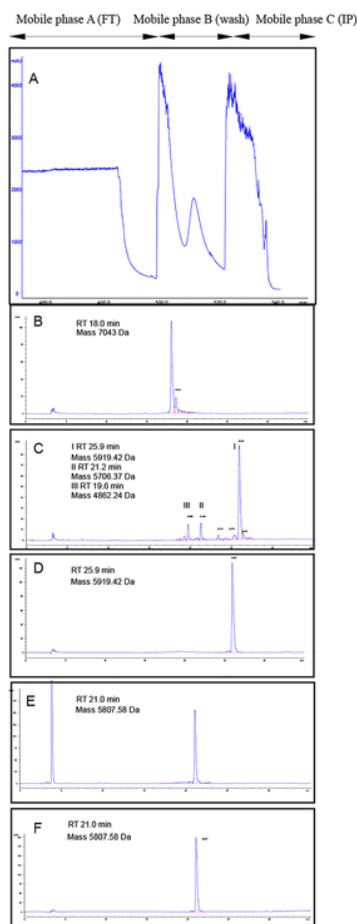


Рис 2.

(A) Toyopearl Giga cap S-650 M катионообменная хроматография IP. IP элюировали из колонки с подвижной фазой C: 20 ммоль L^{-1} NaOAc, pH 4,0, EtOH 50%, NaCl 0,5 моль L^{-1} , RP-HPLC профили видов инсулина на каждом этапе процесса производства человеческого инсулина (панели BF). (B) Профиль ОФ-ВЭЖХ предшественника инсулина после катионообменной хроматографии. IP имеет экспериментальную молекулярную массу 7043 Да (расчетная средняя масса составляет 7042,04) и время удерживания 18,0 минут. (C) RP-HPLC профиль видов инсулина после реакции транспептидации. Эфир инсулина-H-Thr (tBu) -OtBu элюируется при времени удерживания 25,9 минут (экспериментальная и расчетная средняя масса 5919,42 Да), виды инсулина, расщепленные по B29 без эфира треонина, элюируются при времени удерживания 21,2 минуты (экспериментальная и расчетная средняя масса 5706,37 Да) и виды инсулина, расщепленные в B22, элюируются при времени удерживания 19,6 минуты (экспериментальная и расчетная моноизотопная масса 4862,24 Да). (D) ОФ-ВЭЖХ-профиль инсулинового эфира-H-Thr (tBu) после очистки обращенно-фазовой хроматографией. (E) RP-HPLC профиль реакционной смеси для снятия защиты, где человеческий инсулин имеет время удерживания 21,0 минуты (экспериментальная и расчетная средняя масса 5807,58 Да). (F) Профиль ОФ-ВЭЖХ очищенного человеческого инсулина (после последней обращенно-фазовой хроматографии). Чистота человеческого инсулина составляла не менее 98%. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207.g002>

Поэтому мы предлагаем использовать смолу Toyopearl GigaCap S-650 M в сочетании с описанной стратегией элюирования в качестве новой процедуры для захвата IP при высокой нагрузке с элюцией при высокой концентрации (~ 80 мг / мл) в смеси растворителей, подходящей для транспептидации без промежуточный этап диафильтрации / замены буфера. Полученные результаты предлагают смолу Toyopearl GigaCap S-650 M и новую стратегию элюирования в качестве многообещающего высокоэффективного этапа IP-захвата на катионообменной среде с повышенным выходом.

Преобразование IP в человеческий инсулин

Предшественник инсулина ферментативно превращался в эфир инсулина путем транспептидации [18 - 20] в присутствии трипсина и избытка ацетатной соли трет-бутилового эфира Ot-бутил-L-треонина (H-Thr (tBu) -OtBu). Трипсин обеспечивает расщепление пептида N-концевого спейсера и пептида связывающего линкера Ala-Ala-Lys и реакцию перэтерификации, где сложный эфир треонина добавляют к остатку B-29, как описано ранее [6]. Мы разработали условия элюирования катионообменной хроматографией, чтобы концентрированный IP, элюированный в органическом растворителе, мог быть непосредственно использован для транспептидации. Таким образом, мы пропустили медленную и дорогую стадию лиофилизации, которая также может быть источником несоответствия между партиями. В частности, с помощью смолы Toyopearl GigaCap S-650 M нам удалось получить высокую концентрацию IP (80 г L^{-1}), что позволило дополнительно снизить количество самых дорогих реагентов в реакции транспептидации, а именно трипсина и H-Thr (tBu) -OtBu.AcOH. Выбранная комбинация органического растворителя, температуры, pH и количества треонина и H-Thr (tBu) -OtBu была основана на равновесии между стоимостью и выходом связывающего линкера инсулина, полученного в реакции транспептидирования. Существует три основных вида, образованных во время транспептидации, которые могут быть обнаружены с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ (рис. 2C). Эфир инсулина-Thr (tBu) -OtBu элюировали при RT = 25,9 мин, IP расщепляли на B29 без эфира треонина, элюировали при RT = 21,2 мин и IP, расщепленный на B22, элюировали при RT = 19,6 мин. ИП превращается в сложный эфир инсулина с выходом 75% (таблица 1). Выходы до 90% были

получены при использовании более высоких количеств трипсина и H-Thr (tBu) -OtBu. AcOH с последующим увеличением стоимости процесса. Инсулиновый эфир-Thr (tBu) -OtBu дополнительно очищали с использованием препаративного разделения с обращенной фазой. Мы выбрали смолу PLRP-S 300A на 8 мкм (Agilent Technologies), которая обеспечивает масштабируемость от аналитического разделения до препаративных колонок и объемных сред (рис. 2D, таблица 1). После кристаллизации в присутствии ионов цинка сложный эфир инсулина-Thr (tBu) -OtBu был превращен в человеческий инсулин в реакции снятия защиты (удаление третичной бутильной группы из треонина в положении B30) (фиг. 2E). Наконец, человеческий инсулин очищали препаративной ОФ-ВЭЖХ на среде PLRP-S 300A 8 мкм (Agilent Technologies), как описано в разделе «Материалы и методы». Чистота рекомбинантного человеческого инсулина составляла > 98%, как было определено аналитической ОФ-ВЭЖХ, отвечающая требованиям чистоты Европейской Фармакопеи (рис. 2F). Общий выход этого недавно разработанного простого, инновационного и промышленно приемлемого процесса составил 51% (Таблица 1).

Восстановление избытка H-Thr (tBu) -OtBu из реакции транспептидации

Поскольку реагент H-Thr (tBu) -OtBu, используемый в избытке в реакции транспептидации, является одним из самых дорогостоящих реагентов во всем процессе, мы оценили возможность извлечения не вступившего в реакцию реагента экстракцией из водного органического растворителя. Как описано выше, реакционную смесь для транспептидирования наносили на колонку PLRP-S 300A для проведения препаративной хроматографии с обращенной фазой. Мы собирали поток до первой пиковой фракции белка и продолжали экстракцию жидкость-жидкость (водная / органическая фазы) остаточного H-Thr (tBu) -OtBu. Во-первых, мы провели аналитическую ОФ-ВЭЖХ с образцом и стандартом, чтобы подтвердить присутствие реагента H-Thr (tBu) -OtBu. H-Thr (tBu) -OtBu был обнаружен в собранной фракции с помощью аналитической ОФ-ВЭЖХ при 214 нм с испарительным детектором рассеяния света (рис. 3A). Как описано в материалах и методах, мы использовали смесь этилацетата и диэтилового эфира в присутствии солей для извлечения H-Thr (tBu) -OtBu. Выход выделенного H-Thr (tBu) -OtBu составлял 80%, а чистота составляла 99% (фиг. 3B). Электрораспылительный масс-спектрометрический анализ элюированного пика идентифицировал молекулу с массой 232,2 Да, что соответствует H-Thr (tBu) -OtBu. Извлеченный H-Thr (tBu) -OtBu был протестирован в новой транспептидации предшественника инсулина без различий по сравнению со стандартным H-Thr (tBu) -OtBu (фиг. 3C и 3D). Таким образом, мы разработали простой, дешевый и эффективный способ извлечения H-Thr (tBu) -OtBu из реакционной смеси для транспептидирования, который значительно снижает общую стоимость процесса без влияния на выход.

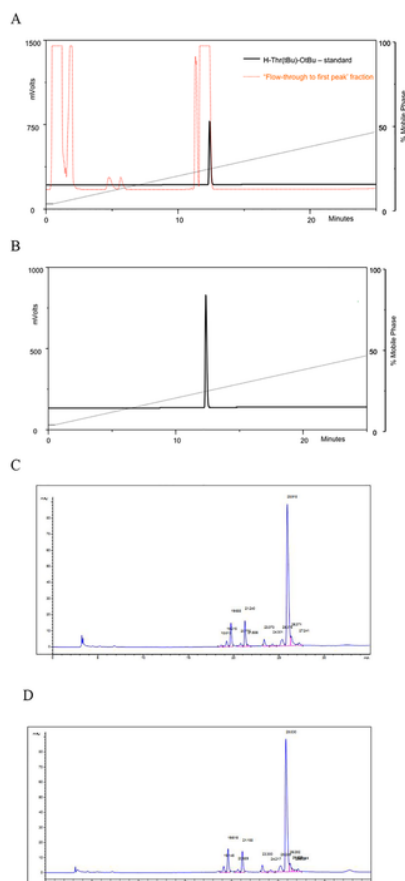


Рис 3.

(А) Следы детектора (детектор испарительного рассеяния света) от RP-HPLC-разделения стандарта H-Thr (tBu) -OtBu и протекания до первой пиковой фракции белка после посттранспептидационной очистки. (В) Следы детектора (детектор испарительного рассеяния света) от отделения ОФ-ВЭЖХ извлеченного H-Thr (tBu) -OtBu от реакции транспептидации IP. Время удерживания H-Thr (tBu) -OtBu составляет 12,36 мин, а чистота составляет 99%. (С) Профиль RP-HPLC видов инсулина после реакции транспептидации с H-Thr (tBu) -OtBu. (D) Профиль ОФ-ВЭЖХ видов инсулина после реакции транспептидации с экстрагированным H-Thr (tBu) -OtBu. Никакой разницы в эффективности реакции транспептидации не наблюдалось.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207.g003>

обсуждение

Ранее мы описали двухэтапную ферментацию *Pichia* с подпиткой, которая приводит к высокому уровню секреторной продукции IP [6]. Концентрация метанола во время фазы индукции была оптимизирована и постоянно контролировалась в течение всего процесса культивирования. В этой рукописи мы разработали ряд промышленно приемлемых технологических этапов производства человеческого инсулина с акцентом на простоту, эффективность и снижение затрат. Мы упростили процедуру и разработали периодическую ферментацию с подпиткой без необходимости постоянного измерения концентрации метанола в процессе, что дало $2,26 \text{ г л}^{-1}$ IP. Что касается восстановления IP, хотя центрифугирование в дисковом стеке, как правило, способно управлять высокими концентрациями клеток в корме, оно часто ограничено в своей способности производить прозрачный продукт. Большое количество мелких частиц не эффективно удаляется центрифугированием, и это может ухудшить последующую хроматографию, создавая потребность во вторичной стадии осветления [21]. Фильтрация в тангенциальном потоке с микрофильтрационными мембранами стала широко распространенным методом очистки биологических процессов от культурального бульона [22]. Устройства TFF с отсеком микрофильтрации обычно предлагают относительно низкие скорости извлечения пермеата при осветлении, и в этом исследовании мы показываем, что Prosta[™] небольшого масштаба Прототип не является исключением, со средним потоком пермеата $26 \text{ л м}^2 / \text{ч}$. Однако, когда такие системы TFF оптимизированы, они представляют надежную технологию для очистки потоков сырья с высоким содержанием твердых веществ. Действительно, Prosta[™] на основе картриджа ПТФ был использован для уточнения различных вакцин, секреторируемых из бактерий и успешно применяется для восстановления пилот - сигнала шкалы [23 - 25] и телец включения очищения от клеточных лизатов бактерий [26].

На основании результатов испытаний, представленных здесь, использование модуля Prosta[™] с $0,84 \text{ м}^2$ -стека с Durapore 0,22 мкм позволит очистить 30 л ферментационного культурального бульона *Pichia pastoris* за четыре часа. Выбор плотных мембран размером 0,22 мкм облегчает удаление липидов и других коллоидов, тем самым устраняя необходимость в дополнительных фильтрационных устройствах. Более того, мы не наблюдали разрушения клеток и повреждения при сдвиге, что указывает на то, что кассета Prosta[™] является хорошей альтернативой для этапа осветления, сокращая процесс осветления до одного шага. As Prosta[™] фильтры были разработаны для промышленного применения, они доступны в различных размерах, облегчая процесс расширения. Кроме того, модульность устройства предлагает значительное преимущество в этом процессе.

Мы впоследствии сосредоточили наше внимание на оптимизации процесса очистки IP, установив метод элюирования водой / этанолом IP из катионообменной хроматографии при высоком титре. Уже было продемонстрировано, что использование органического растворителя может уменьшить или исключить образование димеров и / или гексамеров IP, тем самым обеспечивая подходящую среду для дальнейшей обработки IP [27]. Кроме того, органические растворители, такие как этанол, улучшают каталитические свойства ферментов, вероятно, из-за повышенной стабильности ферментативных элементов вторичной структуры в этих смесях [28 - 31]. Таким образом, мы смогли избежать последующей стадии диафильтрации / замены буфера или лиофильной сушки, обычно необходимой для получения высококонцентрированного IP в смеси воды и органических растворителей, используемых в реакции ферментативной транспептидации. Это особенно выгодно, поскольку лиофилизация (сублимационная сушка) представляет собой медленный и дорогой процесс, вызывающий проблемы с активностью продукта, стабильностью, консистенцией партии и повторяемостью. Обход этапа сублимационной сушки в процессе производства инсулина устраняет эти недостатки. Интересно, что использование Toyopearl GigaCap S-650 M, что интересно, было показано в качестве стадии захвата для моноклональных антител с динамической связывающей способностью $\geq 90 \text{ г / л}$, работающих при высоких линейных скоростях потока до $900 \text{ см}^3 / \text{ч}$ [32 , 33].

Мы оптимизировали все условия реакции транспептидации, включая температуру, время реакции, концентрацию фермента, pH и концентрацию органических растворителей, чтобы улучшить степень конверсии при переваривании и разработать экономически эффективный процесс, обеспечивающий 75% -ную степень извлечения. Кроме того, вторая стадия сушки вымораживанием была пропущена при введении эффективной и недорогой стадии кристаллизации. В конечном счете, дальнейшее снижение затрат на процесс происходит за счет извлечения избытка H-Thr (tBu) -OtBu из реакционной смеси для транспептидации, которую, как мы успешно показали, можно извлечь и повторно использовать.

