

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології та біофармації

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛЩУК

« 10 » червня 2023 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва рекомбінантного інсуліну людини
середньої тривлості дії. Дільниця виробничого біосинтезу»**

Виконав (-ла):

студент (-ка) IV курсу, групи БТ-92

Бондар Артем Олександрович _____

Керівник:

Асистент кафедри промислової біотехнології та біофармації

Сироїд Олена Олегівна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Доцент кафедри біотехніки та інженерії, к.т.н., доц.

Шибецький Владислав Юрійович _____

Рецензент:

асистент каф. біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, к.т.н.,

Дем'яненко Ірина Володимирівна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент(-ка) _____

Київ – 2023 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП БТ-9202. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	98	
3	A1	ДП БТ-9202. 01.000 ТС	Технологічна схема	2	
4	A1	ДП БТ-9202. 02.000 АС	Апаратурна схема	2	
5	A1	ДП БТ-9202. 03.000 КА	Ферментер	1	

				ДП 9202.00 00		
	ПБ	Підп.	Дата			
Розробн.	Бондар А.О.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Сироїд О.О.				1	98
Консульт.	Шибецький В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПББФ Гр. БТ-92	
Н/контр.						
Зав.каф.	Поліщук В.Ю.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

в.о. завідувача кафедри

_____ Валентина ПОЛЩУК

«19» квітня 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Бондарю Артему Олександровичу

1. Тема проєкту «**Технологія виробництва рекомбінантного інсуліну людини середньої тривалості дії. Дільниця виробничого біосинтезу**», керівник проєкту Сироїд Олена Олегівна, затверджені наказом по університету від «22» травня 2023 р. № 1888-с

2. Термін подання студентом проєкту 19.06.2023 р.

3. Вихідні дані до проєкту: продуцент – *Escherichia coli*, ферментер для промислового культивування - об'єм 0,16 м³; температура культивування – 36 °С, час культивування – 12 год, коефіцієнт заповнення – 0,7, рН – 6,9; кінцевий продукт – рекомбінантний інсулін людини середньої тривалості дії у флаконах та картриджах.

4. Зміст пояснювальної записки: провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання обраного штаму продуценту; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції ферментеру, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки, розробити креслення апарату.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду ферментеру – 1 арк. А1, технологічна схема – 2 арк. А1, апаратурна схема – 2 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибецький В.Ю. доц. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання 19.04.23

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	19.04.23-12.05.23 р.	
2.	Біохімічні основи виробництва	13.05.23-17.05.23 р.	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	18.05.23-21.05.23 р.	
4.	Технологічна частина. Складання технологічної схеми	21.05.23-27.06.23 р.	
5.	Складання апаратурної схеми	28.05.23-29.06.23 р.	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу. Висновки. Вступ	29.05.23-4.06.23 р.	
7.	Оформлення пояснювальної записки	4.06.23р.	
8.	Подання дипломного проєкту на рецензування	31.05.23-05.06.23 р.	
9.	Подання дипломного проєкту та рецензії до екзаменаційної комісії	до 19.06.23 р.	

Студент

Артем БОНДАР

Керівник

Олена СИРОЇД

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва рекомбінантного інсуліну людини
середньої тривлості дії. Дільниця виробничого біосинтезу»

Київ – 2023 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить: 82 с., 16 рис., 5 табл., 58 посилань.

Проект присвячено розробці технології виробництва рекомбінантного людського інсуліну та дільниці виробничого біосинтезу. В якості продуцента обрано штам *Escherichia Coli JM109/pHINS05* та запропоновано схему виробництва інсуліну шляхом культивування продуценту з подальшим руйнуванням клітини, рефолдингом, ферментативним гідролізом, хроматографічною очисткою, кристалізацією та приготуванням суспензії для розливу у флакони та картриджі. Обрано поживне середовище для виробничого культивування на основі гідролізату казеїну, глюкози та екстракту пекарських дріжджів.

Для отримання культуральної рідини було обрано ферментер об'ємом 0,16 м³ з відкритою турбінною мішалкою, наведено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки культивування.

В проекті представлені технологічна та апаратурна схеми виробництва рекомбінантного інсуліну людини. Технологія відповідає санітарно-гігієнічним та екологічним нормам, а також вимогам техніки безпеки та охорони праці.

ESCHERICHIA COLI JM109/PHINS05, E. COLI, РЕКОМБІНАНТНИЙ ІНСУЛІН ЛЮДИНИ, ФАКУЛЬТАТИВНИЙ АНАЕРОБ, ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА, ФЕРМЕНТЕР.

ДП БТ-9202.00 ПЗ

РЕФЕРАТ

Стадія	Аркуш	Аркушів
	6	98
КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Бондар А.О.		
Конс.				
Керівн.		Сироїд О.О.		
Затверд.				

ABSTRACT

The diploma project contains: 81 pages, 16 figures, 5 tables, 58 references, 5 drawings.

The project is devoted to the development of technology for the production of recombinant human insulin and the production biosynthesis department. Escherichia Coli strain JM109/pHINS05 was selected as the producer and a scheme for insulin production by culturing the producer with subsequent cell destruction, refolding, enzymatic hydrolysis, chromatographic purification, crystallization, and preparation of the suspension for bottling in vials and cartridges is proposed. A nutrient medium was selected for commercial cultivation based on casein hydrolyzate, glucose and baker's yeast extract.

A fermenter with a volume of 0.16 m³ with an open turbine stirrer was chosen to obtain the culture liquid, technological, constructive and thermal calculations of cultivation are given.

The project presents technological and hardware schemes for the production of recombinant insulin lyulin. The technology complies with sanitary, hygienic and environmental standards, as well as the requirements of safety and occupational health and safety.

ESCHERICHIA COLI JM109/PHINS05, E. COLI, RECOMBINANT
HUMAN INSULIN, FACULTATIVE ANAEROBE, PRODUCTION
TECHNOLOGY, FERMENTER

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		7

ЗМІСТ

ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	12
1.1. Основні промислові продуценти	12
1.2. Систематичне положення.....	16
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки	16
1.4. Культуральні ознаки	18
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки	19
1.6. Серологічні ознаки.....	20
1.7. Поширення в природі	21
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	22
2.1. Характеристика цільового продукту.....	22
2.2. Схема хімічних перетворень	25
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології	28
2.4. Методи очистки цільового продукту	29
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси	30
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	34
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту	34
3.1.1 Особливості геному, наявність плазмід та/або інших генетичних молекул.....	34
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу	37
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту (відповідно до типових технологій)	37
3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів	37

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Бондар А.О.</i>			<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Конс.</i>					8	98	
<i>Керівн.</i>		<i>Сироїд О.О.</i>			<i>ЗМІСТ</i>		
<i>Затверд.</i>					<i>КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ</i>		

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу.....	38
3.2.3. Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин.....	39
3.2.4. Регуляція метаболізму у мікробній клітині.....	40
3.2.5. Використання методів генної та клітинної інженерії	41
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі	42
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	44
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	44
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	45
4.3. Опис технологічного процесу.....	50
4.4. Матеріальний баланс	60
4.5. Контроль виробництва	65
4.6. Технологічна схема виробництва.....	69
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	70
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	70
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	78
5.2.1. Визначення теплофізичних властивостей середовища	78
5.2.2. Конструктивний розрахунок	78
5.2.3. Тепловий розрахунок	83
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....	88
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	89
ВИСНОВКИ.....	91
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	92

ВСТУП

Основним застосуванням інсуліну є лікування діабету. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) на 2019 рік, близько 463 мільйонів дорослих людей по всьому світу мали діагноз діабету. Очікується що це число зростатиме, і за прогнозами ВООЗ, до 2045 року кількість хворих може збільшитися до 700 мільйонів. В Україні діабет на четвертому місці серед захворювань ендокринної системи у дітей і є найпоширенішою причиною інвалідизації пацієнта внаслідок розвитку серйозних хронічних ускладнень.

Інсулін - це гормон, що виробляється підшлунковою залозою. Він грає ключову роль у регулюванні рівня цукру (глюкози) в крові. Деякі люди мають недостатній виробіток інсуліну або його неефективність, і це призводить до розвитку діабету. В таких випадках може застосовуватися штучний інсулін, який вводиться підшкірно за допомогою інсулінових шприців. Це допомагає контролювати рівень глюкози в крові та уникнути ускладнень, пов'язаних з діабетом, а також для лікування інших захворювань, що пов'язані зі зниженням рівня цукру в крові.

29 січня 1997 року Кабінетом Міністрів України прийнято Постанову № 82 "Про організацію виробництва вітчизняних інсулінів". З цього моменту починається офіційна історія становлення та розвитку "Індару" - єдиного в Україні стратегічно необхідного заводу з повним технологічним циклом виробництва інсуліну. 21 червня 1999 року "Індар" розпочав свою роботу. З кожним роком виробничі потужності збільшувались. Важливим етапом у розвитку компанії стала розробка власної технології виробництва рекомбінантного людського інсуліну. А вже з жовтня 2000 року завод розпочав випуск лікарських засобів під власною торговою маркою: «Хумодар» (інсуліни людини рекомбінантні), «Монодар» (інсуліни свинячі монокомпонентні), а також препарати інших груп – антикоагулянти (гепарин) та гемостатичні лікарські засоби (протаміну сульфат).

ДП БТ-9202.00 ПЗ

ВСТУП

Стадія	Аркуш	Аркушів
	10	98
КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Бондар А.О.		
Конс.				
Керівн.		Сироїд О.О.		
Затверд.				

Крім цього, інсулін постачають закордонні виробники: “Novo Nordisk” (Данія), “Eli Lilly” (Франція), “Sanofi” (Франція).

При використанні мікроорганізмів для виробництва рекомбінантного інсуліну можуть виникати проблеми, такі як низький вихід продукту або небажані білки в продукті. Крім того, складніші форми інсуліну, такі як аналоги інсуліну, можуть бути складнішими у виробництві через їхню складнішу структуру. Закордонні препарати мають високу якість та часто є універсальними, але вони дорогі. Тому виробництво вітчизняного рекомбінантного інсуліну є актуальним з кількох причин: задоволення потреб національного ринку, економічна вигода (знизити витрати на закупівлю інсуліну та забезпечити доступнішу ціну для пацієнтів), незалежність та безпека (власне виробництво забезпечить незалежність від зовнішніх постачальників і ризиків, пов'язаних зі змінами на міжнародному ринку) та розвиток наукових та технологічних потенціалів (оскільки виробництво вимагає високої науково-технологічної компетенції і дослідницького потенціалу).