All the developments described in this manuscript represent a progress towards an improved large scale manufacturing of human insulin with reduced cost and no consequences on the final insulin product quality.

Supporting Information

S1 Fig. Analysis of the culture supernatant from bioreactor during 6 days of methanol induction.

A. RP-HPLC profiles of culture supernatant from bioreactor during 6 days of methanol induction. Insulin precursor peak has a retention time around 18 minutes. B. Amino acid sequence (63 aa) of Insulin precursor. C. Deconvoluted molecular mass spectrum of the whole supernatant at day 6 analysed by mass spectrometry (ESI-MS). Experimental molecular masses detected were 7043.04 Da, 6713.27 Da, 6584.20 Da, 6512.50 and 6384.00 Da corresponding to insulin precursor species with different length of N-terminal extension EEAEAEAEPK. No other species corresponding to IP degradation products were detected <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207.s001> (PDF)

S2 Fig. Analytical RP-HPLC analysis of the sample pre TFF (Panel A), TFF permeate (Panel B) and TFF diafiltrate (Panel C).

Main peak in the chromatograms is Insulin precursor with the retention time of around 18 minutes. Signals of retention time before 5 min correspond to the flow-through. No additional peaks are detected in the sample post TFF in comparison to the sample pre TFF giving an evidence of no cell breakage during TFF. Panels D-G. Analysis of peaks coming out from Toyopearl GigaCap S-650M column, from left to right (Fig 2 panel A) by analytical RPHPLC. Panel D Flow through; Panel E Peak No.1; Panel F Peak No.2; Panel G Peak No.3 Insulin precursor). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167207.s002> (PDF)

Acknowledgments

We thank Herb Lutz from "Merck Sigma Biomanufacturing Science Network" and Mikhail Kozlov from Filtration and Chromatography, R&D Millipore Sigma, USA for reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: SP DO SZ CG SGT NS MB.

Data curation: SP DO SZ CG TS NS MB.

Formal analysis: SP DO SZ CG NS MB.

Funding acquisition: MB.

Investigation: SP DO SZ CG NS.

Methodology: SP DO SZ CG SGT NS MB.

Project administration: DO NS MB.

Resources: DO MB.

Supervision: DO NS MB.

Validation: SP DO SZ CG NS MB.

Visualization: SP DO SZ CG SGT NS MB.

Writing – original draft: SP DO CG NS MB.

Writing – review & editing: SP DO NS MB.

References

- Walsh G (2005) Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. *Applied microbiology and biotechnology* 67: 151–159. <http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-004-1809-x/fulltext.html>. Accessed 27 April 2016. pmid:15580495
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Ahmed MMM, Ramadan HAI, et al. (2014) Cell factories for insulin production. *Microbial cell factories* 13: 141. <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-014-0141-0>. Accessed 30 January 2016. pmid:25270715
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- Meehl MA, Stadheim TA (2014) Biopharmaceutical discovery and production in yeast. *Current opinion in biotechnology* 30: 120–127. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166914001098>. Accessed 21 April 2016. pmid:25014890
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- Møllerup I., Jensen S. W., Larsen P., Schou O. and Snel L (2002) Insulin, Purification. *Encyclopedia of Bioprocess Technology*. Flickinger MC, Drew SW, editors Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.wiley.com/10.1002/0471250589>. Accessed 10 March 2016.
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology* 98: 5301–5317. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743983>. Accessed 1 July 2016. pmid:24743983
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- Gurramkonda C, Polez S, Skoko N, Adnan A, Gäbel T, Chugh D, et al. (2010) Application of simple fed-batch technique to high-level secretory production of insulin precursor using *Pichia pastoris* with subsequent purification and conversion to human insulin. *Microbial Cell Factories* 9: 31. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2882349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. pmid:20462406
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- Wang Y, Liang ZH, Zhang YS, Yao SY, Xu YG, Tang YH, et al. (2001) Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnology and Bioengineering* 73: 74–79. pmid:11255154
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- Routledge SJ, Hewitt CJ, Bora N, Bill RM (2011) Antifoam addition to shake flask cultures of recombinant *Pichia pastoris* increases yield. *Microbial cell factories* 10: 17. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3072307&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 16 November 2015. pmid:21426555
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- Kohlbaun H-J., Thürmer R, Voeltr W (2003) Houben-Weyl Methods in Organic Chemistry, Volume E22a,—Synthesis of Peptides and Peptidomimetics. Goodman M, Felix A, Moroder L, Toniolo C, editors Thieme Stuttgart. 208–211 p. http://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpHWMOCV02/viewerType:toc/root_slug:houben-weyl-methods-in/url_slug:houben-weyl-methods-in/? Accessed 17 November 2015.
- Kjeldsen T, Brandt J, Andersen AS, Egel-Mitani M, Hach M, Pettersson AF, et al. (1996) A removable spacer peptide in an α -factor-leader/insulin precursor fusion protein improves processing and concomitant yield of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. 107–112 p.
[View Article](#) • [Google Scholar](#)
- Xie T, Liu Q, Xie F, Liu H, Zhang Y (2008) Secretory expression of insulin precursor in *pichia pastoris* and simple procedure for producing recombinant human insulin. *Preparative biochemistry & biotechnology* 38: 308–317. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18569877>. Accessed 16 November 2015.
[View Article](#) • [Google Scholar](#)
- Zhu T, Guo M, Tang Z, Zhang M, Zhuang Y, Chu J, et al. (2009) Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. *Journal of applied microbiology* 107: 954–963. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486418>. Accessed 16 November 2015. pmid:19486418
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)

13. Mansur M, Cabello C, Hernández L, País J, Varas L, Valdés J, et al. (2005) Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters* 27: 339–345. <http://link.springer.com/article/10.1007/s10529-005-1007-7>. Accessed 16 November 2015. pmid:15834796
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
14. País-Chanfrau JM, García Y, Licor L, Besada V, Castellanos-Serra L, Cabello CI, et al. (2004) Improving the expression of mini-proinsulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters* 26: 1269–1272. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15483385>. Accessed 16 November 2015. pmid:15483385
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
15. País JM, Varas L, Valdés J, Cabello C, Rodríguez L, Mansur M, et al. (2003) Modeling of mini-proinsulin production in *Pichia pastoris* using the AOX promoter. *Biotechnology letters* 25: 251–255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12882580>. Accessed 16 November 2015. pmid:12882580
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
16. van Reis R, Zydney A (2007) Bioprocess membrane technology. *Journal of Membrane Science* 297: 16–50.
[View Article](#) • [Google Scholar](#)
17. Field RW, Wu D, Howell JA, Gupta BB (1995) Critical flux concept for microfiltration fouling. *Journal of Membrane Science* 100: 259–272. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037673889400265Z>.
[View Article](#) • [Google Scholar](#)
18. Rose K, De Pury H, Offord RE (1983) Rapid preparation of human insulin and insulin analogues in high yield by enzyme-assisted semi-synthesis. *The Biochemical journal* 211: 671–676. pmid:6349613
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
19. Markussen J, Damgaard U, Diers I, Fiil N, Hansen M, Larsen Pet al. (1987) Biosynthesis of human insulin in yeast via single-chain precursors. *Peptides*. pp. 189–184.
20. Morigara K, Ueno Y, Sakina K (1986) Influence of temperature on the enzymic semisynthesis of human insulin by coupling and transesterification methods. *The Biochemical journal* 240: 803–810. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1147490&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 16 November 2015. pmid:3103612
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
21. Kempken R, Preissmann A, Berthold W (1995) Assessment of a disc stack centrifuge for use in mammalian cell separation. *Biotechnology and bioengineering* 46: 132–138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18623272>. Accessed 16 November 2015. pmid:18623272
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
22. Yavorsky D, Blanck R, Lambat C, Brunkow R (2003) The clarification of bioreactor cell cultures for biopharmaceuticals. *Pharmaceutical Technology*. <https://www.highbeam.com/doc/1P3-318787391.html>. Accessed 16 November 2015.
[View Article](#) • [Google Scholar](#)
23. Sundaran B, Palaniappan C, Rao YUB, Boopathy R, Rao Bhau LN (2002) Tangential flow filtration technology applicable to large scale recovery of diphtheria toxin. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94: 93–98. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172302801268>. Accessed 18 April 2016. pmid:16233277
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
24. Muniandi C; M KRS R (2013) Large scale recovery of tetanus toxin and toxoid from fermentation broth by microporous tangential flow filtration. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research* 4: 28–37. <http://www.academicjournals.org/journal/IJBMBR/article-abstract/DDD94BA2500>. Accessed 26 April 2016.
[View Article](#) • [Google Scholar](#)
25. Besnard L, Fabre V, Fettig M, Gousseinov E, Kawakami Y, Laroudie N, et al. (2016) Clarification of vaccines: An overview of filter based technology trends and best practices. *Biotechnology advances* 34: 1–13. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975015300550>. Accessed 18 April 2016. pmid:26657051
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
26. Cherish Babu P V, Srinivas VK, Krishna Mohan V, Krishna E (2008) Renaturation, purification and characterization of streptokinase expressed as inclusion body in recombinant *E. coli*. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 861: 218–226. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023207007040>. Accessed 18 April 2016. pmid:17981102
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
27. Liu H, Zhou X, Xie F, You J, Zhang Y (2013) An efficient trypsin digestion strategy for improving desB30 productivity from recombinant human insulin precursor fusion protein. *Process Biochemistry* 48: 965–971. http://www.researchgate.net/publication/270982661_An_efficient_trypsin_digestion_strategy_for_improving_desB30_productivity_from_recombinant_human_insulin. Accessed 16 November 2015.
[View Article](#) • [Google Scholar](#)
28. Castro GR (1999) Enzymatic activities of proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 689–694. http://www.researchgate.net/publication/229062481_Enzymatic_activities_of_proteases_dissolved_in_organic_solvents. Accessed 16 November 2015.
[View Article](#) • [Google Scholar](#)
29. Kilbanov AM (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409: 241–246. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11196652>. Accessed 10 August 2015. pmid:11196652

[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)

30. Simon LM, Kotormán M, Garab G, Laczkó I (2001) Structure and activity of alpha-chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. Biochemical and biophysical research communications 280: 1367–1371. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X01942822>. Accessed 16 November 2015. pmid:11162681
[View Article](#) • [PubMed/NCBI](#) • [Google Scholar](#)
31. Rich JO, Dordick JS (2001) Imprinting Enzymes for Use in Organic Media. In: Vulfson E. N., Halling P. J. and H HL, editor. Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Vol. 15. pp. 13–17.
32. Разработка этапа захвата MAb с высокой пропускной способностью на основе катионообменной хроматографии - BioProcess International/BioProcess International (nd). <http://www.bioprocessintl.com/downstream-processing/chromatography/development-of-a-high-capacity-mab-capture-step-based-on-cation-exchange-chromatography-183798/#CIT0021> . Доступ 27 апреля 2016 г.
33. Урманн М., Граальфс Х., Джоэнк М., Якоб Л.Р., Фрех С. (2010) Катионообменная хроматография моноклональных антител: характеристика новой стационарной фазы, предназначенной для очистки в промышленных масштабах. mAbs 2: 395–404. PMID: 20559022
[Посмотреть статью](#) • [PubMed / NCBJ](#) • [Google ученый](#)



(43) Дата международной публикации
03 июня 2010 (03.06.2010)

PCT

- (51) Международная патентная классификация :
C12N 15/17 (2006.01) **C12N 15/70 (2006.01)**
C12N 1/21 (2006.01) **C12R 1/19 (2006.0X)**
- (21) Номер международной заявки : **PCT/UA2009/000025**
- (22) Дата международной подачи :
16 июня 2009 (16.06.2009)
- (25) Язык подачи : Русский
- (26) Язык публикации : Русский
- (30) Данные о приоритете :
а 2008 13678 26 ноября 2008 (26.1 1.2008) UA
- (71) Заявитель (для всех указанных государств , кроме
US): ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ **"МАКО" (LIMITED LI-
ABILITY COMPANY «МАКО»)** [UAAJA]; бул.
Дружбы народов , 8-9, Киев , 01103, K iev (UA).
- (72) Изобретатели ; и
- (75) Изобретатели /Заявители (только для US):
**ЛАЗАРЕВ , Алексей Павлович (LAZARYEV, A lek-
sey Pavlovich)** [UAAJA]; ул. Порики , 15-75, Киев ,
04208, K iev (UA). **ЛУЦИВ , Владимир Романович**

(LUCIV, **Vladimir Romano vich**) [UAAJA]; ул. Драгоманова , 44-A-13, Киев , 02068, K i e v (UA). КОСТЕЦКИЙ , Игорь Евгениевич (K O STET SK II, **Igor Evgenievich**) [UAAJA]; ул. Жукова , 45-47, Киев , 02166, K i e v (UA). ЛИСОВСКИЙ , Игорь Леонидович (LISOVSKYY, **Igor Leon idovich**) [UAAJA]; ул. Святошинская , 26-3, Вишневое , Киевская обл., 08132, Vishnevoe (UA). Лесик , Игорь Павлович (LESIK, **Igor Pavlovich**) [UAAJA]; ул. Мира , 2-55, Обухов , Киевская обл., 08700, Obukhov (UA).

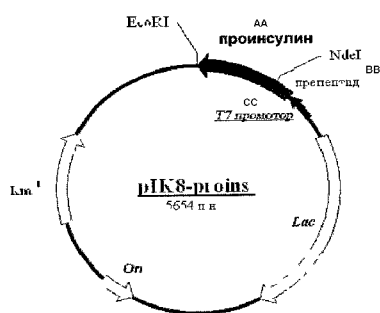
- (74) Агент : НЕСТЕРУК , Виталий Витальевич
(NESTERUK, Vitaliy Vitalievich); а/я 92, Киев , 03087,
Kiev (UA).

- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,

/продолжение на следующей странице /

- (54) Title: METHOD FOR PRODUCING HUMAN RECOMBINANT INSULIN

- (54) Название изобретения : СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА**



```

1      ATGCGCAGCAGCGCATCATCAATCATCATCAGCAGCGGGCCTGGTGCCTGGCGCGGACGCA
61      M G S S I H H H H H H S S G L V P R G S H
21     ATGCGCTTGTGAGACACACCTGTTGGGGGCTTCAACCTTGGGGAAGCTCTCTACTAGTG
121     M G G F F V N Q H L C C S H L V E A L Y L V L V
41     TCGCGGACACGAGGCTTCTCTACACCCAGACGCCCGCGGGAGCAGAGACCTCGAG
141     C G E R G G F T Y T P K T R R E A C D L Q
61     GTGGCGGCTGAGCTGGCGGGGGGCGGCGCTGGTGTCAGGACGCTCAGCGCCTTGGCCG
161     V G Q V L E G G G G G G G G G C A G S L Q P A L
81     GAGGGCTCGTCGAGAGCTGCGATCTGTGGACATCTCTTACACGATCATCTCTCTC
201     E G S L Q K R G I V E Q C C T S I C S L
301     TACCGCTGAGACAGCTCTGCAGCATAG
101     Y G L E N Y C N

```

Рис 1.

AA proinsulin
BB prepeptide
CC promoter

(57) Abstract: The invention relates to biotechnology and can be used for producing human recombinant insulin for preparing medicinal agents for the treatment of pancreatic diabetes. A variety of recombinant plasmid DNAs which contain an artificial gene and encode the human insulin precursor is proposed. The biosynthesis of a hybrid polypeptide is induced using isopropyl-thiogalactopyranoside so that the post-induction level of the hybrid polypeptide is equal to or greater than 25% of the total cellular protein. According to the claimed procedure, human insulin is produced by cultivating a producer strain containing one of the recombinant plasmids, isolating inclusion bodies, solubilizing and renaturing the fusion protein, and enzymatically degrading and chromatographically purifying said protein. The invention simplifies the process for producing human recombinant insulin and increases the yield thereof.

(57) Реферат: Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для получения рекомбинантного инсулина человека, используемого для приготовления лекарственных препаратов при лечении сахарного диабета. Предложен ряд рекомбинантных плазмидных ДНК,

человека получают путем культивирования штамма -продуцента , содержащего одну из рекомбинантных плазмид , выделения телец включения , солюбилизации и ренатурации гибридного белка ,его ферментативного расщепления и хроматографической очистки . Изобретение упрощает технологический процесс получения рекомбинантного инсулина человека и увеличивает выход рекомбинантного инсулина человека .

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): **ARP**, (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), **OAPI** (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована :

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

— *т* сведениями *о* отношении *к* депонированного биологического материала, представленными в соответствии с правилом 13b5 отдельно от описи (правила 13b5(4)(i) и 48.2(a)(viii))

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Изобретение относится к биотехнологии, генной инженерии и медицине, и может быть использованным в производстве лекарственных препаратов, в частности препаратов для лечения сахарного диабета.

Инсулин - гормональный белок, который состоит из кислой А-цепи, которая содержит 21 аминокислотный остаток, и щелочной В-цепи из 30 аминокислот [1], эти цепи связаны тремя дисульфидами: одна связь находится внутри А-цепи (A^6-A^{11}) и две межцепочечных связи (A^7-B^7 и $A^{20}-B^{19}$). В то время как отдельные А- и В-цепи инсулина могут быть успешно соединены *in vitro* [2], в естественных условиях обычно синтезируется единая полипептидная цепь (препроинсулин). Она содержит сигнальный пептид в аминокислотном терминальном участке В-цепи и С-пептид между А- и В-цепями. После отщепления N-концевой сигнальной последовательности на эндоплазматическом ретикулуме полученный полипептид упаковывается в секреторные гранулы в виде проинсулина [3]. Обработанный далее определенным набором протеаз, проинсулин затем превращается в инсулин и секретируется в кровоток для регуляции уровня сахара.

В промышленном масштабе, инсулин человека может быть произведен методом транспептидации, то есть замены аланинового остатка в 30-ом положении В-цепи инсулина свиньи на треонин [4]. Поскольку производство инсулина человека из инсулина свиньи является ограниченным из-за высокой

себестоимости , научные исследования были направлены главным образом на разработку и внедрение методов генной инженерии для производства инсулина человека . На сегодня используются три основных метода для производства инсулина с применением микроорганизмов . Два из них включают использование бактерии *Escherichia coli*, при этом предшественник инсулина синтезируется как часть большого полипептида в виде телец включения или секретируется в периплазматическое пространство [5]. Третий метод основан на использовании дрожжей , где предшественник инсулина также может выделяться в окружающую среду [6] или формирует нерастворимые тельца включения [7].

Процесс получения инсулина человека с помощью методов генной инженерии включает в себя следующие стадии : синтез проинсулина в *Escherichia coli* в форме слитого полипептида , рефолдинг слитого полипептида с целью формирования правильных дисульфидных связей ; протеолитическое расщепление рефолдированного полипептида трипсином и карбоксипептидазой В ; очистка полученного продукта и получение инсулина . Разновидность данного подхода использует также сульфонирование слитого полипептида и его расщепление цианбромидом с целью получения проинсулина как промежуточного продукта производства инсулина [8]. Также , генетические манипуляции дают возможность производства слитого полипептида с разными аминокислотными последовательностями в проинсулине и/или С-пептиде рекомбинантного полипептида . Эти манипуляции направлены на увеличение выхода правильно рефолдированного проинсулина (препроинсулина). Однако , выход рефолдированного проинсулина , который имеет правильные дисульфидные связи , уменьшается с ростом концентрации проинсулина в буфере . Это происходит из-за неправильного фолдинга и роста процесса полимеризации . Таким образом , рефолдинг является критической стадией в процессе производства инсулина . Также , очистка инсулина на следующих стадиях производства часто является достаточно трудоемкой и дорогой . Учитывая

все это, разработка новых подходов производства инсулина человека направлена не только на улучшение качества готовой продукции, но также и на сбережение ресурсов и уменьшение цены продукции для потребителей.

Известный способ получения рекомбинантного инсулина человека включает в себя конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК, которая кодирует проинсулин [9], получение и культивирование штамма *Escherichia coli* - продуцента гибридного полипептида, выделение и дезинтеграцию клеток, выделение гибридного полипептида, его ферментативное расщепление с последующей очисткой и получением целевого продукта.

Однако, в этом способе используется только штамм *Escherichia coli* BL21/pLK8-proins, который характеризуется наличием плазмидной ДНК pLK8-proins, что ограничивает круг комбинаций хозяин /вектор экспрессии.

Кроме того, в этом способе перед ферментативным расщеплением гибридного полипептида проводят его обработку цитраконовым ангидридом, что предполагает дополнительную стадию очистки и количественно ограничивает выход целевого продукта.

В основу изобретения поставлена задача создания способа получения рекомбинантного инсулина человека, который гарантирует увеличение выхода гибридного полипептида и получение конечного продукта высокого качества.

Важным результатом способа является повышение эффективности получения целевого продукта, в определенной степени сокращение технологического процесса, количественное повышение выхода целевого продукта, повышения качества за счет расширения круга векторов экспрессии, оптимизации аминокислотного состава препептида, усовершенствование технологии разрушения бактериальных клеток и отмывки телец включения, а также оптимизации процесса рефолдинга и усовершенствование технологии концентрации и очистки.

Существует тесная причинно -следственная связь между всей совокупностью существенных признаков и техническим результатом , который достигается .

Данное изобретение касается улучшенного способа получения рекомбинатного инсулина человека путем культивирования прокариотических клеток , трансформированных последовательностями ДНК , которая кодирует эти полипептиды . Рекомбинатный гибридный полипептид , который включает в себя лидерную последовательность присоединенную к проинсулину , синтезируется в клетках *Escherichia coli*. Инсулин человека образуется в результате обработки правильно рефолдированного гибридного полипептида трипсином и карбоксипептидазой В с последующей очисткой . Согласно этому изобретению рекомбинатный инсулин человека может быть получен с высокой воспроизводимостью , в то время как стадии выделения и очистки значительно усовершенствованы .

Разработка новых конструкций плазмидных ДНК позволяет расширить спектр используемых штаммов микроорганизмов и оптимизировать аминокислотный состав препептида .

Предложенная в способе технология концентрирования полипептида после рефолдинга путем поверхностно -адсорбционной хроматографии с использованием сорбента , который имеет высокие динамические и емкостные характеристики , позволяет значительно улучшить результативность этой стадии .

Кроме того , в способе отсутствует подготовка полипептида к ферментативной конверсии (цитраконилирование). Предложена эффективная схема трипсинолиза при повышенных значениях pH , при которых минимизировано образование дез-треонина , позволяет количественно увеличить выход целевого продукта и исключить дополнительную стадию очистки от цитраконового ангидрида .

Оптимизированная схема очистки инсулина с использованием ионообменной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии

позволяет получить высокоочищенный препарат инсулина с чистотой 98-99%.

Таким образом, поставленная задача решается за счет создания новых конструкций, усовершенствования технологии разрушения клеток и отмывки телец включения, оптимизации рефолдинга и концентрирования полипептида после рефолдинга с использованием поверхностно-адсорбционной хроматографии, а также за счет отсутствия агрегирования и осуществления трипсинолиза при повышенных значениях pH с целью уменьшения дез-треонина.

Так, в дополнение к ранее заявленной плазмидной ДНК (pIK8-proins) в данном способе заявляются другие плазмиды, которые имеют некоторые преимущества:

- укороченный С-пептид (плазмиды pMUT12, pISYN2, pCIM 61, pDIM07). В результате этой модификации увеличивается выход целевого продукта. При использовании плазмиды pIK8-proins инсулин составляет 47% от гибридного полипептида; при использовании pMUT12, pISYN2 инсулин составляет 68% от гибридного полипептида; при использовании pCIM 61, pDDV107 - 82%.

- новые плазмиды кодируют разные гибридные полипептиды, которые отличаются последовательностью препептида. Аминокислотный состав препептида подобран таким образом, что он изменяет заряд (и соответственно изоэлектрическую точку) гибридного полипептида, что позволяет использовать разные подходы к очистке белка.

ДНК, которая кодирует гибридный полипептид (плазида pISYN2), получена путем химического синтеза с учетом распределения кодонов в *Escherichia coli*, что повышает эффективность синтеза гибридного полипептида приблизительно на 40% в сравнении с аналогичной кДНК с оригинальными кодонами.

В способе предложена высокоэффективная технология пресс-разрушения бактериальных клеток (эффективность разрушения составляет

свыше 99%), в то время как эффективность разрушения с помощью ультразвука составляет приблизительно 40-50%. Кроме того, способ значительно дешевле, имеет более высокую производительность и позволяет получить на выходе более чистый препарат (тельца включения).

Подготовка гибридного полипептида для рефолдинга не содержит стадии сульфитолиза (эта стадия уменьшает выход целевого продукта и повышает его себестоимость). Заявленная схема прямого рефолдинга восстановленного полипептида проста в выполнении и позволяет проводить рефолдинг при концентрациях полипептида 0,5-1,0 мг/мл, в то время, как восстановление сульфитированного полипептида проводят при концентрации полипептида меньше 0,1 мг/мл. Таким образом, существенно уменьшаются объемы реакционной смеси, необходимые для ренатурации гибридного полипептида.

Суть изобретения объясняют графические изображения:

Рис. 1 - схематическая диаграмма плазмидной ДНК pIK8-proms, показаны также нуклеотидная и аминокислотная последовательности предшественника инсулина.

Рис. 2 - схематическая диаграмма плазмидной ДНК pMUT12, показаны также нуклеотидная и аминокислотная последовательности предшественника инсулина.

Рис. 3 - схематическая диаграмма плазмидной ДНК pISYN2, показаны также нуклеотидная и аминокислотная последовательности предшественника инсулина.

Рис. 4 - схематическая диаграмма плазмидной ДНК pCIM6I, показаны также нуклеотидная и аминокислотная последовательности предшественника инсулина.

Рис. 5 - схематическая диаграмма плазмидной ДНК pDIM07, показаны также нуклеотидная и аминокислотная последовательности предшественника инсулина.

Рис. 6 - отображает первичную структуру инсулина человека .

Способ заключается в том , что получают рекомбинантную ДНК , кодирующую предшественник инсулина человека , который экспрессируется в клетках -хозяевах *Escherichia coli* в виде телец включения с последующей очисткой рекомбинантного полипептида и ренатурацией в условиях , которые приводят к правильному формированию дисульфидных связей между остатками цистеина . В дальнейшем рекомбинантный полипептид протеолитически расщепляют и очищают .

Способ получения рекомбинантного инсулина включает следующие стадии :

а) трансформация клеток *Escherichia coli* рекомбинантной ДНК , кодирующей предшественник инсулина с участками распознавания трипсина в последовательности рекомбинантного полипептида ;

б) культивирование трансформированных клеток -хозяев в условиях , которые приводят к экспрессии рекомбинантной ДНК и продукции телец включения ;

в) разрушение клеток и выделение продуктов экспрессии ;

г) растворение рекомбинантного полипептида в присутствии денатурантов и восстанавливающего агента с последующим рефолдингом ;

д) расщепление гибридного полипептида трипсином и карбоксипептидазой В для получения инсулина ;

е) выделение и очистка инсулина .