Метою даного дипломного проєкту є розробка економічно-доцільної технології виробництва рекомбінантного інсуліну людини середньої тривалості дії та розрахунок ферментеру для дільниці біосинтезу.

Для досягнення мети проєкту було поставлено такі завдання:

- обрати та охарактеризувати продуцент для отримання людського рекомбінантного інсуліну;
- описати характеристику цільового продукту та надати огляд схеми виробництва рекомбінантного інсуліну людини;
- проаналізувати методи отримання промислових продуцентів, запропонувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті;
- описати технологічну схему виробництва, надати матеріальний баланс та контроль стадій виробництва, скласти технологічну та апаратурну схеми;
- обґрунтувати вибрану конструкцію для біосинтезу, зробити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		11

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

З початку 1920-х років хворих на цукровий діабет використовували інсуліном, який очищений за свинячої підшлункової залози. Помітний розвиток у галузі генної інженерії стався у 1982 році, коли перший генно-інженерний інсулін людини Humulin з'явився на фармацевтичному ринку. Він вперше був отриманий у промислових умовах американською фармацевтичною компанією Eli Lilly разом з біотехнологічною компанією Genentech (США), використовуючи дві послідовності ДНК, що відповідають ланцюгам А і В людського інсуліну та експресуючи їх у плазмиди для отримання ланцюгів інсуліну. Станом на сьогодні рекомбінантний людський інсулін в основному виробляється з *Escherichia coli* або *Saccharomyces cerevisiae* [1].

E. coli є кращим мікроорганізмом для великомасштабного виробництва рекомбінантних білків. Основні штами, що використовуються при виробництві рекомбінантного білку: *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, *E. coli* K-12, *E. coli* W3110, *E. coli* DH5 α , *E. coli* JM109. Однак кілька недоліків обмежують його використання для виробництва рекомбінантних біофармацевтичних препаратів. Різні посттрансляційні модифікації, такі як глікозилювання, фосфорилювання, протеолітичний процес і утворення дисульфідних зв'язків, які є дуже важливими для біологічної активності, не відбуваються в кишковій паличці. N-зчеплене глікозилювання є найпоширенішою посттрансляційною модифікацією білків у еукаріот [2].

Рекомбінантний людський інсулін був вперше отриманий з *E. coli* компанією Genentech у 1978 році, використовуючи підхід, який вимагав експресії хімічно синтезованої кДНК, що кодує ланцюги інсуліну А та В окремо в *E. coli*.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Бондар А.О.</i>			<i>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Конс.</i>							<i>12</i>	<i>98</i>
<i>Керівн.</i>		<i>Сироїд О.О.</i>				<i>КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ</i>		
<i>Затверд.</i>								

Після незалежної експресії два ланцюги очищаються та спільно інкубуються в оптимальних умовах реакції, які сприяють утворенню інтактного та біоактивного інсуліну шляхом утворення дисульфідного зв'язку. Перший комерційний рекомбінантний інсулін був розроблений для терапевтичного використання у людини за цією дволанцюговою комбінацією [6]. Інший підхід передбачає експресію єдиної хімічно синтезованої кДНК, що кодує людський проінсулін у *E. coli* з наступним очищенням і подальшим видаленням С-пептиду шляхом протеолітичного розщеплення. Цей підхід був більш ефективним і зручним для великомасштабного виробництва терапевтичного інсуліну порівняно з дволанцюговим комбінованим підходом і комерційно використовувався з 1986 року [7]. Компанія Eli Lilly використовувала цю технологію для виробництва Хумуліна, першого рекомбінантного інсуліну, схваленого в 1982 році для лікування хворих на діабет. Ці рекомбінантні інсуліни першого покоління мають амінокислотну послідовність, ідентичну нативному людському інсуліну, і є кращими перед продуктами інсуліну тваринного походження [8].

Щоб уникнути багаторазових ін'єкцій, також були створені аналоги інсуліну тривалої дії з подовженою тривалістю дії. Інсулін Гларгін — один із таких аналогів інсуліну тривалої дії, розроблений компанією Aventis Pharmaceuticals та схвалений регуляторними органами США та ЄС у 2000 році. Інсулін Гларгін був отриманий шляхом заміни С-кінцевого аспарагіну А-ланцюга на залишок гліцину, і С-кінець В-ланцюга був модифікований шляхом додавання двох залишків аргініну. Ці модифікації призвели до підвищення ізоелектричної точки (pI) від 5,4 до нейтральних значень. Гларгін вироблявся у вигляді проінсуліну та експресувався в *E. coli* і був сформований при рН 4 у розчинній формі. Однак після підшкірного введення він випадав в осад через нейтральний рН у підшкірній клітковині. Ресольобілізація інсуліну відбувається повільно, що призводить до більшої тривалості його вивільнення в кров [8].

Дріжджі є кращим господарем для експресії різних гетерологічних білків, які потребують посттрансляційних модифікацій для своєї біологічної активності.

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						13
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Дріжджова клітина має здатність здійснювати численні посттрансляційні модифікації, такі як фосфорилування, О-зв'язане глікозилування, N-зв'язане глікозилування, ацетилювання та ацилювання. Рекombінантні білки експресуються в розчинній формі в дріжджах і правильно згортаються у функціонально активній формі. Виробництво біофармацевтичних препаратів з використанням системи експресії дріжджів також є дуже економічно ефективним і піддається масштабуванню за допомогою великих біореакторів. Однак одна з головних проблем при виробництві терапевтичного глікопротеїну для застосування людиною полягає в тому, що N-глікозилування дріжджів має високий вміст манози, що забезпечує короткий період напіврозпаду *in vivo* та гіперімуногенність, що робить терапевтичний глікопротеїн менш ефективним [9].

Терапевтичні білки, що виробляються в дріжджах, походять саме з *Saccharomyces cerevisiae* і включають гормони (інсулін, аналоги інсуліну, неглікозилований людський гормон росту соматотропін, глюкагон), вакцини (поверхневий антиген вірусу гепатиту В), уратоксидазу з *Aspergillus flavus*, гранулоцитарно-макрофагальну колонію, стимулюючий фактор, альбумін, фактор росту людських тромбоцитів [10]. Подібно до кишкової палички, рекombінантні біофармацевтичні препарати, отримані з дріжджів, переважно призначені для лікування інфекційних захворювань або ендокринних, метаболічних розладів. *Saccharomyces cerevisiae* широко використовується для виробництва рекombінантного людського інсуліну з початку 1980-х років [11], і велика частина рекombінантних комерційних інсулінів виробляється цією системою експресії дріжджів [12]. Для більш ефективної секреції та відповідно експресії рекombінантного проінсуліну в дріжджах, інсулінова структура була побудована так, щоб містити в собі нативний А- і В-ланцюг без С-кінцевого треоніну В30, безпосередньо злитого або пов'язаного через короткий синтетичний С-пептид (як ААК). Послідовність кДНК, що кодує цю конструкцію, була злита з сигнальною послідовністю α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* для секретованої експресії проінсуліну, яка давала вихід до 80 мг/мл інсуліну. Одноланцюговий проінсулін був очищений і перетворений на активний

інсулін за допомогою реакції транспептидації, опосередкованої трипсином, у присутності треонінового ефіру [12]. Інсулін «Аспарт» - ще один швидкодійний аналог інсуліну, що вироблявся в *S. cerevisiae*, розроблений компанією Novo Nordisk і схвалений FDA США в 2001 році для терапевтичного використання на людях. Інсулін «Аспарт» був отриманий шляхом заміни залишку проліну в положенні 28 аспаргіновою кислотою в В-ланцюзі. Така модифікація призвела до збільшення відштовхування заряду між ланцюгами, зниження самоасоціації і власне збільшила швидкість надходження в кров із місця підшкірної ін'єкції [13].

Інсулін «Детемір» — це ще один рекомбінантний аналог інсуліну тривалої дії, комерційно вироблений з *S. cerevisiae*, розроблений компанією Novo Nordisk і схвалений для терапевтичного використання на людях у 2004 році європейськими регуляторними органами. Рекомбінантний «Детемір» було отримано шляхом видалення у положенні 30 В-ланцюга залишку треоніну та ланцюга жирної кислоти С14, що ковалентно приєднаний до залишку лізину в положенні 29 В-ланцюга. Отримані генетичні зміни призвели до зв'язування інсуліну з альбуміном у плазмі, що забезпечило постійне та повільне вивільнення інсуліну і, таким чином, подовження його тривалості дії до 24 годин [14].

Альтернативний штам дріжджів *Pichia pastoris* має здатність досягати високої щільності клітин за допомогою свого міцного метанол-індукованого промотора алкогольоксидази 1 (АОХ1), а прості підходи до розвитку сприяють високій якості та кількості виробництва рекомбінантних білків. У порівнянні з *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* забезпечує велику перевагу в глікозилуванні секретованих білків, оскільки він не гіперглікозилює гетерологічні білки. Обидва штами дріжджів мають більшу частину N-пов'язаного глікозилування типу з високим вмістом манози, але довжина ланцюга олігосахаридів, додана до білків *Pichia* (приблизно 8-14 залишків манози на бічний ланцюг) є набагато коротшим, ніж ті, що експресуються в *Saccharomyces cerevisiae* (приблизно 50-150 залишків манози на бічний ланцюг), що свідчить про те, що глікопротеїни, які виробляються в *Pichia pastoris*, можуть бути більш придатними для терапевтичного використання у людей. Крім того, дуже високий рівень експресії гетерологічних білків може бути досягнутий у

Pichia pastoris, який може становити близько 30% від загального клітинного білка, що є дуже високим показником у порівнянні з *S. cerevisiae* [15]. Тому *Pichia pastoris* може бути привабливою альтернативою для великомасштабного виробництва рекомбінантного інсуліну та аналогів інсуліну.

Виходячи з попереднього, можна дійти висновку, що *Escherichia coli* досі залишається одним із кращих продуцентів для виробництва рекомбінантного інсуліну через свій швидкий ріст, достатньо добре вивчений геном та високу продуктивність із порівняно невисокими затратами.