Суть изобретения заключается в том , что в способе получения рекомбинантного инсулина человека путем конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует проинсулин , получения и культивирования штамма -продуцента гибридного полипептида *Escherichia coli*, выделения и дезинтеграции клеток , выделения гибридного полипептида , его ферментативного расщепления с последующей очисткой и получением целевого продукта , в соответствии с изобретением участок рекомбинантной

плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный полипептид с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , находится в составе экспрессирующих векторов pK8-proins, или pMUT12, или pISYN2, или pCIM61, или pDIM07, или являет собой последовательность ДНК , которая гибридизируется с одной из вышеуказанных ДНК вставок и которые кодируют экспрессию предшественника проинсулина человека , а участок рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный полипептид с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , является частью плазмиды pK8-proins и имеет следующую структуру :

```

i      AT GGGCA GCA GCCATCATCATCATCACACA      GCA GCGGCCT GGT GCCGCGCGGCA GCCAT
1      M  G  S  S  H  H  H  H  H  H  S  S  G  L  V  P  R  G  S  H

61      AT GCGCTTT GT GAACCAACACCT  GT GCGGCTCACACCT  GGT GGAAGCTCTCTACCTA  GT G
21      M  R  F  V  N  Q  H  L  C  G  S  H  L  V  E  A  L  Y  L  V

121     TGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAAGACCCGCCGGGAGGCAGAGGACCTGCAG
41      C  G  E  R  G  F  F  Y  T  P  K  T  R  R  E  A  E  D  L  Q

181     GT GGGGCA GGT GGA GCT GGGCGGGGGCCCT GGT GCA GGCA GCCT GCA GCCCTT  GGCCCT G
61      V  G  Q  V  E  L  G  G  G  P  G  A  G  S  L  Q  P  L  A  L

241     GA GGGGTCCCT  GCA GAA GCGT GGCATT GT GGAACAAT  GCT GTACCA  GCATCT  GCTCCCTC
81      E  G  S  L  Q  K  R  G  I  V  E  Q  C  C  T  S  I  C  S  L

301     TACCA GCTGGAGAACTACT  GCAACTA G
101     Y  Q  L  E  N  Y  C  N  * ,

```

участок рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный полипептид с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , является частью плазмиды pMUT12 и имеет следующую структуру :

```

1      AT GGGCA GCA GCCATCATCATCATCACACA      GCA GCGGCCT GGT GCCGCGCGGCA GCCAT
1      M  G  S  S  H  H  H  H  H  H  S  S  G  L  V  P  R  G  S  H

```

```

61      ATGCGCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTG
21      M R F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V

121     T GCGGGGAAC GA GGCTTCTTCTACACACCCAA      GACCAA GC GT GGCATT GT GGAACAAT GC
41      C G E R G F F Y T P K T K R G I V E Q C

181     T GTACCA GCATCT GCTCCCTCTACCA      GCT GGA GA ACTACT GCAACTA G
61      C T S I C S L Y Q L E N Y C N * ,

```

участок рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный полипептид с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , является частью плазмиды pISYN2 и имеет следующую структуру :

```

1      A T GGGCA GCA GCCATCATCATCATCATCACA      GCA GCGGCCT GGT GCCGCGCGGCA GCCAT
1      M G S S H H H H H S S G L V P R G S H

61     A T GCGCTTT GT GAACCA GCATCT GT GT GGCA GCCACCT GGT GGAAGCGCTCTATTTA GT G
21     M R F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V

121     T GCGGC GA GC GT GGCTTCTTTTATACCCC      GAAAACCAAAC GT GGCATT GT GGAACA GT GT
41     C G E R G F F Y T P K T K R G I V E Q C

181     T GCACCA GTATTT GTA GCCT GTATCA GCT GGAAAATTACT GCAACTAA
61     C T S I C S L Y Q L E N Y C N * ,

```

участок рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный полипептид с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , является частью плазмиды pCIM61 и имеет следующую структуру :

```

1      A T GCGAAA GA AGCGGAAGAAGAA GCGTTTT GT GAACCA GCATCT GT GT GGCA GCCACCT G
1      M R K K R K K K R F V N Q H L C G S H L

61     GT GGAA GCGCT GTATTTA GT GT GCGGC GA GC GT GGCTTCTTTTATACCCC      GAAAACCAAA
21     V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K T K

121     CGT GGCATT GT GGAACA GT GT TGCACCA GTATTT GTA GCCT GTATCA GCT GGAAAATTAC
41     R G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y

181     TGCAACTAA
61     C N * ;

```

участок рекомбинантной плазмидной ДНК, которая кодирует гибридный

полипептид с аминокислотной последовательностью проинсулина человека, является частью плазмиды pDIM07 и имеет следующую структуру :

1 ATGGATGAGACGAGGATGAGGACGCTTTGTGAAACCGCCTCTGTGTGGCAGCCACCTG
1 M D E D E D E A R F V N Q H L C G S H L

61 GTGGAAAGCGCTGATTTA GTGTGGGCGAGCGTGGCTTCTTTATACCCC GAAACCAAA
21 V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K T K

121 CGGGCATTTGTGGAAACAGTGTGTGACra GTATTTGTAGCCTGTATCAGCTGGAAAATTAC
41 R G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y

181 TGCAACTDA
61 C N * .

Создание штаммов *Escherichia coli* осуществляют с использованием плазмидных векторов, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую один или несколько рекомбинантных полипептидов, при этом транскрипция указанной нуклеотидной последовательности, которая кодирует один или несколько полипептидов, находится под контролем индуцируемой системы экспрессии, затем осуществляют культивирование трансформированных штаммов *Escherichia coli* и индуцирование системы экспрессии для синтеза рекомбинантного полипептида или полипептидов в клетках *Escherichia coli*, и выделение рекомбинантного полипептида или продуцируемых полипептидов.

Выделение синтезированного продукта осуществляют путем разрушения бактериальной клетки или фрагментов клеток, сепарации с одновременным отмыванием осадка неионным детергентом, а последующая его конверсия включает растворение в буферном растворе с денатурирующим реагентом, обработку гибридного полипептида восстанавливающим агентом, рефолдинг гибридного полипептида и его концентрацию методом абсорбционной хроматографии или ультрафильтрации.

Ферментативное расщепление гибридного полипептида осуществляют трипсином и карбоксипептидазой. В одновременно или последовательно с использованием преимущественно очистки продуктов ферментативной конверсии с помощью ионообменной хроматографии и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Способ осуществляют как описано далее.

В заявленной системе экспрессии рекомбинантной ДНК может использоваться целый ряд комбинаций хозяин /вектор экспрессии, что обеспечивает оптимальную продукцию инсулина человека. Например, векторы экспрессии могут содержать промоторный участок, сигнал начала трансляции, кДНК проинсулина человека с или без модификаций, введенных в последовательность С-пептида, и оптимизированного препептида, отделенного от проинсулина сайтом распознавания трипсина. Оптимальной для данного изобретения является рекомбинантная плазмидная ДНК, которая содержит интегрированную ДНК, которая описана выше. Выбранные плазмиды данного изобретения включают рЮ-proins, рMUT12, рISYN2 и их производные.

Также в данном изобретении описан процесс получения рекомбинантной молекулы ДНК. Этот процесс включает в себя клонирование в соответствующий вектор ДНК-вставки, которая кодирует полноразмерную форму проинсулина, а также аналогов, гомологов и предшественников полипептида, которые превращаются в инсулин.

Преимущественно указана последовательность ДНК клонированная в правильном положении и в нужной рамке считывания с последовательностью контроля экспрессии.

В последующем, согласно с данным изобретением, клетки-продуценты трансформируются одной из рекомбинантных молекул ДНК, которые способны к экспрессии полноразмерной, модифицированной или редуцированной формы предшественников инсулина человека или

полипептида , который имеет подобную иммунологическую или биологическую активность к инсулину .

В качестве экспрессирующих клеток -хозяев используют известные штаммы прокариот , которые включают штаммы *Escherichia coli*, такие как *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* X1776, *Escherichia coli* X2282, *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* JM1 03, *Escherichia coli* BL21, но не только их .

Для производства полипептида предшественника инсулина бактериальные клетки -продуценты культивируются в жидкой питательной среде в условиях , оптимальных для клеток -хозяев и вектора экспрессии . Преимущественно , клетки -продуценты культивируются в бактериальном ферментере для широкомасштабного производства , однако допускаются другие удобные методы культивирования (например , в колбе на шейкере , когда необходимо культивирование в объемах менее 1 литра). Точные условия роста , выбор времени и добавки среды , pH культуральной среды , температура и уровень растворенного кислорода , добавление индуцирующего агента (при необходимости) подбираются согласно каждого штамма -продуцента и экспрессирующего конструкта .

После того , как бактериальные клетки -продуценты были выращены до желаемой плотности и была проведена необходимая индукция экспрессии , клетки собирают . Сбор обычно выполняется центрифугированием среды культивирования , хотя может быть использована любая другая удобная техника типа ультрафильтрации . На этом этапе собранные бактериальные клетки -продуценты могут быть сразу использованы в соответствии с изобретением , или могут быть заморожены для переработки позже .

В таком случае бактериальные клетки разрушают путем лизиса - чтобы высвободить тельца включения , которые содержат полипептид - предшественник инсулина . Для этого бактериальные клетки ресуспендируют в буферном растворе при pH от 6,0 до 9,0 и ионной силе в диапазоне от 0,01M до 2M. Любая подходящая соль , включая NaCl, может использоваться

для поддержки соответствующего уровня ионной силы. Преимущественно, лизис клеток проводят в условиях, при которых клеточные фрагменты достаточно разрушены и не накапливаются в осадке при низко скоростном центрифугировании. Лизис клеток проводят общеупотребляемыми методами, такими как механические методы (в частности, циклическое замораживание /оттаивание; использование прибора Microfluidizer или French press; или ультразвукового генератора) или энзиматичные методы (такие как обработка лизоцимом). В целом, рекомендуется проводить лизис клеток при пониженной температуре (то есть, меньше чем 20 градусов C).

Тельца включения отделяют от фрагментов клеток, используя любой удобный метод (например, центрифугирование), потом отмывают, если необходимо. Тельца включения обычно промывают ресуспенсируя их в буфере с добавлением детергента (например, Тритон X-100), потом опять собирают тельца включения. Отмытые тельца включения потом растворяют в солюбилизационном буфере, который содержит высокую концентрацию хаотропного агента (например, мочевины или гуанидин гидрохлорид) и восстанавливающий реагент при оптимальном значении pH.

Концентрация мочевины в солюбилизационном буфере находится в пределах между 6М и 8М, преимущественно 7М, и концентрация гуанидина гидрохлорида —от 5 до 7М, преимущественно 6М.

pH солюбилизационного буфера варьирует от 7.5 до 11.0, преимущественно от 8.5 до 9.0. Можно использовать любой pH буферный агент (такой как Tris, HEPES, MOPS, tricine и т.п.). pH буферный агент добавляется к солюбилизационному буферу при концентрации, которая обеспечивает эффективную буферную емкость, например, от 10 до приблизительно 100 мМ, преимущественно 20 мМ.

Восстанавливающие реагенты являются составной частью солюбилизационного буфера - для восстановления дисульфидных связей и для поддержания остатков цистеина в восстановленной форме. На практике используются такие восстанавливающие реагенты: бета-меркаптоэтанол,

дитиотреитол и т.п.. Оптимальная концентрация бета-меркаптоэтанола - между 20 и 200ММ, преимущественно между 100 и 150ММ.

Оптимально солюбилизационный буфер содержит дополнительные компоненты типа катионного комплексона подобно EDTA. EDTA добавляется в солюбилизационный буфер в концентрации приблизительно 0,5 до 5 мМ, преимущественно - 1ММ до 2мМ. Кроме того, глицин (или другие аминокислоты) добавляются в буфер для предотвращения разрушения полипептида свободными радикалами. Концентрация глицина варьирует от 5 до 100 мМ, преимущественно от 10 до 20 мМ.

Растворение телец включения в основном проводится за период от шести часов до приблизительно 24 часов, преимущественно в течение 8 часов. Растворение может быть проведено при комнатной температуре или пониженной температуре, обычно от 4 градусов до 24 градусов С, преимущественно при 20 градусах С. После того, как растворение телец включения завершено, раствор восстановленного полипептида осветляется для удаления нерастворимого остатка. Осветление может быть выполнено путем использования высокоскоростного центрифугирования.

Восстановленный предшественник проинсулина затем разбавляется буфером для рефолдинга. Разведение проводится путем добавления раствора телец включения в буфер для рефолдинга или путем одновременной подачи в емкость для рефолдинга буфера и раствора телец включения. Раствор телец включения может быть разведен приблизительно от 10 до 200-кратно, преимущественно 100-кратно буфером для рефолдинга. Конечная концентрация полипептида после растворения может составлять приблизительно от 0.01 мг/мл до 5 мг/мл, преимущественно 1 мг/мл.

Буфер для рефолдинга как правило содержит рН буферный агент, окислительно-восстановительную пару, катионный хелатор, реагенты - предохранители свободно-радикального разрушения полипептида и некоторые другие низкомолекулярные добавки. Процесс рефолдинга проводится при температуре приблизительно от 4 до 24 градусов С,

преимущественно при 10 градусах С. Время инкубации в общем составляет приблизительно от 2 до 20 часов, преимущественно около 6 часов. Главные компоненты буфера для рефолдинга включают глицин в концентрации приблизительно от 0,5 мМ до 20 мМ; EDTA приблизительно от 0,1 мМ к 5 мМ; глицерин - приблизительно от 1 % до 20 %.

По окончании процесса рефолдинга правильно уложенный предшественник инсулина может быть сконцентрирован, потом очищен, и полипептид может быть обработан протеолитическими ферментами, например, трипсином и карбоксипептидазой В для производства готового инсулина. Концентрирование рефолдированного полипептида может проводиться с использованием любой удобной методики, типа ультрафильтрации или хроматографии (например, ионнообменной, гидрофобной или афинной хроматографии) и т.п. Процесс концентрирования, при желании, может также включать процесс замены буфера. Преимущественно концентрирование проводится при пониженной температуре (например, приблизительно 4-10 градусов С).

Протеолитическое расщепление предшественника инсулина проводится или одновременной обработкой трипсином и карбоксипептидазой В или раздельной обработкой этими двумя ферментами. Трипсин используется в концентрации от приблизительно 1:200 до 1:20,000 (ферментхубстрат, весовое соотношение), в то время как карбоксипептидаза В используется в концентрации от приблизительно 1:100 до 1:5000. Протеолитическое расщепление проводится в буфере с рН приблизительно 7,5 до 11,0, преимущественно рН 10,5; добавление ионов Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} может улучшать эффективность реакции. Температура инкубации варьирует от 0 градусов С до приблизительно 30 градусов С, преимущественно - около 6 градусов С, время инкубации - от 1 до 24 часов, преимущественно приблизительно 14 часов.

После протеолитического расщепления биологически активный инсулин очищают.

Нижеследующие примеры иллюстрируют изобретение . Следует понимать , что эти примеры - только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться в любом случае как ограничение этого изобретения .

Пример 1.

Конструирование плазмиды pIK8-proins.

С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) кДНК инсулина человека была амплифицирована на матрице одноцепочечной кДНК поджелудочной железы человека , используя праймеры P1 и P2:

праймер P1 (прямой праймер)

S'-GCCCATAT GCGATTT GTGAACCAACACCT GTG-3'

праймер P2 (обратный праймер)

5'-TGGAATTCCTAGTTGCAGTAGTTCTCCAGC-3'

Праймер P1 совпадает с последовательностью В-цепи гена инсулина человека , начиная с Arg²² препроинсулина человека , и содержит участок распознавания эндонуклеазы NdeI (выделен рамкой), необходимый для клонирования . Обратный праймер (P2) является комплементарным аминокислотному фрагменту А-цепи инсулина и содержит EcoRI участок (выделен рамкой) для целей клонирования . ПЦР реакцию проводили в растворе , который содержал 25 пмоль каждого из указанных праймеров , 1хПЦР буфер, 200 мкМ каждого из четырех нуклеотидов (dA , dC, dG и dT), 2 нанограмма одноцепочечной кДНК , 5,0 единиц Taq полимеразы . Условия ПЦР реакции были такими : 95 градусов С, 3 минуты , потом 35 циклов (95 градусов С, 1 минута ; 65 градусов С, 30 секунд ; 72 градуса С, 30 секунд), затем - 5 минут , 72 градуса С. ПЦР фрагмент длиной около 280 п.н. был выделен из агарозного геля и клонирован в рТА клонирующий вектор . Лигазную смесь было введено в штамм *Escherichia coli* DH5alpha, трансформанты отобраны на чашках с агаризованной LB средой , которая содержит ампицилин . Несколько отдельных колоний были выращены в LB среде на протяжении ночи , плазмидная ДНК была выделена с

использованием набора Wizard minipreps DNA isolation kit. Клон IK8 был выбран для последующей работы, поскольку он имел правильную последовательность ДНК.