1.2 Систематичне положення

Таблиця 1.1. Систематичне положення *Escherichia coli*

Царство	Bacteria
Тип	Proteobacteria
Клас	Gamma Proteobacteria
Ряд	Enterobacteriales
Родина	Enterobacteriaceae
Рід	<i>Escherichia</i>
Вид	<i>Escherichia coli</i>

За визначником Берджі *Escherichia coli* відносять до 5-ї групи - факультативно анаеробні грамнегативні палички, підгрупа перша - сімейство Enterobacteriaceae, рід *Escherichia*, вид *Escherichia coli* [16].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Бактерії *Escherichia coli* був відкритий німецьким педіатром Теодором Ешеріхом (1857–1911), який виділив його з калу немовлят у 1885 році. Клітини, як правило, паличкоподібні, з розміром 1-3 мкм × 0,4-0,7 мкм (мікромметр), довжиною близько 1 мкм, шириною 0,35 мкм і об'ємом 0,6-0,7 мкм, рухливі завдяки перитрихальному розташуванню джгутиків, розташовані поодиноці або парами [17].

Кишкова паличка є грамнегативною, її оболонка складається з трьох шарів: цитоплазматичної мембрани, пептидоглікану та зовнішньої мембрани – та зображені на рис 1. Пептидоглікан є жорстким та визначає форму стрижня.

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

При електронно-мікроскопічному дослідженні на поверхні бактеріальної клітини *E. coli* видно як джгутики, так і фімбрії. Джгутики мають діаметр 220-230 А, забезпечені чохлам і хвилеподібно вигнуті. Діаметр фімбрій значно менше (від 35 до 180 А, залежно від типу, пили). Вони позбавлені чохла і не вигнуті. Фімбрії прикріплюються під цитоплазматичною мембраною і тому зберігаються на протопластах. Фімбрії F-типу мають канал діаметром 20-25 А і адсорбують на своїй поверхні фагові частинки [18].

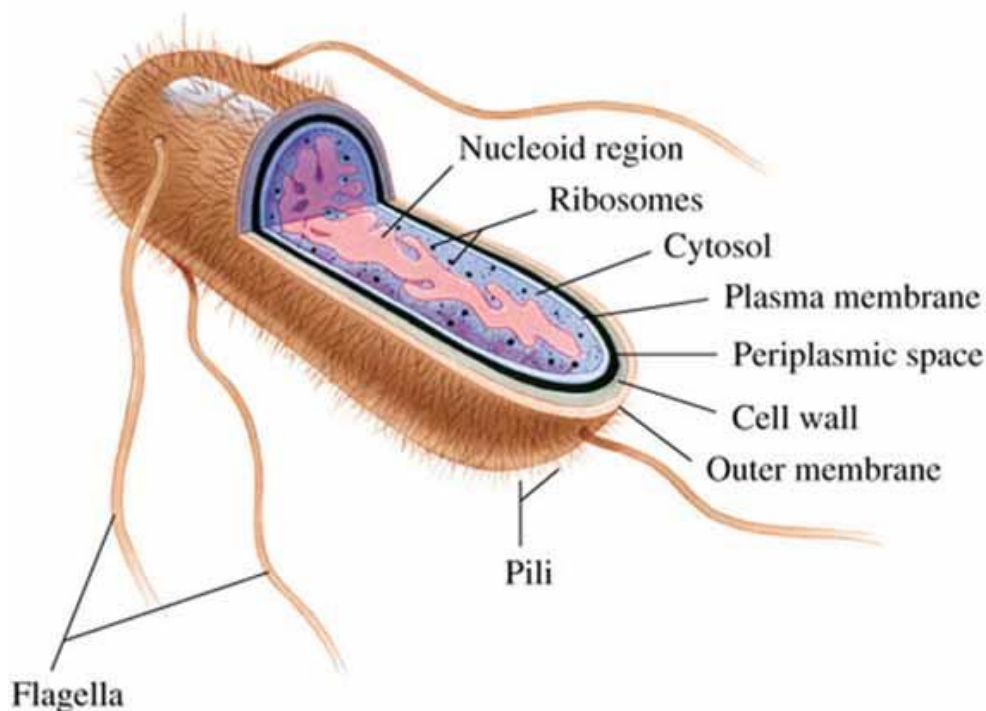


Рис. 1. Будова *E. coli* [67]

У кишкової палички є дві окремі мембрани: зовнішня (ЗМ) і внутрішня мембрана (ВМ). А оболонка визначає форму клітини та дозволяє клітині витримувати великі механічні навантаження, такі як тургорний тиск [19]. Широко поширена думка, що ЗМ може запобігти проникненню гідрофобних сполук і великих гідрофільних молекул та відповідає за внутрішню стійкість *E. coli* до антибіотиків, миючих засобів і барвників. Клітинна стінка тонка, лише з 1 або 2 шарами пептидоглікану. Структурно *E. coli* містить білки ЗМ (Omps), фосфоліпиди, ліпополісахариди (LPS), екзополісахариди (EPS), джгутики та фімбрії типу I на ЗМ з фосфоліпідами в периплазматичному листку та LPS у зовнішньому листку, а також різні Omps, що заселяють це мембрана. OmpC і OmpF є двома найважливішими білками порину ЗМ в *E. coli*, які контролюють

						ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
							17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			

проходження малих молекул розчинених речовин всередину клітини [20].

Нуклеоїд зазвичай чітко відмежований від решти цитоплазми та заповнений фібрилами ДНК діаметром 25-30 А.

Клітини *E. coli* діляться шляхом перетяжки, як і клітини інших грамнегативних бактерій. У початкових стадіях поділу клітини відбувається розгортання нуклеоїду та утворення петлеподібних інвагінатів цитоплазматичної мембрани у місці майбутньої перетяжки [18].

1.4 Культуральні ознаки

Escherichia coli - факультативні анаероби, що добре ростуть на звичайних простих і синтетичних поживних середовищах при температурі від 15 до 46°C. Оптимальна температура для зростання – 37-38°C. Добре ростуть при рН середовища, близькому до нейтральної реакції (7,2-7,4).

На щільних живильних середовищах *E. coli* утворюють круглі опуклі колонії середньої величини, вологі, з гладкою блискучою поверхнею з рівним краєм (S-форма) або плоскі, сухі зі злегка хвилястим краєм і шорсткою поверхнею (R-форма).

У рідких середовищах *E. coli* ростуть у вигляді інтенсивного рівномірного помутніння середовища, утворюючи осад, іноді плівку на поверхні або кільця на стінці пробірки. Осад розбивається при струшуванні, утворюючи гомогенну завесь.

На селективно-диференціальному середовищі Ендо лактозопозитивні штами утворюють колонії малиново-червоного кольору з металевим блиском або без нього та зображені на рис 1.4.1. На агарі Левіна (рис 1.4.2.) (середовище з еозином та метиленовим синім) – колонії темно-зеленого кольору. Бактерії, що не ферментують або уповільнено ферментують лактозу, на середовищі Ендо формують сіруваті колонії, на агарі Левіна - світло-рожеві [18].

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

високих температурах, таких як кипіння. Низькі температури зазвичай призводять до зупинки росту та розвитку, але не завдають негативного впливу на життєздатність бактерій. Високі температури можуть пошкоджувати білки та нуклеїнові кислоти *E. coli*, що призводить до їхньої денатурації та загибелі бактерії. Оптимальна температура для росту та розвитку *E. coli* зазвичай становить близько 37°C. Це відповідає температурі тіла людини та багатьох тварин, де *E. coli* природно мешкає.

За типом живлення є хемоорганогетеротроф. Тобто як джерело енергії – хімічне, донор електронів – органічна речовина, а як джерело вуглецю використовує органічні сполуки [22].

1.6. Серологічні ознаки

Серологічне розрізнення між штамми *E. coli* є важливим інструментом, який використовується для відстеження клінічних ізолятів до їх джерел їжі під час спалахів хвороб харчового походження. Один із серотипів, O157:H7, є можливо, одним із найвідоміших штамів бактерій харчового походження. Історично спроби розробити схему серотипування *E. coli* слідували за спробами створити систему для *Salmonella*. Серотипування базується на трьох основних антигенах, O, K і H, і для кожного з цих антигенів існують розрізняючі серотипи.

Початкову групу антигенів, відкрита вченим Kauffmann, складають 25 O, 55 K і 20 H антигенів. В основі O-антигену лежить полісахаридний фрагмент, який пов'язаний із зовнішньою мембраною. Цей олігосахарид ковалентно зв'язаний з полісахаридом ліпідного A-ядра, а повторювані одиниці визначають різноманіття антигенної групи O. Через надзвичайну неоднорідність п'яти або більше цукрів, що утворюють O-антиген, на сьогодні виявлено більше 170 різних O-груп. Антигени O широко розподілені в ряду інших споріднених мікроорганізмів і, як наслідок, існує перехресна реактивність.

Антигени K також є полісахаридами за своєю природою і є частиною клітинної капсули. Ця група менш складна, і повідомлялося лише про три антигени K – A, B і L. Хоча для інактивації антигену A-типу K потрібна температура 121 C протягом 1 години, B і L інактивуються при 100 C. На відміну

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						20
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

від антигенів О і Н, антиген К не використовується в більшості схем типування. Однак деякі К-антигени іноді використовуються для цілей типування через їх асоціацію з конкретними штамми, що викликають діарею. До них відносяться антигени К88 і К99, які пов'язані з діареєю у свиней. Антиген К99 також пов'язаний з діареєю у телят і ягнят.

Антигени Н є частиною джгутиків і, отже, зустрічаються лише в рухомих штаммах *E. coli*. Більшість *E. coli* є нерухомими або частково рухливими при початковій ізоляції з навколишнього середовища. Як наслідок, типування Н-антигену не є надійним, якщо не вжити зусиль для відбору для відновлення моторики. Збагачення для рухливості і, отже, виробництва Н-антигену може бути досягнуто селективним культивуванням у м'якому агарі. Якщо штам не демонструє рухливість, він позначається як нерухливий, і це використовується як дескриптор для штамів *E. coli*. На сьогоднішній день виявлено понад 50 Н-антигенів [21].

1.7 Поширення в природі

Основним середовищем існування *E. coli* є кишково-шлунковий тракт людей або тварин, вони перебувають в слизу або епітелії на стінці у нижніх відділах кишечника та складають приблизно від 0.1% до 1% бактерій ШКТ. Вона виконує корисні функції, такі як утримання рівноваги мікробіому кишечника та захист від патогенних мікроорганізмів.

У навколишньому середовищі вони в основному знаходяться в забруднених фекаліями середовищах, таких ґрунт (може виконувати роль розкладання органічних сполук та учасника азотного циклу), вода (можуть виконувати роль індикатора забруднення фекаліями та водних систем), поверхні рослин (може виконувати роль транзитного мікроорганізму, який може бути переданий людині через харчові продукти) та людей. Також зустрічаються в середовищах існування за вищих температур. Вони адаптовані до життя у гарячих джерелах, гейзерах, де температури можуть перевищувати 60°C [23].

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика цільового продукту

Інсулін - це пептидний гормон, що виробляється β -клітинами підшлункової залози. Він відповідає за регуляцію переміщення глюкози з крові у клітини та ендокринним шляхом виділяється у кров. Він складається з двох ланцюгів, ланцюга А (21 амінокислота) та ланцюга В (30 амінокислот), що між собою з'єднані атомами сірки, як показано на рис. 2. Власне інсулін утворюється з проінсуліну – молекула прогормону, що складається із 74 амінокислот. Проінсулін відносно неактивний, і за нормальних умов виділяється у невеликих кількостях. В ендоплазматичному ретикулумі β -клітин молекула проінсуліну розривається у двох місцях, утворюючи ланцюги А та В інсуліну і біологічно неактивний пептид С, який є проміжним продуктом. Ланцюги А і В з'єднуються двома дисульфідними зв'язками. Проінсулін, інсулін та С-пептид зберігаються в гранулах у β -клітинах, з яких за відповідної «команди» вони вивільняються в капіляри острівців. Ці капіляри впадають у ворітну вену, яка несе кров із кишечника, шлунку і підшлункової залози до печінки. Підшлункова залоза нормальної дорослої людини містить приблизно 200 одиниць інсуліну, а середня добова секреція інсуліну у кровообігу здорової людини коливається від 30 до 50 ОД.

Молекулярна формула людського інсуліну:



					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Бондар А.О.</i>						22	98
<i>Конс.</i>						<i>КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ</i>		
<i>Керівн.</i>	<i>Сироїд О.О.</i>							
<i>Затверд.</i>								

Для транспортування глюкози в клітини печінки інсулін не потрібен, але він має глибокий вплив на метаболізм глюкози в цих клітинах, оскільки стимулює утворення глікогену, пригнічує глікогеноліз (розпад глікогену) і синтез глюкози з амінокислот і гліцерину (глюконеогенез). Таким чином, загальний ефект інсуліну полягає у збільшенні накопичення глюкози та зменшенні вироблення та вивільнення глюкози у печінці [24].

Початок, пік і тривалість ефекту залежать від препаратів інсуліну. Фармакодинаміка інсуліну відноситься до метаболічного ефекту інсуліну. Комерційно доступні інсуліни поділяються на:

- інсулін швидкої дії;
- інсулін короткої дії;
- інсулін середньої тривалості дії;
- змішаний інсулін;
- інсулін тривалої дії.

Інсулін швидкої дії. Швидкодіючий інсулін починає діяти приблизно через 2,5-20 хвилин після ін'єкції. Він є найбільш дієвим від 1 до 3 годин після введення і може тривати до 5 годин. Цей тип інсуліну діє швидше після прийому їжі, подібно до природного інсуліну організму, зменшуючи ризик низького рівня глюкози в крові (рівень глюкози в крові нижче 4 ммоль/л).

Інсулін короткої дії. Ефект дії з'являється протягом довшого періоду, порівняно з інсулінами швидкої дії. Зниження рівню глюкози в крові починається протягом 30 хвилин після прийому, тому ін'єкцію потрібно робити за 30 хвилин до їжі. Максимальний ефект досягається через 2-5 годин після ін'єкції і триває протягом 6-8 годин.

Інсулін середньої тривалості дії. Інсуліни середньої та тривалої дії часто називають фоновими або базальними інсулінами. Вони починають діяти приблизно через 60–90 хвилин після ін'єкції, досягають піку від 4 до 12 годин і тривають від 16 до 24 годин.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		24

Інсулін тривалої дії. Дані інсуліни повільно та рівномірно вивільняються без явного піку дії. Одна ін'єкція може тривати до 24 годин. Вони прозорі і не потребують змішування перед ін'єкцією.

Змішаний інсулін. Змішаний інсулін містить попередньо змішану комбінацію інсуліну дуже швидкої або короткої дії разом з інсуліном проміжної дії [25].

2.2 Схема хімічних перетворень

Нині виробляється інсулін тваринного та генно-інженерного походження. У першому випадку інсулін виділяють із підшлункової залози тварин із можливим подальшим перетворенням його в інсулін людини, а в другому - отримують у результаті технологічного біосинтезу із клітин рекомбінантних мікроорганізмів.

Інсулін синтезується у β -клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. Ген попередника інсуліну — препроінсуліну — в людини знаходиться в короткому плечі 11 хромосоми та містить 2 інтрони та 3 екзони. Він складається із 110 амінокислот: 24 з них становлять гідрофобну N-кінцеву лідерну послідовність або сигнальний пептид, за якою розташований В-ланцюг, далі — послідовність Арг-Арг, з'єднувальний С-пептид, послідовність Ліз-Арг, та А-ланцюг на С-кінці [31]. Сигнальний пептид потрібен для котрансляційного транспорту препроінсуліну в порожнину шорсткого ендоплазматичного ретикулуму. Далі спеціальною сигнальною пептидазою після проходження через мембрану відщеплюється лідерна послідовність і швидко деградує. Проінсулін, що утворився, містить 86 амінокислотних залишків та не має гормональної активності. Далі утворений проінсулін транспортується до ендоплазматичного ретикулуму, де відбувається його згортання та формування всередині молекули трьох дисульфідних зв'язків, як це показано на рисунку 2.1.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						25
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Перші препарати інсуліну містили лише 1 ОД інсуліну в 1 мл. Пізніше їхню концентрацію було підвищено. Більшість препаратів інсуліну, що використовуються в Україні, містять 40 ОД/1 мл (U-40). Але на ринку також представлені препарати інсуліну, що містять 100 ОД/1 мл (U-100).

Згідно Європейським та Американським фармакопеям, що є Міжнародними фармакопеями, інсулін має наступні характеристики.

Компонентний склад: від 95% людського інсуліну $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ плюс A21-дезамідолюдський інсулін (висушена речовина).

Ефективність: Його ефективність становить NLT 26,5 одиниць інсуліну USP/мг, розрахована на висушену основу; інсулін, позначений як очищений, містить NLT 27,0 одиниць інсуліну USP/мг у розрахунку на суху речовину. 1 одиниця інсуліну USP еквівалентна 0,0342 мг чистого інсуліну, отриманого з яловичини, або 0,0345 мг чистого інсуліну, отриманого зі свинини.

Розчинність: практично нерозчинний у воді та етанолі (96%). Розчиняється в розведених мінеральних кислотах і при розкладанні в розведених розчинах гідроксидів.

Загальна кількість бактерій не повинна перевищувати 300 КУО/г.

Висушування: при висушуванні за температури 105° протягом 16-24 годин втрата не має перевищувати 10% від загальної маси.

Вміст сульфатної золи: максимум 2,5% від сухої речовини.

Вміст цинку: максимум 1,0 % від сухої речовини [29, 30].

Для подовження дії препарату, тобто для отримання інсуліну пролонгованої дії, до звичайного інсуліну додають одну з двох речовин - протамін або цинк. Також в якості дезінфікуючих речовин додають фенол і крезол (обидві речовини мають специфічний запах), метилпарабензоат

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						28
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

(метилпарабен), який не має запаху. Усі дезінфікуючі речовини представлені в складі препаратів інсуліну в концентраціях, що не чинять будь-якої негативної дії [26].

2.4 Методи очистки цільового продукту

Основною антигенною домішкою в препаратах інсуліну є проінсулін, що може спричинити утворення антиінсулінових тіл при лікуванні. Вміст проінсуліну в інсулінових препаратах за сучасними фармакопейними вимогами не має перевищувати 10 частин на мільйон (10 p.p.m або points per million), тобто не має становити більше, ніж 0,001%. Такі ж високі вимоги висуваються і до вмісту бактеріальних пептидів в інсуліні людини, одержуваному методами біотехнології.

Відомий спосіб виділення та очищення інсуліну тваринного походження, який полягає в тому, що розчин інсуліну, отриманий унаслідок перетворення свинячого інсуліну під дією карбоксипептидази Y на інсулін людини, піддають гель-хроматографії на колонці з "Сефадексом G-50 дрібним" і ліофілізують. Після здійснюється аніонообмінна хроматографія на сорбенті "Сефадекс ДЕАЕ А-25" при рН 7,5, елюють інсулін у градієнті концентрації солі, знесолюють на колонці з "Сефадексом G-25", ліофілізують та одержують інсулін людини з чистотою 90-96 %. Даний спосіб не забезпечує достатньо високу чистоту цільового продукту.

Також відомий спосіб виділення та очищення інсуліну. Після ферментативної обробки його генно-інженерного попередника проінсуліну, отриманий розчин інсуліну піддають хроматографії на колонці з іонообмінником, а потім обернено-фазовій (С-8 або С-18) вискоефективній рідкій хроматографії (ВЕРХ) із подальшою гель-хроматографією. Спосіб дає змогу отримувати інсулін високого ступеня чистоти понад 97,5%. Однак здійснення його в промисловому масштабі пов'язане зі значними труднощами, зумовленими застосуванням ВЕРХ не на завершальній стадії та гель-хроматографії, яка не дає змоги використовувати великі навантаження на

одиницю об'єму сорбенту. Окрім того, використання гель-хроматографії після ВЕРХ свідчить про неможливість відділення всіх високомолекулярних домішок за допомогою обернено-фазової ВЕРХ.

Найближчим до пропонованого є спосіб очищення інсуліну за допомогою гель-проникаючої хроматографії на зшитих декстранових гелях у 0,5 М оцтової кислоти (прототип). Після очищення за цим способом інсуліну великої рогатої худоби (в.р.х) з вихідним вмістом інсуліну і проінсуліну відповідно 92,5 і 4,21% отримують інсулін в.р.х., який ще містить 0,44% проінсуліну (замість потрібного вмісту не більше 0,001%). При аналогічній гель-проникаючій хроматографії свинячого інсуліну (вміст у вихідному матеріалі інсуліну та проінсуліну 90,7 та 2,42% відповідно) отримують інсулін, також лише частково очищений від проінсуліну: у цільовому продукті його кількість становить 0,57%, тобто перевищує потрібну дозу в 570 разів.

Для поліпшення якості та забезпечення високого виходу інсуліну за заявленим способом свинячий інсулін, інсулін в.р.х. або біосинтетичний, наприклад, генно-інженерний інсулін людини, піддають гель-проникаючій хроматографії у водній оцтовій кислоті на гідрофільному гелі ("Гефіл-1").