Для экспрессии в *Escherichia coli* плазмидная ДНК, выделенная из клона IK8, была расщеплена эндонуклеазами рестрикции NdeI и EcoRI; ДНК фрагмент длиной около 270 п.н. был выделен из агарозного геля и клонирован в плазмиду pET28a, которая была расщеплена теми же ферментами и обработана щелочной фосфатазой из желудка теленка. Лигазной смесью был трансформирован штамм *Escherichia coli* DH5alpha и трансформанты отобраны на LBA канамициновых чашках. Плазмидная ДНК была выделена из некоторых трансформантов и проанализирована рестрикцией NdeI и EcoRI. Правильный клон был идентифицирован и назван pIK8-proins. Эта плазида была в дальнейшем введена в *Escherichia coli*, например, штамм JM109 или BL21.

Пример 2.

Конструирование плазмиды pMUT12.

Плазмидна ДНК pIK8-proins использовалась в качестве матрицы для направленного мутагенеза с использованием ПЦР и следующих праймеров:

M1: 5' - CTTCTACACACCCAA GACCAA GCGTGGCATT GTGGAAC
AATGCTG -3'

M2: 5' - CAGCATT GTTCCACAAT GCCAC GCTT GGTCTT GGGTGT
GTAGAAG -3'

После денатурации ДНК при 96 градусах С в течении 3 минут было проведено 30 циклов ПЦР с использованием 5 единиц гТth ДНК полимеразы. Условия ПЦР реакции были такими: 94 градуса С, 30сек; 59 градусов С, 30сек; 72 градуса С, 6 минут и завершающий синтез при 72 градуса С в

течение 10 минут. Продукт ПНР реакции был очищен набором Zymoclean и обработан 10 U рестриктазы DpnI - для удаления оригинальной матрицы. После еще одного цикла очистки на колонке 2мкл аликвота была введена в *Escherichia coli* штамм DH5alpha и трансформанты отобраны на LB чашках, которые содержат канамицин. Несколько отдельных колоний были выращены в LB среде на протяжении ночи, плазмидная ДНК была выделена с использованием набора Wizard minipreps. Клон MUT12 был выбран для последующей работы, поскольку он имел правильную последовательность ДНК. Для экспрессии в *Escherichia coli* эта плазида была в дальнейшем введена в *Escherichia coli*, например штамм JM109 или BL21.

Пример 3.

Конструкция плазмиды pISYN2

Для создания pISYN2 мы сначала синтезировали 5 олигонуклеотидных затравок, опираясь на опубликованную аминокислотную последовательность инсулина человека [10]. При этом кодоны нуклеотидных затравок отвечали присутствию для *Escherichia coli* генам с высоким уровнем экспрессии [11] и уровнем тРНК в *Escherichia coli* [12]. Эти затравки также содержали участки распознавания эндонуклеаз в разнообразных положениях - для целей клонирования.

Последовательности праймеров:

S1: 5'- CATATGCGCTTTGTGAACCAAG-3'

S2: 5'-AAGCCACGCTCGCCGCACACTAAATACAGCGCTTCCACCA GGTGGCTGCCACACA GATGCTGGTTCACAAA GC GCATAT G-3'

S3: 5'-CGGCGAGCGTGGCTTCTTTTATACCCCGAAAACCAAA CGTGGCATT GTGGAACA GTGTTGCACCA GTATTT GTA GCCT GT-3'

S4: 5'-CAGGCGTGAATTCTTAGTTGCAGTAATTTTCCAGCTG

ATACA GGCTACAAA TACTGGTGC-3*

S5: 5'- CAGGCGTGAATTCTTAGTTGC-3'

Смесь праймеров S1, S2, S3, S4 (конечная концентрация 2 мкм каждого) в ПЦР буферном растворе содержащем 5U rTth ДНК полимеразы нагревали до 94 градусов С в течение 1 минуты, охлаждали до 62 градусов С и проводили реакцию при 72 градусах С в течение 2 минут для заполнения разрывов. Следующие 20 циклов амплификации были выполнены при следующих условиях: 94 градуса С, 15 сек; 62 градуса С, 30 сек; 72 градуса С, 30 сек. 2мкл вышеупомянутой смеси использовали в качестве матрицы для амплификации кДНК проинсулина человека с использованием праймеров S1 и S5. ПЦР фрагмент длиной приблизительно 180 п.н. был очищен из геля и клонирован в рТА-клонировующий вектор. Клон IS2 был выбран для последующей работы, поскольку он имел правильную последовательность ДНК.

Для экспрессии в *Escherichia coli* плазмидная ДНК, выделенная из клона IS2, была расщеплена эндонуклеазами рестрикции NdeI и EcoRI; ДНК фрагмент длиной около 170 п.н. был выделен из агарозного геля и клонирован в плазмиду pET28a, которая была расщеплена теми же ферментами и обработана щелочной фосфатазой из желудка теленка. Лигазной смесью был трансформирован штамм *Escherichia coli* DH5alpha и трансформанты отобраны на LB канамициновых чашках. Плазмидная ДНК была выделена из некоторых трансформантов и проанализирована рестрикцией NdeI и EcoRI. Правильные клоны были идентифицированы и названы pISYN2. Эта плазида была в дальнейшем введена в *Escherichia coli*, например штамм JM109 или BL21.

Пример 4.

Создание плазмиды pCIM 61

Плазмидная ДНК pMUT12 использовалась как матрица для амплификации кДЖ mіі проинсулина человека с модифицированным препептидом . ПЦР реакцию проводили в условиях описанных в примере 1 с использованием следующих праймеров :

Праймер С (прямой):

5'- GCCATAT GCGAAA GA A GCGGA A GAA GA A GCGTTTT GTG AACACCTGTG-3'

Праймер IL4 (обратный):

5'-CCGCAA GCTTTTA GTTGCA GTA GTTCTCCA GCTGG-3'

ПЦР продукт длиной приблизительно 210 п.н. было выделено из агарозного геля и клонировано в рТА вектор . Лигазная смесь была трансформирована в *Escherichia coli* штамм DH3alpha и трансформанты отобраны на LB чашках , которые содержат ампициллин . Клон СЕМ6 был отобран как таковой , что имеет правильную ДНК последовательность .

Для экспрессии в *Escherichia coli*, плазмидную ДНК выделенную из клона СІМ6, было обработано эндонуклеазами рестрикции NdeI и HindIII . Фрагмент ДНК длиной приблизительно 200 п.н. было выделено из геля и клонировано в плазмиду рЕТ39а, обработанную теми же ферментами . Лигазная смесь была трансформирована в *Escherichia coli* DH5alpha и трансформанты отобраны на LB чашках с канамицином . Плазмидную ДНК было выделено из нескольких трансформантов и проанализировано расщеплением NdeI и HindIII. Правильный клон был идентифицирован и назван рG M 6I . Эта плазида была трансформирована в *Escherichia coli*, например штамм JM1 09 или BL2 1.

Пример 5.

Создание плазмиды рDпую7

Плазмидная ДНК pMUT12 использовалась в качестве матрицы для амплификации кДНК mш і проинсулина человека с модифицированным препептидом . ПЦР реакцию проводили в условиях , описанных в примере 1 с использованием следующих праймеров :

Праймер D (прямой):

5'-TACCAT GGA TGA A GAC GA GGAT TGA A GCAC GCTTT GT GA A
CCAACACCTGTG-3'

Праймер IL4 (обратный):

5'-CCGCAA GCTTTTA GTTGCA GTA GTTCTCCA GCT GG-3'

ПЦР продукт , длиной приблизительно 210 п.н., был выделен из агарозного геля и клонирован в рТА вектор . Лигазная смесь была трансформирована в *Escherichia coli* штамм DH5alpha и трансформанты , отобраны на LB чашках , которые содержат ампициллин . Клон DIMI был отобран как таковой , который имеет правильную ДНК последовательность .

Для экспрессии в *Escherichia coli* плазмидную ДНК , выделенную из клона DIMI, обработали эндонуклеазами рестрикции NcoI и HpaI. Фрагмент ДНК длиной приблизительно 200 п.н. было выделено из геля и клонировано в плазмиду pET28a, обработанную теми же ферментами . Лигазная смесь была трансформирована в *Escherichia coli* DH5alpha и трансформанты отобраны на LB чашках с канамицином . Плазмидную ДНК было выделено из нескольких трансформантов и проанализировано расщеплением NcoI и HpaI. Правильный клон был идентифицирован и назван pDIM07. Эта плазида была трансформирована в *Escherichia coli*, например штамм JM1 09 или BL21.

Пример 6.

Экспрессия полипептидов -предшественников инсулина

Плазмиды , в которых подтверждено наличие ДНК фрагмента , который кодирует последовательность предшественника инсулина (pIK8-proins, pMUT12, pCIM 6I, pISYN2, pDIM07 и др.), использовались для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3) в соответствии с процедурами , которые описаны выше , и клетки колоний трансформированные плазмидными ДНК pIK8-proins, pISYN2 и pCEV 6I были помещены в Украинский Центр Микроорганизмов с номерами доступа соответственно

IMB B-7169, IMB B-7230 и IMB B-7251, а также депонированы в Чешской Коллекции Микроорганизмов с номерами доступа соответственно CCM 751 1, CCM 7568 и CCM 7567 согласно условиям Будапештского Соглашения относительно Международного договора по размещению микроорганизмов с целью патентования .

Колонии , отобранные как описано выше , были инокулированы в 1 мл LB среды (10 г бакто триптона , 5 г дрожжевого экстракта и 10 г NaCl на л) и потом культивировались при 37 градусах С в течение не менее 12 часов . Культура была перенесена в колбу с 50 мл LB среды , которая содержит 30 мкг /мл канамицина , и после достижения культурой оптической плотности в пределах от 0,5 до 0,8 была индуцирована добавлением IPTG (изопропил - β -D-тиогалактопиранозид) в культуру до конечной концентрации 1 мМ . Выращивание продолжалось при 37 градусах С в течение 4 час при интенсивном перемешивании (200 об/мин) . После индукции бактериальную культуру центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин для того , чтобы получить осадок клеток *E. coli*. Клетки были лизированы нагреванием до 95 градусов С в течение 5 мин в буфере для нанесения образцов , лизаты были проанализированы с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях согласно стандартной методики [13].

Пример 7.

Ферментация и условия выращивания

1. Рабочий банк .

Единичная колония *Escherichia coli* штамма BL21, который содержит одну из выше указанных плазмид , выращивалась в среде LB (Юг/л бакто пептон , 5г/л дрожжевой экстракт и 5г/л NaCl) или ее аналоге с добавлением соответствующего антибиотика . Культуры были потом разбавлены средой для криоконсервации и хранились при температуре -80 градусов С или -170 градусов С .

2. Посев .

Колба со стерильной средой LB с добавлением 30 мкг /мл канамицина или 50 мкг /мл ампициллина была засеяна культурой из рабочего банка и инкубирована в течение 15 час на шейкере при 37 градусах С и приблизительно 250 об/мин . При необходимости следующие этапы выращивания проводили в аэрируемых ферментерах с перемешиванием . Стерильная среда в ферментере была засеяна бактериальной культурой из колбы (объем инокулята составлял 5-10% от объема ферментера), инкубация проводилась в течение 5-8 часов при 37 градусах С, рН 6.9 ± 0.5 с перемешиванием и аэрацией для поддержания уровня растворенного кислорода выше 20% насыщения .

3. Выращивание

Производственная среда была засеяна посевной культурой (1-10% от объема рабочего ферментера) и инкубировалась при 37 градусах С . Перемешивание -аэрация были выставлены на уровне достаточном , чтобы поддерживать уровень растворенного кислорода выше 20% насыщения . Показатель рН поддерживался на уровне $6,9 \pm 0,5$ с помощью NH_4OH . Пропиол Б400 использовался в качестве пеногасителя .

Производственная среда :

бакто пептон	3.5 г/л
дрожжевой экстракт	3.5 г/л
глюкоза	2.0 г/л
NaCl	1.0 г/л
(NH₄)Cl	3.0 г/л
K₂HPO₄	4.0 г/л
(NH₄)H₂PO₄	2.0 г/л
(NH₄)₂SO₄	2.0 г/л
K₂SO₄	3.0 г/л
MgSO₄	1.0 г/л
тиамин	5 мг/л

микроэлементы	2 мл/л
канамицин	30 мг/мл

Раствор микроэлементов :

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 г/л
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,25 г/л
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 г/л
MnCl_2	0,25 г/л
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,25 г/л
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 г/л
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,1 г/л
0.75 M EDTA	100 мл/л
лимонная кислота	60 г/л

Стерильный раствор 50% глюкозы использовали в качестве источника углерода . Как только концентрация клеток достигла OD_{600} 30, стерильный раствор индуктора , например IPTG (конечная концентрация 1 мМ) был инфузирова н и культивирование продолжали в течение 6 час , концентрация клеток достигала приблизительно 50 при OD_{600} - Культуральную среду после этого охлаждали и клетки собирали центрифугированием .

Пример 8.

Очистка телец включения

Бактериальную массу ресуспендировали (в соотношении к буферному раствору 1:10) в холодном буферном растворе , который содержит 20 мМ Tris, pH 7,5; 100 мМ EDTA и 100 мМ NaCl. Клеточная суспензия была пропущена через разрушитель клеток при 17000 psi и тельца включения собирали центрифугированием .

Осадок , который содержит тельца включения и фрагменты бактерий , был отмыт 20-кратним объемом холодного (+10 градусов C) буфера для

отмывания , который содержит 1,0 % Triton X 100, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA , 100 mM NaCl. Осадок был собран центрифугированием приблизительно при 14000 об/мин . Стадия отмывания была повторена дважды .

1,5 кг влажных телец включения , которые содержат приблизительно 1,0 кг гибридного полипептида (определено за методом Бредфорда) были растворены в 15 л буферного раствора , который содержит 8 М мочевины , 50 mM глицина , pH 8,0; 2mM EDTA , 150 mM β -меркаптоэтанола . Инкубация продолжалась в течение 6 час при комнатной температуре . Раствор был осветлен высокоскоростным центрифугированием и восстановленный предшественник инсулина был использован для рефолдинга .

Пример 9.