У колону з нейтральним носієм "Гефіл-1", врівноваженим у 0,7-1,2 М оцтової кислоти, вводять розчин інсуліну (із вмістом монофракції інсуліну щонайменше 80%) у 0,7-1,2 М оцтової кислоти з концентрацією інсуліну від 5 до 15% та із загальною кількістю інсуліну від 4,0 до 7,0 г на 1 л врівноваженого гелю. Інсулін елюють 0,7-1,2М розчином оцтової кислоти за швидкості потоку від 2,0 до 5,0 мл (см²-год) за температури 8-15оС. З основної маси елюату відомим способом (шляхом осадження аморфного інсуліну з подальшою цитратною кристалізацією) виділяють високоочищений монокомпонентний інсулін. Чистоту інсуліну, що виділяється, визначають методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), а вміст проінсуліну і бактеріальних пептидів (у разі біосинтетичного, наприклад, генно-інженерного інсуліну людини) методом радіоімунологічного аналізу (RIA).

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						30
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Вихід цільового продукту становить 75-85% із вмістом монофракції інсуліну 98,0-98,5%, водночас вміст проінсуліну становить менш як 2 в.п.м., а вміст бактеріальних пептидів (у біосинтетичному інсуліні людини) - менш як 1 в.п.м. (тобто менш як 0,0001%), кількість дезамідоінсуліну та неідентифікованих домішок у всіх випадках не перевищують 1% (ВЕРХ).

Також існує спосіб виділення та очищення інсуліну, який полягає в тому, що інсуліновмісний розчин хроматографують на катіонообміннику на основі сополімеру метакрилатного мономеру з крос-агентом за рН 4, 5-5,8, елююють білки, що зв'язалися з катіонообмінником, у градієнті солі, фракції, які містять цільовий продукт, знесолюють та хроматографують на аніонообміннику на основі сополімеру метакрилатного мономеру з крос-агентом, що має четвертинні аміногрупи, за рН 9,0-10,5. Це дає змогу отримувати інсулін високого ступеня чистоти (понад 97,5%) [27-28].

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Інсулін – головний анаболічний гормон. Він приймає участь у регуляції метаболізму, транспорті глюкози, амінокислот, іонів, синтез білків; також впливає на процеси реплікації та транскрипції, беручи таким чином участь у регуляції клітинного диференціювання, проліферації та трансформації клітин.

Транспорт глюкози до клітин відбувається за участю спеціальних білків-переносників. Переносник, регульований інсуліном (ГЛЮТ-4), міститься тільки в м'язах та жировій тканині (інсулінзалежні тканини). За відсутності інсуліну ГЛЮТ-4 знаходяться у цитозольних везикулах. Під впливом інсуліну відбувається транслокація везикул до плазматичної мембрани; при зниженні концентрації гормону глікотранспортери повертаються в цитозоль і транспорт глюкози припиняється.

У клітинах печінки інсулін індукує синтез глікокінази. В результаті фосфорилування концентрація вільної глюкози в клітинах підтримується на низькому рівні, що сприяє її транспорту з крові градієнтом концентрації.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

Вплив інсуліну на метаболізм глюкози. Інсулін стимулює утилізацію глюкози у клітинах різними шляхами. Близько 50% глюкози використовується в процесі гліколізу, 30-40% перетворюється на жири і близько 10% накопичується у формі глікогену. Загальний результат стимуляції цих процесів – зниження концентрації глюкози у крові [35].

Вплив інсуліну на метаболізм глюкози здійснюється шляхом підвищення активності та кількості ключових ферментів гліколізу: глюкокінази, піруваткінази, фосфофруктокінази,. У м'язах за допомогою інсуліну активується гексокіназу П. У печінці та м'язах впливом інсуліну знижується концентрація цАМФ внаслідок активації фосфодіестерази. Крім того, інсулін активує фосфатази, які дефосфорилують глікогенсинтазу, через що відбувається активація синтезу глікогену та гальмується його розпад.

Ефекти інсуліну, зумовлені фосфорилуванням та дефосфорилуванням ферментів, проявляються швидко, протягом кількох хвилин. Паралельно з активацією ферментів гліколізу інсулін гальмує глюконеогенез, репресуючи синтез ключового ферменту глюконеогенезу - фосфоенолпіруваткарбоксикінази (ФЕП карбоксикінази).

Вплив інсуліну на метаболізм жирів. У печінці та жировій тканині інсулін стимулює синтез жирів, забезпечуючи отримання для цього процесу необхідних субстратів (ацетил-КоА, α -гліцерофосфат та NADPH) з глюкози. В адипоцитах інсулін активує ацетил КоА-карбок-силазу та ЛП-ліпазу та індукує синтез синтази жирних кислот, ацетил-КоА-карбоксилази та ЛП-ліпази. Інсулін у жировій тканині гальмує мобілізацію жирів. Він активує фосфатазу, яка дефосфорилує та тим самим інактивує гормончутливу ТАГ-ліпазу. Таким чином, внаслідок впливу інсуліну знижується загальна концентрація жирних кислот, які циркулюють у крові. Інсулін стимулює споживання нейтральних амінокислот у м'язах та синтез білків у печінці, м'язах та серці.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		32

Інсулін стимулює проліферацію великої кількості клітин у культурі тканин, а також, ймовірно, може брати участь у регуляції росту *in vivo*. Для вивчення регуляції зростання найчастіше використовують культури фібробластів. У таких клітинах інсулін посилює здатність фактору росту фібробластів (FGF), тромбоцитарного фактору росту (PDGF), фактору росту епідермісу (EGF), простагландину (PGF2 α), вазопресину та аналогів цАМФ активувати розмноження клітин, зупинених у фазі G.

Амінокислоти та секреція інсуліну. Окремі амінокислоти у фізіологічних концентраціях слабо стимулюють секрецію інсуліну. Тим не менш, деякі комбінації амінокислот у фізіологічних або супрафізіологічних концентраціях можуть збільшувати глюкоза-стимульовану секрецію інсуліну. Наприклад, один глутамін не стимулює секрецію інсуліну і не посилює глюкозо-стимульовану секрецію інсуліну на противагу комбінації глутаміну з лейцином. Лейцин може активувати глутаматдегідрогеназу, що перетворює глутамат на α -кетоглутарат. Глутамат, що утворюється з глутаміну, може надходити в ЦТК через α -кетоглутарат, що стимулює продукцію АТФ, тим самим підвищуючи секрецію інсуліну. Глутамін метаболізується в аспатат та ГАМК, які також беруть участь у регуляції секреції інсуліну. Крім того, деякі амінокислоти можуть опосередковано впливати на секрецію інсуліну В-клітинами. Харчові амінокислоти також можуть індукувати секрецію інсуліну, за допомогою інкретин-залежних механізмів. Надходження нутрієнтів у кишечник, у тому числі глюкози та амінокислот, стимулює секрецію GIP та GLP-1 К- та L-клітинами кишечника. Ці гормони потім безпосередньо діють на В-клітини шляхом зв'язування зі специфічними рецепторами на клітинній поверхні, посилюючи глюкоза-індуковану секрецію інсуліну [33].

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						33
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1 Особливості геному, наявність плазмід та/або інших генетичних молекул

E. coli K-12 займає особливе місце у дослідженнях молекулярної біології та мікробіології. Станом на 2006 рік високоточні послідовності доступні для K-12 / MG1655 і K-12 / W3110, штамів, які були розділені з середини 1950-х років. Секвенування продуктів ПЛР вказує на те, що між двома штамами існує лише вісім справжніх відмінностей у вигляді інсерцій/делецій або основ, на додаток до 13 сайтів, де відмінності зумовлені інсерційними послідовностями, дефектними профагами і двома сайтами, зумовленими інверсією W3110 між генами рибосомальної РНК *trnD* і *trnE*. Штами K-12 належать до філогенетичної групи А.

Історично UniProtKB/Swiss-Prot вважали, що F-плазмиду є частиною генетичного складу штаму K-12/MG1655, тоді як насправді F-плазмиду було втрачено у штамі-попереднику після обробки ультрафіолетом та пасажу на кров'яному агарі. Таким чином, ми видалили F-плазмиду з цього геному. Однак її можна знайти за допомогою пошуку в UniProtKB за номером доступу AP001918. На рис. 3.1 показана кільцева карта геному *Escherichia coli* K-12/MG1655 [36].

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Бондар А.О.</i>			<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Конс.</i>						34	98
<i>Керівн.</i>		<i>Сироїд О.О.</i>			<i>КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ</i>		
<i>Затверд.</i>							

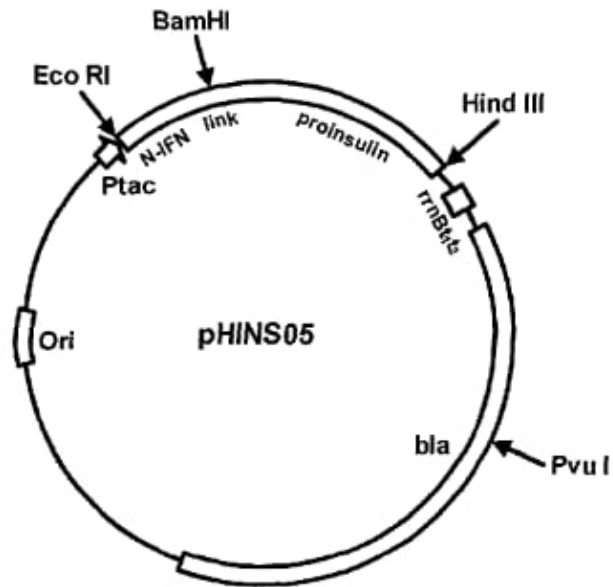


Рисунок 3.2 – Схема рекомбінантної плазмиди [37]

Таблиця 3.1 – Характеристика рекомбінантної плазмідної ДНК

Характеристика	Показники
Молекулярна маса	2,75 МДа
Шлях кодування	гібридний білок із молекулярною масою близько 14,5 кДа, N-кінцевий фрагмент гамма-інтерферону людини з'єднаний через пептидний лінкер His4GlySerArg з амінокислотною послідовністю проінсуліну людини
Складові частини	- Фрагмента плазмиди рКК223-3 - BamHI-EcoRI; - Фрагмент плазмиди рКК223-3 - HindIII-EheI; - Ділянка ініціації реплікації (ori) ; - Термінатор транскрипції рибосомного оперону <i>E. coli</i> ; - фрагмент EcoRI-HindIII
Містить частини	- tac-промотор транскрипції; - ген кодування гібридного білка; - генетичний маркер ген β -лактамази (bla);
Унікальні сайти	EcoRI - 1, BamHI - 147, HindIII - 418, Pvu I - 1352

3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.