Очистка телец включения

Водная суспензия телец включения объемом 60 л с общим содержанием белка 12 кг была обработана лизоцимом (0,1 мг/мл), РНКазой (0,5 ед. акт./мл) и ДНКазой (0,5 ед. акт./мл) в течение 3 час при 25°C в буфере , который содержит 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM $MgSO_4$. После обработки было проведено определение содержания нуклеиновых кислот , которое составляло 198 мг/л (656 мг/л - до обработки).

Тельца включения были отмыты от избытка ферментов центрифугированием и растворены в 100 л буферного раствора , который содержит 8М мочевины , 20 mM глицина , pH 8,5; 1mM EDTA , 150 mM β -меркаптоэтанола . Инкубация продолжалась в течение 4 час при комнатной температуре . Раствор был осветлен высокоскоростным центрифугированием и восстановленный предшественник инсулина был использован для рефолдинга .

Пример 10.

Рефолдирование гибридного полипептида

Емкость для рефолдинга была наполнена буфером (50 мМ глицин , 2 мМ EDTA , 5 мМ цистин , 10% глицерол , pH 11,2) и охлаждена до 5 градусов С. Потом осветленный полипептидный раствор и буфер для рефолдинга быстро смешивают в пропорции 1:70 (об/об) путем подачи этих растворов в камеру смешивания . Реакционную смесь переносят в емкость для рефолдинга на 10 час при 5 градусах С и при медленном перемешивании . Концентрация полипептида в емкости для рефолдинга составляет приблизительно 1,0 г/л, как определено по методу Бредфорда .

Концентрирование

Концентрирование рефолдированного полипептида обычно выполняется путем ультрафильтрации или с использованием абсорбционной хроматографии . Хромато графическая колонка размером 450x500 мм. была заполнена 30 л полимерного сорбента Amberchrom CG-300M. Рефолдированная реакционная смесь подавалась на колонку при скорости потока 4 л/мин , колонка была отмыта тремя объемами буфера для уравнивания . Полипептид элюировали 20- 40% раствором 2-пропанола. Потом элюент был проанализирован методом высокоэффективной жидкостной хроматографии , что показало чистоту полученного препарата больше 45%, а выход составляет не менее 96%.

Пример 11.

Рефолдирование гибридного полипептида

Емкость для рефолдинга была наполнена буфером (10 мМ глицин , 10 мМ EDTA , 2 мМ цистин , 1 г/л ПЕГ 1500, pH 11.2) и охлаждена до 10°С. 50 л восстановленного гибридного белка смешали с 5000 л буфера для рефолдинга , концентрация белка в емкости для рефолдинга составляет 0,5 г/л.

Через 6 час в рефолдинг буфер было внесено Zn^{2+} в концентрации 3 мМ и доведено pH до 6,2. Суспензия высажденного белка была подана на самовыгружной сепаратор , и получено приблизительно 150 л водной

суспензий аморфного осадка белка, который был растворен путем добавления мочевины до 6М.

Пример 12.

Ферментативная конверсия

Предшественник инсулина в растворе 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0 был расщеплен до инсулина человека путем инкубации с трипсином (1:8000; весовое соотношение) и карбоксипептидазой В (1:2000; весовое соотношение) в присутствии 1,5мМ Zn^{2+} . Реакцию вели в течение 16 час. при 8 градусах С и останавливали путем коррекции pH до 2,5 с помощью 6М HCl. Высокоэффективный жидкостной хроматографический анализ показал, что чистота полученного препарата составляла 69% или больше. Инсулин может быть высажден из реакционной смеси сульфатом аммония или хлоридом натрия (конечная концентрация 20%).

Пример 13.

Ионообменная хроматография

300 г инсулина было растворено в 19 л буферного раствора, который содержит 50 мМ Tris-HCl, 1 мМ EDTA, pH 8,3; 32% 2-пропанола. Раствор инсулина фильтровали через 0,5 мкм фильтр и подавали на колонку для ионообменной хроматографии при скорости потока 320 мл/мин. Колонка была заполнена 19 л сорбента Matrex PEI-300. После адсорбции инсулина колонка была отмыта двумя объемами буфера для уравнивания. Полипептид был элюирован градиентом (0-0,3 М) концентрации NaCl. Потом фракции элюента, которые собраны в пределах 0,1-0,2 М NaCl были проанализированы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ показал, что чистота препарата составляла не менее 85%, а выход продукта - не менее 91%.

Пример 14.

инсулина

Кристаллы инсулина после ионообменной хроматографии растворяли при pH 3,0 в растворе, который содержал 0,05 М ацетата натрия и 10 % 2-пропанола и фильтровали через 0,2 мкм фильтр. Полученный раствор со скоростью 0,8 л/мин подавали на колонку размером 200x600 мм, заполненную 19 л сорбента, например Diasogel SP-120-20-ODS-AP. Предварительно колонку уравнивали 40 л буфера для нанесения (0,05 М натрия ацетата, 10% 2-пропанола, pH 3,0); этим же буферным раствором промывали колонку после нанесения инсулина. Элюцию инсулина проводили линейным градиентом 2-пропанола (10-28%). Для регенерации сорбента колонку промывали 50 л раствора, который содержит 0,05 М ацетата калия, 50% 2-пропанола, pH 3,0. Анализ показал, что чистота инсулина составляла не менее 98%.

Источники информации

1. Brandenburg D, Wollmer A. Insulin: chemistry, structure, and function of insulin and related hormones : proceedings of the Second International Insulin Symposium, Aachen, Germany, September 4-7, 1979. Publisher: New York : W. de Gruyter, 1980.
2. Fischer M, Fytlovitch S, Arøit B, Wortzel A, Beck Y. A constitutive expression vector system driven by the deo P1P2 promoters of *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 1990, 33: 424-8.
3. Davidson HW, Rhodes CJ, Hutton JC. Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. Nature, 1988, 333: 93-96.
4. Markussen J. Human insulin by tryptic transpeptidations of porcine insulin and biosynthetic precursors. Boston : MTP Press, 1987.
5. Chance RE, Kroeff EP, Hoftmann JA, Frank BH. Chemical, physical, and biologic properties of biosynthetic human insulin. Diabetes Care, 1981, 2: 147-54.

6. Tilm L, Hansen MT, Norris K, Hoegh I, Boel E, Forstrom J, Ammerer G, and Fiil NP. Secretion and Processing of Insulin Precursors in Yeast. PNAS, 1986, 83: 6766-6770.
7. Cousens LS, Shuster JR, Gallegos C, Ku LL, Stempien MM, Urdea MS, Sanchez-Pescador R, Taylor A, Tekamp-Olson P. High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1987, 61:265-275.
8. Cowley DJ, Mackin RB. Expression, purification and characterization of recombinant human proinsulin. FEBS Letters, 1997, 402: 124-130
9. Лазарев ОП, Лесик Ш, Костецкий ІГ, Лісовський ІЛ, Рибачук ВМ, Стадник ВІ. Спосіб одержання рекомбінантного інсуліну людини Патент України № 76661, C12N 15/17, C12N 1/21, публ. 2006.
10. Le Lay J, Matsuoka TA, Henderson and Stein R. Identification of a novel PDX-I binding site in the human insulin gene enhancer J. Biol. Chem., 2004, 279: 22228-22235.
11. Grantham R, Gautier C, Gouy M. Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type. Nucleic Acids Res., 1980, 8:1893-1912.
12. Ikemura T T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system. J. Mol. Biol., 1981, 151:389-409.
13. Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения рекомбинантного инсулина человека путем конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК, которая кодирует проинсулин, получения и культивирования штамма-продуцента гибридного белка *Escherichia coli*, выделения и дезинтеграции клеток, выделения гибридного полипептида, его ферментативного расщепления со следующей очисткой и получением целевого продукта, который отличается тем, что участок рекомбинантной плазмидной ДНК, которая кодирует гибридный полипептид с аминокислотной последовательностью проинсулина человека, есть в составе экспрессирующих векторов pK8-proins, или pMUT12, или pLSYN2, или pCIM6I, или pDIM07, или представляет собой последовательность ДНК, которая гибридизирует с одной из вышеуказанных ДНК вставок и которые кодируют экспрессию предшественника проинсулина человека, а участок рекомбинантной плазмидной ДНК, которая кодирует гибридный белок с аминокислотной последовательностью проинсулина человека, является частью плазмиды pK8-proins и имеет следующую структуру:

I	A T G G G C A G C A G C C A T C A T C A T C A T C A C A	G C A G C G G C C T G G T G C C G C G C G G C A G C C A T
1	M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H	
61	A T G C G C T T T G T G A A C C A A C A C C T G T G C G G C T C A C A C C T G G T G G A A G C T C T C T A C C T A G T G	
21	M R F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V	
121	T G C G G G G A A C G A G G C T T C T T C T A C A C A C C C A A G A C C C G C C G G G A G G C A G A G G A C C T G C A G	
41	C G E R G F F Y T P K T R R E A E D L Q	
181	G T G G G G C A G G T G G A G C T G G G C G G G G G C C C T G G T G C A G G C A G C C T G C A G C C C T T G G C C C T G	
61	V G Q V E L G G G P G A G S L Q P L A L	
241	G A G G G G T C C C T G C A G A A G C G T G G C A T T G T G G A A C A A T G C T G T A C C A G C A T C T G C T C C C T C	
81	E G S L Q K R G I V E Q C C T S I C S L	
301	T A C C A G C T G G A G A A C T A C T G C A A C T A G	
101	Y Q L E N Y C N * ,	

участок рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный белок с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , является частью плазмиды pMUT12 и имеет следующую структуру :

```

1      ATGGGCA GCA GCCATCATCATCATCACACA  GCA GCGGCCT GGT GCCGCGCGGCA GCCAT
1      M  G  S  S  H  H  H  H  H  H  S  S  G  L  V  P  R  G  S  H

61     ATGCGCTTT GTGAACCAACACCT GTGCGGCTCACACCT GGTGGAAGCTCTCTACCTA GTG
21     M  R  F  V  N  Q  H  L  C  G  S  H  L  V  E  A  L  Y  L  V

121    TCGGGGGAAC GAGGCTTCTTCTACACACCCAA  GACCAA GCGTGGCATT GTGGAACAAT GC
41     C  G  E  R  G  F  F  Y  T  P  K  T  K  R  G  I  V  E  Q  C

181    TGTACCA GCATCT GCTCCCTCTACCA GCTGGAGAATACT GCAACTA G
61     C  T  S  I  C  S  L  Y  Q  L  E  N  Y  C  N  *  ,

```

участок рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный белок с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , является частью плазмиды pISYN2 и имеет следующую структуру :

```

1      ATGGGCA GCA GCCATCATCATCATCACACA  GCA GCGGCCT GGT GCCGCGCGGCA GCCAT
1      M  G  S  S  H  H  H  H  H  H  S  S  G  L  V  P  R  G  S  H

61     ATGCGCTTT GTGAACCA GCATCT GTGTGGCAGCCACCT GGTGGAAGCGCTGTATTTA GTG
21     M  R  F  V  N  Q  H  L  C  G  S  H  L  V  E  A  L  Y  L  V

121    TCGGGCGA GCGTGGCTTCTTTTATACCCC  GAAAACCAAAC GTGGCATT GTGGAACA GTGT
41     C  G  E  R  G  F  F  Y  T  P  K  T  K  R  G  I  V  E  Q  C

181    TGCACCA GTATTT GTAGCCT GTATCA GCTGGAAAATACT GCAACTAA
61     C  T  S  I  C  S  L  Y  Q  L  E  N  Y  C  N  *  ,

```

участок рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный белок с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , является частью плазмиды pC1M6I и имеет следующую структуру :

```

1      ATGCGAAA GAAGCGGAAGAAGAAGCGTTTT GTGAACCA GCATCT GTGTGGCAGCCACCT G
1      M  R  K  K  R  K  K  K  R  F  V  N  Q  H  L  C  G  S  H  L

61     GTGGAAGCGCTGTATTTA GTGTGCGGCGA GCGTGGCTTCTTTTATACCCC  GAAAACCAAA
21     V  E  A  L  Y  L  V  C  G  E  R  G  F  F  Y  T  P  K  T  K

```

121 CGTGGCATTGTGGAACAGTGTTGCACCAAGTATTTGTAGCCTGTATCAGCTGGAAAATTAC
 41 R G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y

181 TGCAACTAA
 61 C N * ,

участок рекомбинантной плазмидной ДНК , которая кодирует гибридный белок с аминокислотной последовательностью проинсулина человека , является частью плазмиды pDIM07 и имеет следующую структуру :

1 ATGGATGAAGACGAGGATGAAGCACGCTTTGTGAACCA GCATCT GTGTGGCAGCCACCT G
 1 M D E D E D E A R F V N Q H L C G S H L

61 GTGGAAGCGCTGTATTTA GTGTGCGGCGA GCGTGGCTTCTTTATACCCC GAAAACCAAA
 21 V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K T K

121 CGTGGCATT GTGGAACA GTGTTGCACCA GTATTT GTAGCCT GTATCA GCTGGAAAATTAC
 41 R G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y

181 TGCAACTAA
 61 C N * .

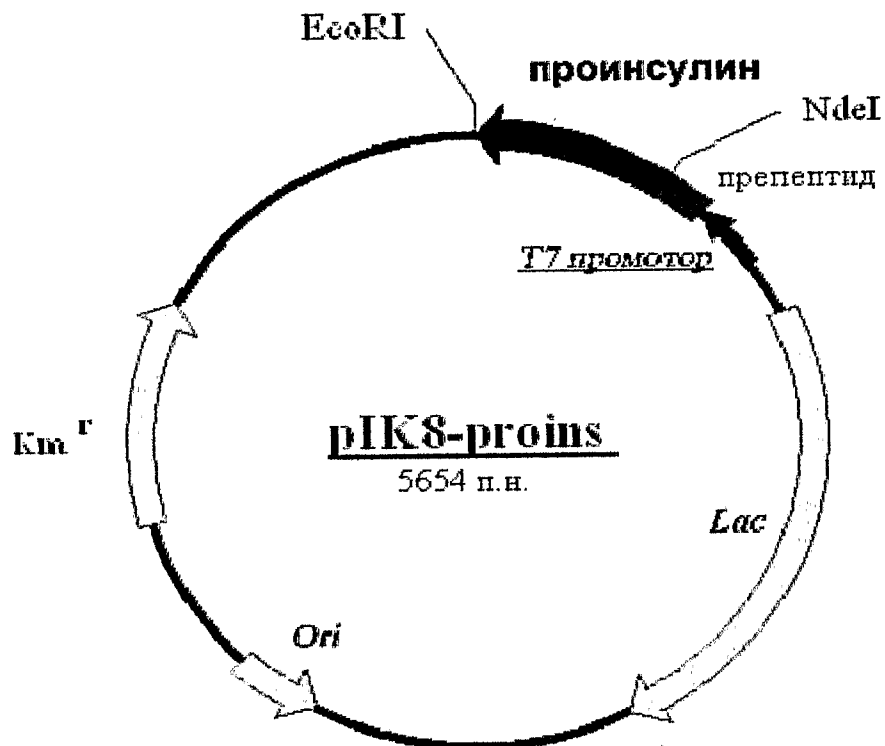
2. Способ по п. 1, который отличается тем, что стадию создания штаммов *Escherichia coli* осуществляют с использованием плазмидных векторов , что содержат нуклеотидную последовательность , которая кодирует один или несколько рекомбинантных полипептидов , при этом транскрипция указанной нуклеотидной последовательности , которая кодирует один или несколько полипептидов , находится под контролем индуцируемой системы экспрессии , потом осуществляют культивирование трансформируемых штаммов *Escherichia coli* но индуцирование системы экспрессии для синтеза рекомбинантно го полипептида или полипептидов в клетках *Escherichia coli*, и выделение рекомбинантного полипептида или продуцируемых полипептидов .