Інсулін, що секретується, складається з 51 амінокислоти з молекулярною масою 5,8 кДа. Однак ген інсуліну кодує 110-амінокислотний попередник, відомий як преінсулін. Як і інші секретовані білки, преінсулін містить гідрофобний N-кінцевий сигнальний пептид, який взаємодіє з цитозольними рибонуклеопротеїновими частинками розпізнавання сигналу (SRP) [48]. SRP полегшує транслокацію препроінсуліну через мембрану шорсткого ендоплазматичного ретикулуму (rER) в просвіт. Цей процес відбувається через пептид-провідний канал, де сигнальний пептид преінсуліну відщеплюється сигнальною пептидазою з утворенням проінсуліну. Потім проінсулін зазнає згортання та утворення трьох дисульфідних зв'язків, процес, що вимагає участі різноманітних білків-шаперонів ендоплазматичного ретикулуму (ER), таких як протеїн-тіол-редуктаза. Після дозрівання тривимірної конформації згорнутий проінсулін транспортується з ER до апарату Гольджі, де проінсулін потрапляє в незрілі секреторні везикули і розщеплюється з утворенням інсуліну та C-пептиду. Інсулін і C-пептид потім зберігаються в цих секреторних гранулах разом з острівцевим амیلіодним поліпептидом (IAPP або аміліном) та іншими менш поширеними продуктами секреції β -клітин [49].

Хоча біосинтез інсуліну контролюється багатьма факторами, метаболізм глюкози є найважливішою фізіологічною подією, яка стимулює транскрипцію гена інсуліну та трансляцію мРНК [50].

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту (відповідно до типових технологій)

3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів.

Кишкова паличка швидко росте на мінімальному середовищі, яке містить сполуки вуглецю, такі як глюкоза (яка слугує як джерелом вуглецю, так і джерелом енергії), а також солі, які постачають азот, фосфор і мікроелементи. Однак *E. coli* швидше росте на багатому середовищі, яке забезпечує клітини

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

амінокислотами, попередниками нуклеотидів, вітамінами та іншими метаболітами, які клітинам довелося б синтезувати в іншому випадку.

При вирощуванні кишкової палички в рідкій культурі невелику кількість клітин спочатку пересівають в об'єм стерильного середовища. Через певний проміжок часу, який називається лаг-періодом, бактерії починають ділитися. У багатому середовищі культура типового штаму подвоюється кожні 20 або 30 хвилин. Ця фаза експоненціального росту клітин у культурі називається лог-фазою (іноді її поділяють на ранню, середню та пізню лог-фази). Зрештою, щільність клітин збільшується до точки, в якій поживні речовини або кисень вичерпуються з середовища, або в якій продукти життєдіяльності клітин (наприклад, кислоти) накопичуються до концентрації, що пригнічує швидкий ріст. У цей момент, який у звичайних лабораторних умовах настає, коли культура досягає щільності $1-2 \times 10^9$ клітин/мл, клітини припиняють швидко ділитися. Ця фаза називається насиченням, а культура, яка щойно досягла цієї щільності, вважається свіжонасиченою [42]. Отримана культура зберігається або направляється до виробничого культивування.

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу

SOS-відповідь - це глобальна реакція на пошкодження ДНК, при якій зупиняється клітинний цикл та індукується репарація ДНК і мутагенез. /

SOS-відповідь бактерії *E. coli* охоплює багато білків, які беруть участь у виявленні та відновленні ДНК, пошкодженої різними агентами, такими як ультрафіолетове випромінювання або хімічні речовини, такі як мітоміцин та блеоміцин [36]. Складна регуляторна мережа, що включає як транскрипційні, так і посттрансляційні регулятори, контролює концентрацію та рівень активності цих білків

Ультрафіолетове світло пошкоджує ДНК клітин, що перешкоджає її копіюванню, а отже, і поділу. Бактерії реагують на таке пошкодження, виробляючи низку білків, які допомагають виявити, обійти та відновити пошкодження. Ця система SOS-відповіді демонструє складну динамічну поведінку - зокрема, жорстко регульоване ввімкнення та вимкнення схильних до

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

помилки полімераз, що призводить до мутагенезу, і загадкове відновлення активності гена SOS через 30-40 хвилин після опромінення.

Послідовність подій, що викликаються УФ-опроміненням *E. coli* відбувається наступним чином: УФ-випромінювання пошкоджує ДНК, створюючи пошкодження, які механічно порушують процес дуплікації ДНК, зупиняючи ДНК-полімеразу (Pol III) в рухомій реплікаційній вилці. Це призводить до утворення одноланцюгових розривів ДНК (ssDNA). Ці розриви покриваються білком RecA, утворюючи довгі нуклеопротеїнові нитки, в яких він набуває своєї активної форми - RecA*. RecA* разом з іншими білками бере участь у немутагенному заповненні розривів іРНК шляхом гомологічної рекомбінації, а також каталізує розщеплення транскрипційного репресора LexA та білка UmuD, розщеплена форма якого - UmuD' - необхідна для мутагенезу. Зниження рівня транскрипційного фактора LexA внаслідок його розщеплення призводить до дерепресії регуляру, що бере участь у SOS-відповіді. До складу цього регуляру входить близько 30 генів, зокрема ті, що кодують білки мутагенезу UmuD і UmuC, RecA і власне LexA. Також частиною SOS-регулятора є гени, що кодують UvrA, B, C - групу білків нуклеотидної ексцизійної репарації (NER), які локалізують та вирізають пошкоджені ділянки з ДНК [43].

Мутагенез в УФ-опроміненних клітинах *E. coli* в основному є прямим результатом активності схильної до помилок ДНК-полімерази Pol V [44]. Pol V складається з двох одиниць UmuD' та однієї одиниці UmuC. Він вставляє кілька випадкових пар основ у ланцюг ДНК безпосередньо навпроти пошкодження, допомагаючи таким чином реплікаційній вилці швидко оминати пошкодження, після чого Pol III може перехопити ініціативу і продовжити реплікацію. Окрема скоординована підмережа білків, зосереджена на UmuD і UmuC, контролює кількість, а отже, і активність Pol V [44].

3.2.3 Використання гібридизації для створення промислових продуцентів біологічно-активних речовин

Рекомбінантну плазмиду pHINS21 конструюють на основі відомої плазмиди pHINS05 [44]. ДНК плазмиди pHINS05 піддають повному гідролізу рестриктазами BclI та HpaI, а отриманий фрагмент BclI-HpaI (4,2 т.п.о.) лігують

з олігонуклеотидним дуплексом, отриманим внаслідок утворення синтетичних олігонуклеотидів. У результаті в ген гібридного білка перед ДНК проінсуліну людини вбудовують нуклеотидну послідовність, що кодує сайт розщеплення ентерокинази, а саме пептидний фрагмент (Asp)⁴ Lys.

Лігована суміш використовується для трансформації компетентних клітин *E.coli JM109*. У результаті отримують рекомбінантну плазмиду рHINS20, будову якої підтверджували рестрикційним аналізом. Структуру гена, що кодує гібридний білок, підтверджують секвенуванням. Для збільшення числа копій отриману плазмиду рHINS20 у бактеріальній клітині делетують за гор-геном (негативним регулятором копійності). З цією метою ДНК плазмиди рHINS20 піддають повному гідролізу рестриктазами Eco47III і SnaI, а отриманий фрагмент Eco47III-SnaI (3,6 т.п.о.) лігують. У результаті отримують рекомбінантну плазмиду рHINS21, будову якої підтверджували рестрикційним аналізом і секвенуванням [45].

3.2.4 Регуляція метаболізму у мікробній клітині

Вуглецевий та азотний метаболізм пов'язані між собою енергетичним обміном. Гліколітичний потік в *E. coli* контролюється потребою в АТФ. Відомо, що білок РІІ контролює асиміляцію азоту, діючи як сенсор енергетичного заряду аденілату, який є мірою енергії, доступної для метаболізму. Для передачі сигналу необхідне зв'язування АТФ з РІІ, яке є синергічним зі зв'язуванням α -КГ. Крім того, α -КГ слугує клітинним сигналом вуглецевого та азотного статусу і сильно регулює функції РІІ [46]. Очевидно, що регуляторний механізм цього перетворення є критично важливим для взаємозалежності засвоєння вуглецю та азоту.

Зі збільшенням співвідношення С/Н рівень транскрипту генів *срр* та *mlc* знижувався, що призводило до збільшення рівня транскрипту гена *pts G*. На фоні зниження рівня транскрипту гена *сга*, рівень транскрипту таких генів, як *ptsH*, *pfkA* та *рукF*, зростає зі збільшенням співвідношення С/Н. Це відповідає зростанню питомої швидкості споживання глюкози при збільшенні співвідношення С/Н. Крім того, гени дихального ланцюга, такі як *суоA*, *судB* і *ndh*, а також гени циклу ТХА, такі як *gltA*, *icdA*, *fumC*, *sdhC* і *mdh*, показали

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						40
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

збільшення експресії при збільшенні співвідношення С/Н, що відповідає збільшенню питомої швидкості продукування CO₂. Частково це може бути пов'язано з накопиченням α-КГ, спричиненим зниженням активності ГДГ [47].

3.2.5 Використання методів генної та клітинної інженерії

E. coli є найкращим мікроорганізмом для великомасштабного виробництва рекомбінантних білків. Однак, деякі недоліки обмежують її використання для виробництва рекомбінантних біофармацевтичних препаратів. Різноманітні посттрансляційні модифікації (ПТМ), такі як глікозилювання, фосфорилування, протеолітична обробка та утворення дисульфідних зв'язків, які є дуже важливими для біологічної активності, не відбуваються в *E. coli* [38]. N-зв'язане глікозилювання є найпоширенішою посттрансляційною модифікацією білків в еукаріотів.

Використання кодону гетерологічного білка відіграє важливу роль у визначенні рівня експресії рекомбінантного білка. Якщо використання кодонів у гетерологічному білку значно відрізняється від середнього використання кодонів у *E. coli*, це може призвести до дуже низького рівня експресії. Зазвичай, частота використання кодонів відображає поширеність відповідної тРНК. Тому значні відмінності у використанні кодонів можуть призвести до передчасного завершення трансляції, неправильного вбудовування амінокислот та інгібування синтезу білка [4]. Експресію гетерологічних білків в *E. coli* можна покращити, замінивши кодони, які рідко зустрічаються у високоекспресивних генах *E. coli*, на більш сприятливі мажорні кодони.