3. Способ по п. 1, который отличается тем, что выделение и дезинтеграция клеток, выделение гибридного полипептида осуществляют путем разрушения бактериальной клетки или фрагментов клеток, сепарации с одновременным отмыванием осадка неионным детергентом, а выделение гибридного полипептида включает растворение с денатурирующим реагентом, обработку гибридного полипептида восстанавливающим агентом, рефолдинг гибридного полипептида и его концентрирования методом абсорбционной хроматографии или ультрафильтрации.

4. Способ по п. 1, который отличается тем, что ферментативное расщепление гибридного полипептида осуществляют трипсином и карбоксипептидазой одновременно или последовательно с использованием преимущественно очистки продуктов ферментативной конверсии с помощью ионообменной хроматографии.

5. Способ по п. 1, который отличается тем, что очистку инсулина после ферментативного расщепления осуществляют с помощью ионообменной хроматографии и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии.

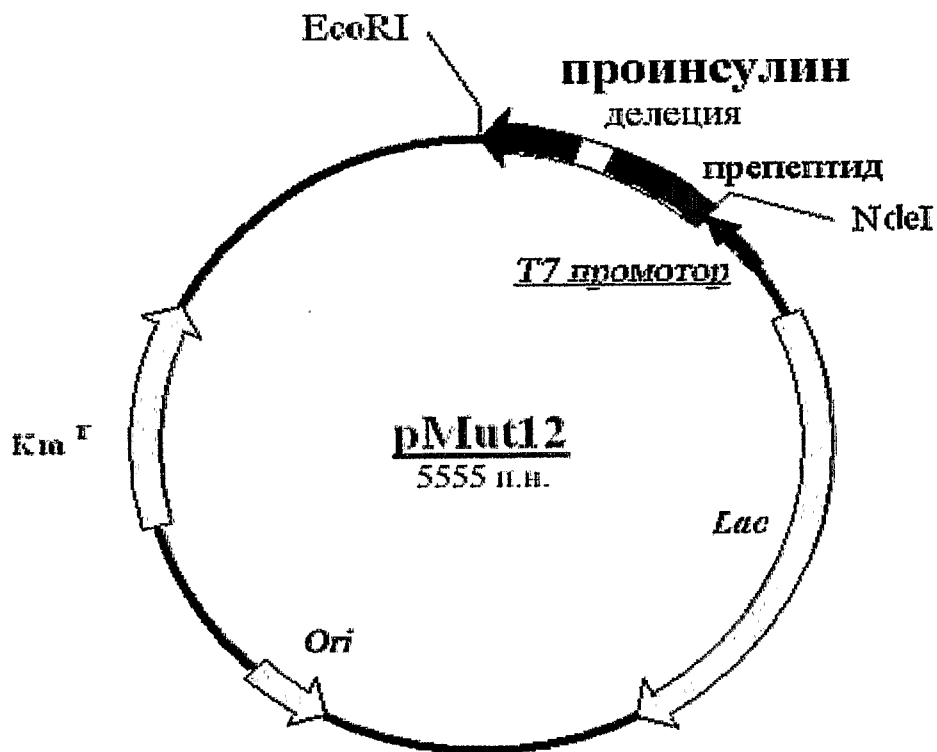
1/6



1	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
1	M G S S H H H H H S S G L V P R G S H
61	ATGCGCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTG
21	M R F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V
121	TGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCCGCCGGGAGGCAGAGGACCTGCAG
41	C G E R G F F Y T P K T R R E A E D L Q
181	GTGGGGCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGTGCAAGCAGCCTGCAGCCCTTGGCCCTG
61	V G Q V E L G G G P G A G S L Q P L A L
241	GAGGGGTCCCTGCAGAAGCGTGGCATTTGTGGAACAATGCTGTACCAGCATCTGCTCCCTC
81	E G S L Q K R G I V E Q C C T S I C S L
301	TACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG
101	Y Q L E N Y C N *

Рис 1.

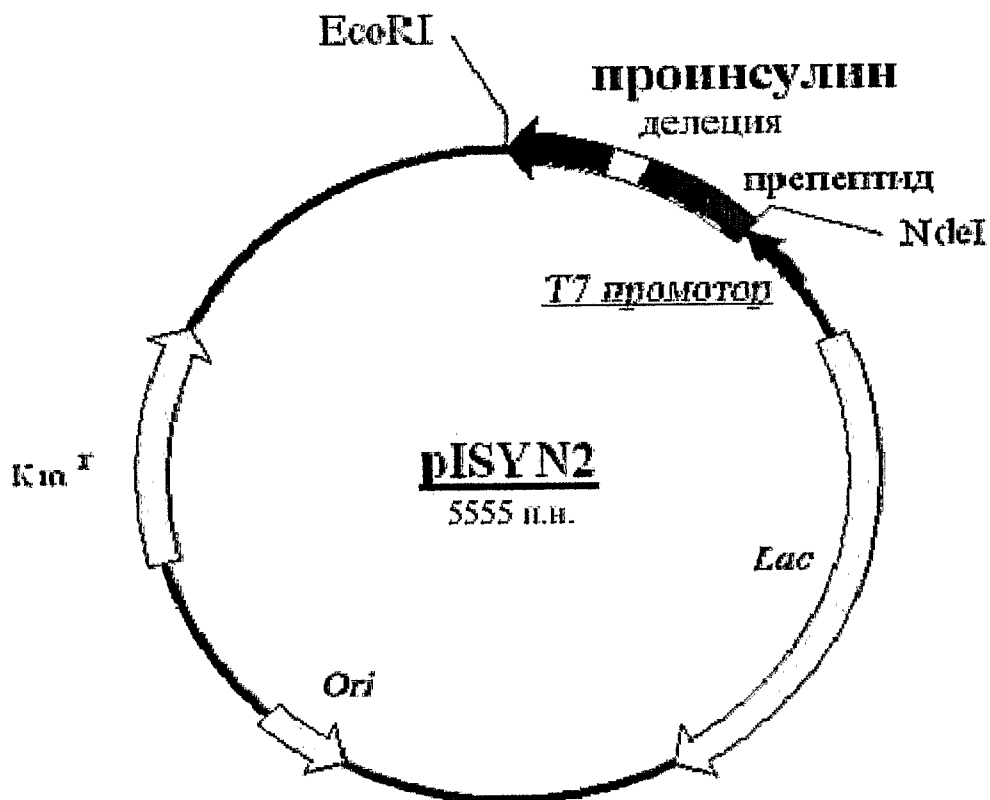
2/6



1	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
1	M G S S H H H H H S S G L V P R G S H
61	ATGCGCTTTGTGAACCAACACCTGTGCGGCTCACACCTGGTGGAAGCTCTCTACCTAGTG
21	M R F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V
121	TGCGGGGAACGAGGCTTCTTCTACACACCCAAGACCAAGCGTGGCATTGTGGAACAATGC
41	C G E R G F F Y T P K T K R G I V E Q C
181	TGTACCAGCATCTGCTCCCTCTACCAGCTGGAGAACTACTGCAACTAG
61	C T S I C S L Y Q L E N Y C N *

Рис 2.

3/6



```

1      ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAT
1      M G S S H H H H H S S G L V P R G S H

61     ATGCGCTTTGTGAACCAGCATCTGTGTGGCAGCCACCTGGTGGAAGCGCTGTATTTAGTG
21     M R F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V

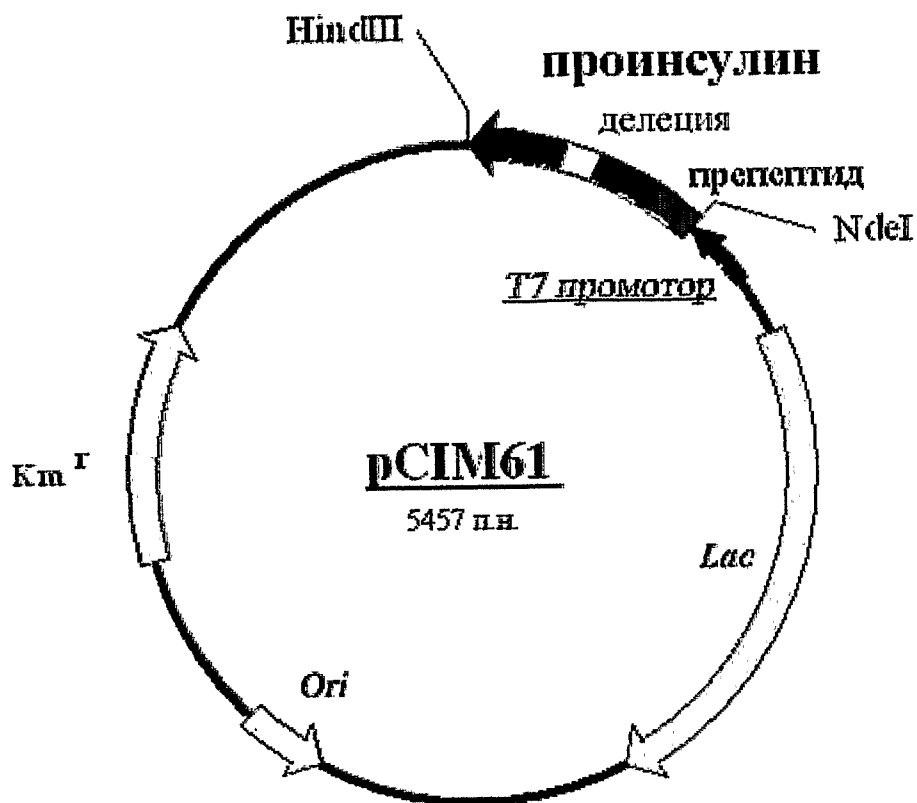
121    TCGGCGAGCGTGGCTTCTTTTATACCCCGAAAACCAAACGTGGCATTGTGGAACAGTGT
41     C G E R G F F Y T P K T K R G I V E Q C

181    TGCACCAGTATTTGTAGCCTGTATCAGCTGGAAAATTACTGCAACTAA
61     C T S I C S L Y Q L E N Y C N *

```

Рис 3.

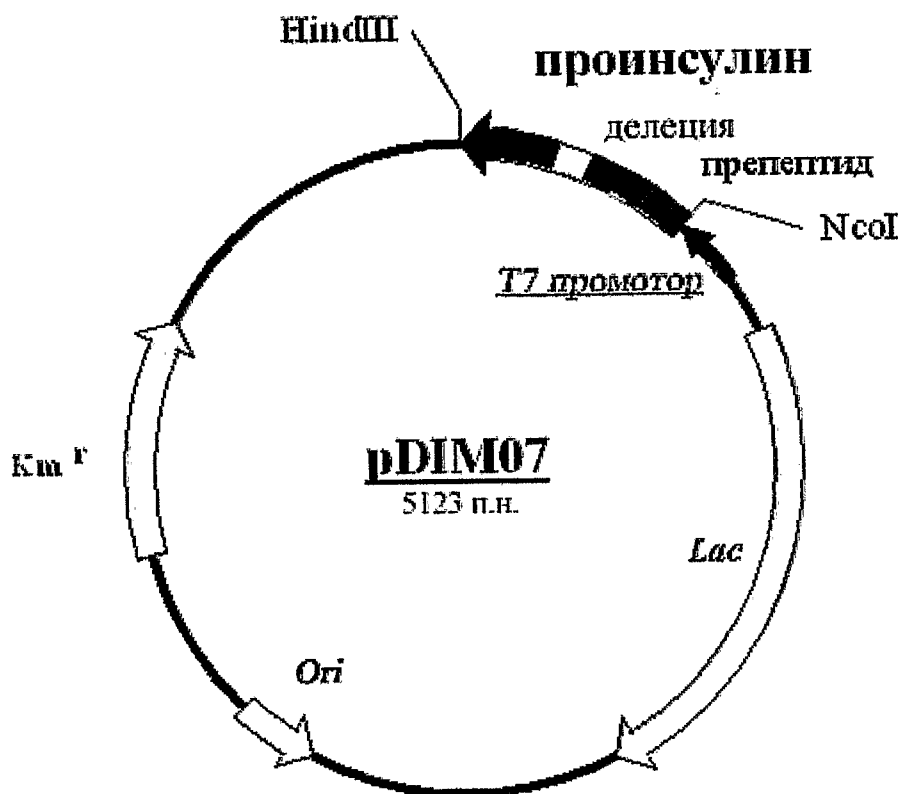
4/6



1	ATGCGAAAGAAGCGGAAGAAGAAGCGTTTTGTGAACCAGCATCTGTGTGGCAGCCACCTG
1	M R K K R K K K R F V N Q H L C G S H L
61	GTGGAAGCGCTGTATTTAGTGTGCGGCGAGCGTGGCTTCTTTTATACCCCGAAAACCAAA
21	V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K T K
121	CGTGGCATTGTGGAACAGTGTTCACCAGTATTTGTAGCCTGTATCAGCTGGAAAATTAC
41	R G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y
181	TGCAACTAA
61	C N *

Рис 4.

5/6



1	ATGGATGAAGACGAGGATGAAGCACGCTTTGTGAACCAGCATCTGTGTGGCAGCCACCTG
1	M D E D E D E A R F V N Q H L C G S H L
61	GTGGAAGCGCTGTATTTAGTGTGCGGCGAGCGTGGCTTCTTTTATACCCGAAAACCAAA
21	V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K T K
121	CGTGGCATTGTGGAACAGTGTTCACCAGTATTTGTAGCCTGTATCAGCTGGAAAATTAC
41	R G I V E Q C C T S I C S L Y Q L E N Y
181	TGCAACTAA
61	C N *

Рис 5.