Аналогічно, коекспресія генів, що кодуєть ряд тРНК для рідкісних кодонів, може підвищити експресію гетерологічних білків в *E. coli*. Існує декілька комерційних штамів *E. coli*, які кодуєть тРНК для рідкісних кодонів, таких як BL21 (DE3) CodonPlus-RIL, BL21 (DE3) CodonPlus-RP (Stratagene, США) і Rosetta (DE3). BL21 (DE3) CodonPlus-RIL містить гени тРНК для рідкісних кодонів, таких як AGG, AGA (аргінін), AUA (ізолейцин) і CUA (лейцин). Аналогічно, штам Rosetta (DE3) містить гени тРНК для рідкісних кодонів, таких як AGG, AGA (аргінін), CGG (аргінін), AUA (ізолейцин), CUA (лейцин), CCC (пролін) і GGA (гліцин). Ці рідкісні кодони асоціюються з

низькою експресією білків в *E. coli*, тому застосування цих генно-інженерних штамів *E. coli* може підвищити рівень експресії гетерологічних білків і, таким чином, призвести до вищого виходу бажаного білка [5].

Використання протеазно-дефіцитних штамів *E. coli*, які несуть мутації, що усувають вироблення протеаз, також може підвищити вихід рекомбінантного білка за рахунок зменшення протеолітичної деградації.

У *E. coli* складні та великі терапевтичні білки можуть секретуватися в периплазмі, оскільки вона забезпечує окислювальне середовище і сприяє утворенню дисульфідних зв'язків, які полегшують правильне згортання рекомбінантних білків і, ймовірно, дають надійний N-кінець експресованого білка [39]. Периплазма має переваги перед цитоплазмою в меншій концентрації білка і протеолітичній активності, підвищенні титру продукції та покращенні розчинності рекомбінантного білка. В цілому, ці вдосконалені модифікації та розробки полегшують процес виробництва цільових білків, прискорюючи тим самим розробку ліків [40].

Гетерологічні білки зазвичай накопичуються в *E. coli* у вигляді тілець включення, які складаються з нерозчинних неправильно згорнутих агрегатів білків. Використання молекулярних шаперонів може підвищити розчинність білка та сприяти правильному згортанню рекомбінантного білка. Найважливішими шаперонами в *E. coli* є GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE та тригерний фактор. Ці шаперони можуть використовуватися окремо або в комбінації для підвищення розчинності білків в *E. coli* [41].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Схему отримання продуцента інсуліну *E. coli* штаму JM109/pHINS05 на рис. 3.3 [45].

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						42
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

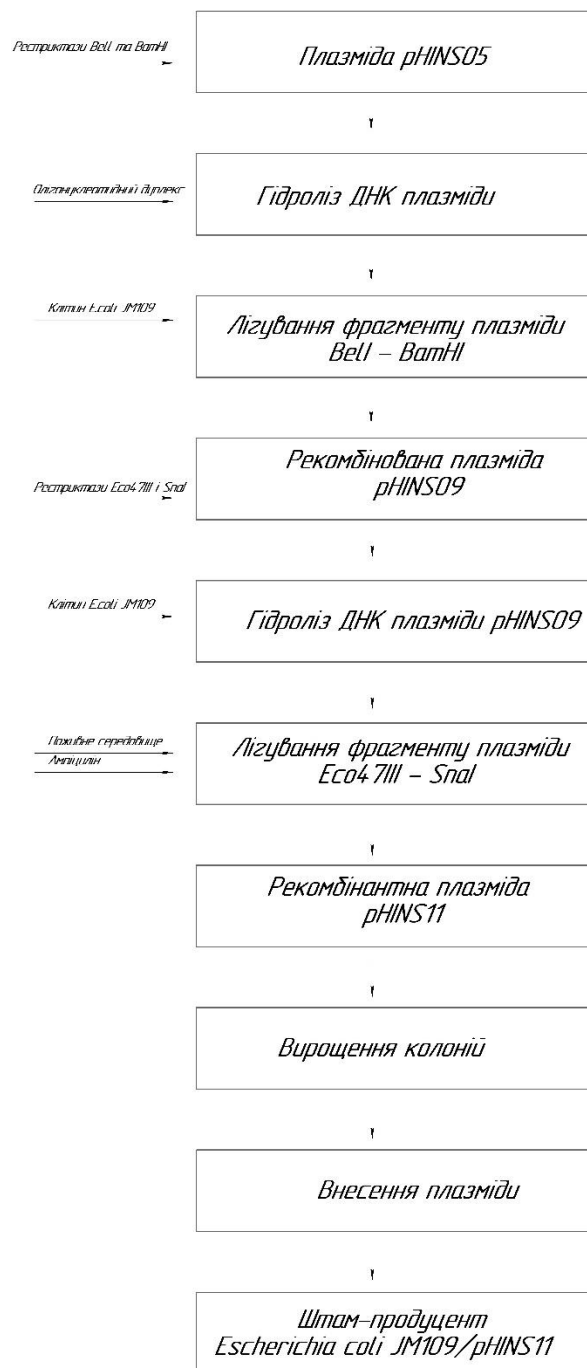


Рисунок 3.3 - Схема отримання продуцента iнсуліну *E.coli* штаму JM109/pHINS05 [45]

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Пiдпис	Дата		43

РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Інсулін людини (Insulin human) Хумодар Б 100Р

Фармакотерапевтична група: А10А С01 - протидіабетичний засіб.

Інсуліни та його аналоги середньої тривалості дії.

Лікарська форма. Суспензія для ін'єкцій.

Компонентний склад:

основна діюча речовина: в 1 мл суспензії для ін'єкцій міститься 100 МО рекомбінантного інсуліну людини (100 % кристалічного протамін-інсуліну);

допоміжні речовини: протаміну сульфат, крезол, концентрована НСІ, фенол, NaOH, натрію дигідрофосфату дигідрат, хлориди натрію, цинку, гліцерин, вода для ін'єкцій [51].

Основні фізико-хімічні властивості: суспензія білого або майже білого кольору.

Основна фармакотерапевтична дія та ефекти ЛЗ: препарат людського інсуліну середньої тривалості дії, який отримано за технологією рекомбінантної ДНК; даний лікарський засіб регулює вуглеводний обмін у тканинах, викликає цукрознижуючий ефект, впливає на активний транспорт вуглеводів і амінокислот та прискорює його у внутрішньоклітинний простір, активує синтез глікогену, має здатність пригнічувати ліполіз, а також стимулює синтез РНК та інших білків; сприяє підвищенню проникності калію до клітин із навколоклітинного простору, що викликає зниження ступеня діастолічної деполаризації міокарда (виникає при кардіопатіях і як побічний ефект при дії дигіталісу, глюкокортикоїдів та катехоламінів).

Фармакодинаміка, фармакокінетика, біоеквівалентність для аналогів: ефект з'являється через 1,5 - 2,5 год після введення; максимум терапевтичної дії спостерігається між 4 та 16 год після ін'єкції.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Бондар А.О.</i>			<i>РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Конс.</i>							<i>44</i>	<i>98</i>
<i>Керівн.</i>		<i>Сироїд О.О.</i>				<i>КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ</i>		
<i>Затверд.</i>								

Терапевтична концентрація підтримується протягом 18 - 24 год; активність лікарського засобу може відрізнятись, на це впливають наступні фактори: місця введення ін'єкції, величина введеної дози, фізична активність пацієнта, температура навколишнього середовища.

Показання до застосування: цукровий діабет 1-го або 2-го типу за умов недостатньо ефективної дієти, більшої за норму або надмірної маса тіла; також інсулінотерапію не проводять, якщо добова доза виробленого інсуліну в організмі становить до 36–40 ОД.

Термін придатності: 3 роки.

Умови зберігання: необхідно зберігати при температурі 2-8 °С. Не допускати заморожування. Термін придатності має бути вказаний на упаковці.

Упаковка: Суспензія для ін'єкцій, 100 МО/мл, по 3 мл у картриджах № 3, № 5 або по 5 мл у флаконах № 1, № 5, по 10 мл у флаконах № 1 [55].

Пакування та маркування:

Упаковка, у якій відвантажується товар, та умови транспортування повинні відповідати характеру товару, забезпечувати цілісність товару, збереження його якості під час перевезення від місця відвантаження до місця поставки товару.

Маркування повинно бути виконано у відповідності з діючими нормативними документами з обов'язковою інформацією на зрозумілій споживачеві мові (українська/російська).

Кожна вторинна упаковка повинна мати інструкцію державною мовою, затверджену в установленому порядку

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів наведена у таблиці 4.1.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		45

Таблиця 4.1 – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
1.1 Ампіцилінова натрієва сіль	ГОСТ 939881	-	Компонент поживного середовища
1.2.Ацетат натрію	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 470	Згідно вимогам	Компонент для приготування буферу
1.1. Вода очищена	ДСТУ 7525:2014	Відповідно до вимог	Компонент поживного середовища
1.2.Вода для ін'єкцій	ДСТУ 7525:2014	Відповідно до вимог	Складова кінцевого продукту
1.3. Вода технічна	ДСТУ 7525:2014	Відповідно до вимог	Обігрів та охолодження ферментера
1.4. Гідролізат казеїну	ГОСТ 935725	Чистота речовини	Компонент поживного середовища
1.5. Гліцерин	ГОСТ 6259-75	Стерильність	супресор агрегації на етапі рефолдингу
1.6. Гліцин	ГОСТ 6038-79	Масова частка $\geq 99\%$	супресор агрегації на етапі рефолдингу

Продовження таблиці 4.1

1.7. Глюкоза	ДСТУ 4464:2005	Усі показники відповідно до вимог ГОСТ	Компонент поживного середовища
1.10 ЕДТА	1233009 USP Edetate disodium	втрата маси при висушуванні не більше 11,4%, рН 5±1	Компонент для приготування буферу
1.8. Екстракт пекарських дріжджів	ГОСТ 10444.1	Мікробіологічна чистота	Компонент поживного середовища
1.9. ІПГТ	Кат. № 209670	-	Індуктор біосинтезу
1.10. Карбоксипептидаза Б	Кат. № 470524	-	Використовується для ферментативного гідролізу
1.11. Натрій гідроксид, каустична сода	ГОСТ 4328-77	Масова частка ≥99,5%	Регулятор рН, миючий розчин
1.12. Пептон	ГОСТ 13805-76	Масова частка ≥70%	Компонент поживного середовища
1.13. Повітря очищене	ГОСТ Р ИСО 8573-1-2016	Кількість КУО ≤10 ⁻⁶ кл/м ³	Аерація ферментеру
1.14. Сечовина	ГОСТ 2081-10	Масова частка азоту ≥46,3%	Буфер для руйнування клітин
1.15. Соляна кислота	ГОСТ 3118-77	Масова частка ≥35%	Регулятор рН
1.16. Сульфат магнію	ГОСТ 4523-77	Масова частка ≥99,5%	Компонент поживного середовища