6/6

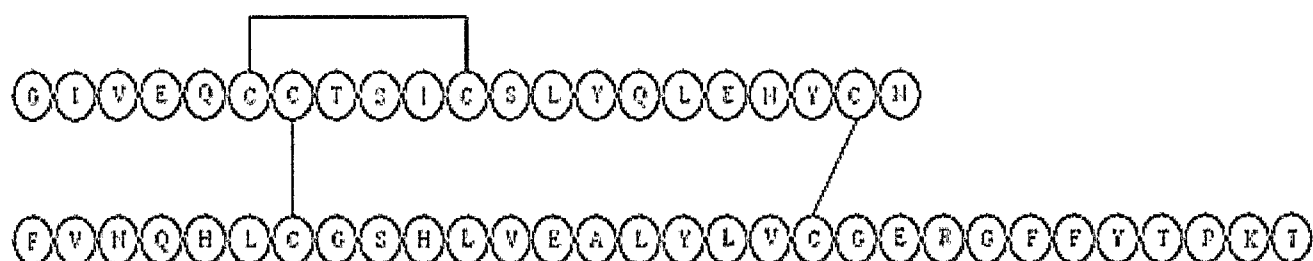


Рис 6.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/UA2009/000025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER *C12N 15/17 (2006.01)* *C12N 15/70 (2006.01)*
C12N1/21 (2006.01) *C12R 1/19 (2006.01)*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/17, 1/21, 15/70, C12R 1/19

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are Included In the fields searched

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)

PubMed, ROSPATENT, Patents (PCT), DEPAT ISnet, K-PION, Pat FT, Esp@ce net, SNAPT, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	UA 76661 C2 (TOVARISCHE STVO Z OBME ZHENOU VIDPOVIDALNISTIJU "MAKO"), 15.08.2006 pages 5, 6, the claims	1-2, 4-5 3
Y	SKOUPS R., "Metody ochistki belkov", M., "MIR", 1985, pages 237-239	3
Y	SAKO DYNKY K.I. et al., "Analiticheskaya khromatografiya", M., Khimiya, 1993, pages 195-205	3
A	UA 24452 (ZAKRITOE AKTSIONERNOE OBSHCHE STVO "FOSFOR"), 15.08.2003	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"P"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 October 2009

Date of mailing of the international search report

22 October 2009

Name and mailing address of the ISA/
RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка Na
PCT /UA 2009/000025

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ :			CUN 15/17 (2006.01) C12N1/21 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)
Согласно Международной патентной классификации МПК			
В. ОБЛАСТИ ПОИСКА :			
Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации):			
C12N 15/17, 1/21, 15/70, C12R 1/19			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки :			
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины): PubM ed, ROSPATENT, Patents (PCT), DEPAT I Snet, K-PION, Pat FT, Esp@cenet, SNAPT, PAJ			
С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ :			
Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту Na	
X Y	UA 76661 C2 (ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "МАКО") 15.08.2006, стр. 5, 6, формула	1-2, 4-5 3	
Y	СКОУПС Р., "Методы очистки белков", М., "МИР", 1985, стр. 237-239	3	
Y	САКОДЫНСКИЙ К.И. и др., "Аналитическая хроматография", М., Химия, 1993, стр. 195-205	3	
A	UA 24452 (ЗАКРИТОЕ АКЦІОНЕРНЕ ОБЩЕСТВО "ФОСФОСОРБ") 15.08.2003	1-5	
Последующие документы указаны в продолжении графы С. Данные о патентах -аналогах указаны в приложении * Особые категории ссылочных документов: A документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным E более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее L документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) O документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета T более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста & документ, являющийся патентом -аналогом			
Дата действительного завершения международного поиска :		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске :	
14 октября 2009 (14.10.2009)		22 октября 2009 (22.10.2009)	
Наименование и адрес ISA/RU ФГУ ФИПС, РФ Д 23995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс: (499) 243-3337		Уполномоченное лицо : М. Худяев Телефон № (495) 730-76-75	

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCTVUA 2009/000025

Графа I. Последовательность(и) нуклеотидов и/или аминокислот (Продолжение пункта I.c первого листа)

1. Относительно любой последовательности нуклеотидов и/или аминокислот, раскрытой в международной заявке, международный поиск подготовлен на основе:

a. типа материала

- ☒ перечня последовательностей
☐ таблиц, относящихся к перечню последовательностей

b. формата материала

- ☒ на бумажном носителе
☐ в электронной форме

c. времени подачи / представления

- ☒ содержащихся в первоначально поданной заявке
☐ поданных вместе с международной заявкой в электронной форме
☐ представленных впоследствии в данный Орган для целей проведения поиска

2. ☐ Дополнительно, в случае, если более чем одна версия или копия перечня последовательности и/или соответствующая таблица были поданы первоначально или были представлены впоследствии, требуется, чтобы информация в последующих или дополнительных копиях была идентична той, которая была в первоначально поданной заявке, или не выходила за рамки раскрытия первоначально поданной заявки.

3. Дополнительные комментарии:

Поскольку заявитель не представил в установленные сроки перечень последовательностей нуклеотидов и аминокислот в электронной форме, международный поиск проведен в той степени, в которой полноценный поиск может быть проведен без перечня последовательностей в электронной форме.

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»
(ФГБОУ ВО «КНИТУ»)

На правах рукописи



Ле Ань Туан

**Применение психротолерантных дрожжей для биоконверсии
вторичных ресурсов переработки растительного сырья**

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель
д.т.н., профессор
Канарский Альберт
Владимирович

Казань - 2016

Определение биомассы дрожжей проводили фотометрическим методом с предварительным построением калибровочного графика. Оптическую плотность биомассы дрожжей определяли при длине волны 540 нм и ширине кюветы 5 мм [195].

- Для определения количества дрожжевых клеток использовали камеру Горяева – Тома [196]

Удельную скорость роста μ определяли логарифмическим отношением количества биомассы m_1 , полученной за время t , к количеству биомассы дрожжей m_0 , засеянных в дрожжерастильный аппарат, по формуле:

$$\mu = \frac{\ln \frac{m_1}{m_2}}{t}. \quad (1)$$

Для оценки размножения клеток пользуются понятием «продолжительность генерации», то есть временем, в течение которого обособившаяся молодая клетка вырастает до величины, соответствующей данной расе, и начинает почковаться. Продолжительность генерации определяли по формуле

$$q = 0,693 / \mu. \quad (2)$$

Выход биомассы дрожжей определяли отношением количества биомассы m_1 , полученной за время t , к количеству редуцирующих веществ m_2 ассимилированных дрожжами за время t , по формуле:

$$B = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (3)$$

2.6 Определение содержания простых сахаров в питательной среде и культуральной жидкости

Содержание простых сахаров в культуральной жидкости по окончании культивирования дрожжей определил хроматографическим методом - распределительной ВЭЖХ [197].

Колонка: 9x500 мм, стекло, смола Ostion AN в Ca^{+} - форме, температура колонки 85°C. Элюент: 0,5 мМ нитрат кальция, 1,2 мл/мин. Детектор: рефрактометрический. Объем вводимой пробы: 50 мкл.

2.7 Определение содержания глюкозы в питательной среде и культуральной жидкости

Примененный в работе метод определения глюкозы основан на окислении D-глюкозы глюкозооксидазой до глюкуроновой кислоты с образованием перекиси водорода, которая под действием пероксидазы реагирует с 4-аминоантипирином и фенолом с образованием соединения красного цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы в исследуемом образце и измеряется фотометрически при длине волны 540 нм [198]

К 0,01 мл фильтрата приливали 1 мл рабочего раствора, выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Измерения оптической плотности растворов проводили при длине волны 540 нм против холостой пробы.

Концентрацию глюкозы (ммоль/л) рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_k} \times 10, \quad (4)$$

где E_0 - оптическая плотность опытной пробы; E_k - оптическая плотность калибровочной пробы.

2.8 Определение ферментативной активности дрожжей

- β -фруктофуранозидазную активность определяли в трех повторностях по скорости гидролиза сахарозы, которую устанавливали по количеству образовавшегося глюкозы в реакционной жидкости [199].

-Полигалактуроназную (пектиназную) активность определяли колориметрическим методом в трех повторностях. В основу разработанного А.П. Рухлядовой колориметрического метода определения активности



(51) МПК

C12P 13/04 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003136412/13, 18.12.2003

(24) Дата начала действия патента: 18.12.2003

(43) Дата публикации заявки: 27.05.2005

(45) Опубликовано: 20.01.2006 Бюл. № 02

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EP 1033407, 06.09.2000. RU 2107723 C1, 27.03.1998. RU 2119536 C1, 27.09.1998.

(66) Номер и дата подачи ранее поданной заявки: 2003106551 12.03.2003

Адрес для переписки:

117279, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 55А, ЗАО
"ФИРМА "ЦЕНТР ПАТЕНТНЫХ УСЛУГ", пат.пов.
Е.А.Харченко

(72) Автор(ы):

Каташкина Жанна Иосифовна (RU),
Лунц Мария Григорьевна (RU),
Дорошенко Вера Георгиевна (RU),
Фомина Светлана Александровна (RU),
Скороходова Александра Юрьевна (RU),
Ивановская Лирина Валерьевна (RU),
Машко Сергей Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

Закрытое акционерное общество "Научно-исследовательский институт "Аджиномото-Генетика" (ЗАО АГРИ) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-АМИНОКИСЛОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИЙ С ОПТИМИЗИРОВАННЫМ УРОВНЕМ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описывается бактерия, принадлежащая к роду *Escherichia*, - продуцент L-аминокислот с оптимизированным уровнем экспрессии гена, влияющего на распределение потоков углерода, такого как ген *sucAB*, включающий стадии введения в хромосому бактерии набора ДНК фрагментов, синтезированных *in vitro* и содержащих регуляторные элементы генной экспрессии, вместо природного элемента регуляторной области гена с

получением популяции бактерий; и селекции бактерии с повышенной продуктивностью L-аминокислот. Также описывается способ получения L-аминокислот, таких как L-глутаминовая кислота, L-пролин, L-аргинин, L-глутамин, L-лейцин, с использованием бактерии с оптимизированным уровнем экспрессии генов *sucAB*. Данное изобретение позволяет получать L-аминокислоты с высокой степенью эффективности. 5 н. и 10 з.п. ф-лы, 1 ил., 2 табл.

выросшей культуры инокулировали Jar-ферментер («Marubishi», Япония). Состав питательной среды для ферментации (общий объем 500 мл) следующий: глюкоза 100 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 г/л; KH_2PO_4 1 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 г/л; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 г/л; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 г/л; L-изолейцин, 0.2 г/л; Матено 0.2 г/л (общий азот); тиамин*HCl 0.0004 г/л; pH 6,7. В

5 ходе ферментации с аэрацией и перемешиванием (900 об/мин) при 35°C pH среды поддерживали добавлением раствора NH_4OH .

Количество L-глутаминовой кислоты и L-пролина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Условия для ВЭЖХ: колонка Luna $\text{C}_{18}(2)$, 150×3 мм, 5U, температура 17°C. Элюент: CH_3CN - 0,8% (v/v), H_3PO_4 0,1% (v/v),

10 KH_2PO_4 - 10 мМ, $\text{n-C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_3\text{Na}$ - 3 мМ. Скорость потока 0.4 мл/мин, объем нанесения 10 мкл. Детекция при 200 нм. Времена удерживания: глутаминовая кислота 9,3; пролин 12,1.

Уровень активности α -кетоглутаратдегидрогеназы в полученных штаммах определяли в соответствии со стандартной методикой (Amarasingham & Davis // J.Biol.Chem. 1965.

240, 3664-3668) после выращивания клеток в условиях, в которых определяли уровень

15 накопления L-глутаминовой кислоты и L-пролина. Данные приведены в Таблице 1.

Как видно из данных, приведенных в Таблице 1, замена природного промотора P_{suc} * более сильным промотором P_{tac} * приводит к повышению до 3-х раз специфической активности α -кетоглутаратдегидрогеназы в клетках нового штамма по

20 сравнению с его предшественником.

В то же время клетки нового штамма частично утратили способность к суперпродукции L-глутаминовой кислоты. И хотя уровень накопления L-пролина новым штаммом по сравнению с немодифицированным штаммом слегка повысился, общая конверсия углерода из глюкозы в аминокислоты семейства L-глутаминовой кислоты (в данном случае

25 L-глутаминовой кислоты и L-пролина) значительно снизилась.

Полученные результаты ясно указывают на тот факт, что использование сильного конститутивного промотора P_{tac} *, содержащего консенсусные области «-10» и «-35», приводит к повышению в 3 раза активности α -кетоглутаратдегидрогеназы и соответственно к снижению способности к продукции L-глутаминовой кислоты. Наблюдалось некоторое

30 повышение скорости роста полученного штамма по сравнению со штаммом, содержащим природный промотор P_{suc} (Таблица 1). Вероятно, это происходит ввиду увеличения потока углерода через цикл трикарбоновых кислот и, следовательно, более высокому уровню синтеза АТФ в этом штамме.

С другой стороны, как было упомянуто в описании предшествующего уровня техники, мутанты, принадлежащие к роду *Escherichia*, - продуценты глутаминовой кислоты, у

35 которых отсутствует или снижена активность α -кетоглутаратдегидрогеназы, не способны к росту или способны расти с низкой скоростью на минимальной среде с глюкозой в аэробных условиях. Для восстановления способности к росту необходимо подавление янтарной кислоты или лизина в комбинации с метионином. Таким образом, необходим

40 подбор оптимального уровня экспрессии α -кетоглутаратдегидрогеназы в бактерии для того, чтобы такая бактерия обладала способностью к продукции глутаминовой кислоты и способностью к росту в питательной среде, не содержащей дополнительных питательных добавок, таких как янтарная кислота, лизин или метионин.

Для получения прототрофного штамма, обладающего высоким уровнем продукции L-глутаминовой кислоты и хорошей скоростью роста, было решено оптимизировать экспрессию генов *sucAB* путем «рандомизации» консенсусной области «-35»

45 промотора P_{tac} * с целью понижения эффективности инициации транскрипции (в сравнении с промотором P_{tac} *) и, как следствие, снижения активности α -кетоглутаратдегидрогеназы и повышения выхода L-глутаминовой кислоты.

50 Пример 3. Получение искусственного регуляторного элемента, содержащего область с последовательностью нуклеотидов случайного состава («рандомизированную» область), и замена природного участка перед генами *sucAB* в хромосоме *E.coli* таким искусственным элементом.