Продовження таблиці 4.1

1.17. Трипсин	ГОСТ 935855	-	Використовується для ферментативного гідролізу
1.18. Фосфат калію двозаміщений	ГОСТ 2493-75	Масова частка $\geq 99\%$	Компонент поживного середовища
1.19. Фосфат калію однозаміщений	ГОСТ 4198-75	Масова частка $\geq 99,5\%$	Компонент поживного середовища
1.20. Хлорид натрію	ГОСТ 4233-77	Масова частка $\geq 99,9\%$	Компонент поживного середовища
1.21. Tris (трис(гідроксиметил)амінометан)	Кат. №ВТ101	-	Компонент буферу для руйнування клітини
1.22. Tris HCl (оксиметил)-амінометан гідрохлорид	Кат. ТУ 6-09-2477-78	-	Компонент для буферу
2. Допоміжна сировина:			
2.1. Ацетат амонію	ГОСТ 3117-78	Масова частка $\geq 98,5\%$	Компонент для приготування буферу
2.2. Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Запах смакові якості, рН, наявність домішок, жорсткість	Для підготовки миючих, дезінфікуючих та робочих розчинів; для приготування рідких компонентів поживних середовищ; для миття приміщення
2.3. Кислота лимонна	ГОСТ 908:2006	Масова частка $\geq 99,5\%$	Компонент для приготування буферу

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9202.00 ПЗ

Арк.

48

Продовження таблиці 4.1

2.4. 2-Пропанол	Кат.№ 109634	-	Компонент для приготування буферу
2.5. Хлорамін Б	ГОСТ 14193- 78	Відповідно до вимог	Для миття приміщення, обладнання
3. Матеріали:			
3.1. Губки	ГОСТ Р 50962- 96	Зовнішній вигляд, цілісність	Для миття обладнання, лабораторного посуду
3.2. Етикетки	ТУ 9571-002- 14350732-2006	Зовнішній вигляд	Маркування готової продукції
3.3. Картриджі	ГОСТ ISO 8537- 2011	Зовнішній вигляд, цілісність	Первинна упаковка продукту
3.4. Ковпачки	ГОСТ 19324-80	Зовнішній вигляд, цілісність	Закупорювання для картриджів
3.5. Колби	ГОСТ 1770-74	Відповідно до вимог	Для вирощування музейної культури
3.6. Коробки	ГОСТ 9142-90	Цілісність	Для пакування продукту
3.7. Мікробіологічні петлі	ГОСТ 29169-91	Відповідно до вимог	Для вирощування музейної культури
3.8. Рукавиці гумові	ГОСТ 20010-93	Зовнішній вигляд, цілісність	Екіпірування персоналу
3.9. Пробірки	ГОСТ 1770-74	Відповідно до вимог	Для вирощування музейної культури
3.10. Пробки	ГОСТ 7851-74	Відповідно до вимог	Закупорювання для пробірок

Кінець таблиці 4.1

3.11. Спеціальний одяг	ГОСТ 12.4.280-2014	Зовнішній вигляд, цілісність	Екіпірування персоналу
3.12. Флакони	ГОСТ Р 53416-2009	Відповідно до вимог	Первинна упаковка продукту
3.13. Чашки Петрі	ГОСТ 23932-90	Відповідно до вимог	Лабораторний посуд

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу включає періодичне медичне обстеження, професійну гігієнічну підготовку, навчання та атестацію персоналу. Працівники на виробництві повинні бути повністю ознайомлені із технікою безпеки, виробничим процесом, та повинні пройти санітарний інструктаж. Медичне обстеження персоналу проводять 1 раз на рік.

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих та миючих розчинів

Цей підрозділ включає наступні етапи: підготовка розчинів хлораміну Б та каустичної соди.

ДР 1.2.1. Підготовка розчину хлораміну Б

Порошок хлораміну Б з концентрацією 25-29% розчиняють у реакторі змішувачі до концентрації 3% протягом 10 хв. Готовий розчин хлораміну Б направляють до ДР 1.3, ДР 2.2.

ДР 1.2.2. Підготовка розчину каустичної соди

Готують розчин 1% лугу. Для цього NaOH та вода питна подаються у реактор-змішувач та перемішують протягом 10 хв. Вода подається по магістральному трубопроводу. Готовий розчин каустичної соди направляють до ДР 1.3, ДР 2.1.

Дезінфікуючі та миючі розчини використовують при щоденному та генеральному прибиранні та для миття обладнання і комунікацій.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						50
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Перед початком кожної зміни здійснюється щоденне прибирання, яке включає в себе такі стадії: обробка та витирання робочих поверхонь, зон штуцерів та отворів, миття підлоги, потім висушують або витирають насухо та проводять дезоброблення. Відпрацьовані розчини направляються на етап ЗВ24.

Після закінчення прибирання проводиться мікробіологічний контроль (аналіз змиву з поверхонь, аналіз кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) в повітрі). Кількість КУО/м³ повітря повинна відповідати класам А, В, С і D чистоти приміщень не більше 1, 10, 100 і 200 відповідно. При невідповідності умовам збільшують концентрацію дезінфікуючого розчину.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання здійснюється раз на 5-6 днів або за вимогою мікробіолога та включає в себе миття стін, стелі, дверей, меблів, важкодоступні місця та ін. Для генерального прибирання використовують миючі та дезінфікуючі розчини з ДР 1.2.1 та ДР 1.2.2. Відпрацьовані розчини направляються на ЗВ24.

Після закінчення прибирання проводиться мікробіологічний контроль (контроль чистоти змиву поверхонь, контроль кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) в повітрі). Кількість КУО/м³ повітря повинна відповідати класам А, В, С і D чистоти приміщень не більше 1, 10, 100 і 200 відповідно. При невідповідності умовам збільшують концентрацію дезінфікуючого розчину.

ДР 1.4. Підготовка обладнання і комунікацій

ДР 1.4.1. Миття обладнання та комунікацій

Використовуючи готовий розчин з ДР 1.2.2, обладнання та комунікації занурюють у цей розчин та постійно перемішують протягом 30 хв за температури 50°C. Рідкі відходи направляють до збірника нейтралізації.

ДР 1.4.2. Дезінфекція обладнання та комунікацій

Обробка внутрішніх поверхонь здійснюється готовим розчином хлораміну Б з ДР 1.2.1. Рідкі відходи направляють до збірника нейтралізації

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		51

ДР 1.4.3. Ополіскування обладнання та комунікацій

Після обробки дезінфікуючими розчинами, обладнання промивають питною водою з температурою близько 50°C протягом 10 хв. Рідкі відходи направляють до збірника нейтралізації.

ДР 1.4.4. Стерилізація обладнання і комунікацій

Стерилізація обладнання і комунікацій відбувається гострою насиченою водяною парою (тиск $0,25 \pm 0,05$ МПа, температура 124 ± 4 °C) протягом 1 години, Ефективність стерилізації характеризується коефіцієнтом стерилізуючої дії, який знаходиться в межах 90-560.

ДР 1.4.5. Перевірка на герметичність

Під час цього етапу відбувається перевірка готовності апаратів та фільтрів до роботи: огляд торцевих ущільнень, вентилів тощо. Перевірка герметичності обладнання проводиться наступним чином: закриваються всі ущільнення та вентиля та під тиском 0,2 МПа в обладнання нагнітається повітря. Протягом наступних 30 хв відстежують покази манометра. Якщо покази залишаються сталими, тоді обладнання герметичне та готове до використання.

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1. Забір повітря з атмосфери

Забір повітря з атмосфери проводять за допомогою трубчастих конструкцій з робочою висотою 8-10 м. Висота труби – 10 м, радіус труби 150 мм. Розташування труби обирають в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю. Очищення починається вже при заборі повітря. Повітря проходить через решітку, встановлену у повітропроводі, яка затримує крупні механічні частки – пух, гілки дерев, опале листя і т.п.

ДР 2.2. Попереднє очищення від механічних часток

Попереднє очищення повітря від механічних часток розміром більше 5 мкм очищають методом інерційного осадження. Фільтр містить від 10 до 15 шарів сітки або перфорованих листів з вініпласту чи металу. Ефективність очищення повітря з такими фільтрами складає 70-85%, продуктивність 0,43-0,610 м³/с, пилоємність 200-400 г/м².

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		52

ДР 2.3. Стиснення повітря

Атмосферне повітря, яке потрапляє далі по трубах, попередньо очищається від механічних часток пилу, а потім стискається до потрібного тиску і потрапляє до системи повітропостачання. За допомогою компресора здійснюється адіабатне стискання повітря до тиску 0,2 МПа, в наслідок чого температура повітря може піднятися до 100-120°C.

ДР 2.4. Охолодження повітря

При виході з компресора для охолодження повітря необхідно залучити теплообмінник, оскільки для процесу культивування та подальшої ферментації повітря має подаватись з температурою не більше 40°C. Для цього зазвичай використовують теплообмінники трубчастого типу, оскільки для охолодження повітря в теплообміннику використовують проточну воду.

ДР 2.5. Регуляція термодинамічних показників

При надходженні повітря у міжтрубний простір, воно зневоднюється до 40-60% вмісту вологи. Операція відбувається у ресиверах. Тиск повітря падає до 0,2 МПа. Конденсат прямує до на переробку.

ДР 2.6. Очищення на головному фільтрі

Для очищення використовують панельні глибинні фільтри періодичної на основі скловолокна, яке затримує механічні та біологічні частки діаметром більше 1 мкм. Фільтрувальний матеріал змінюють 2 рази/рік. Стерилізація фільтру відбувається гострою парою протягом 4 годин при тиску 0,12-0,15 кПа. Ефективність очистки – 95%.

ДР 2.7. Очищення на індивідуальному фільтрі

Повітря очищається на глибинних фільтрах, набитих скловолокном і допускається стерилізація гострою парою. Відбувається затримка механічних та біологічних мікрочасток, що перевищують 0,01 мкм. Ефективність очистки повітря – 99,995% [52-54].

ДР 3. Підготовка флаконів та картриджів

ДР 3.1. Мийка та ополіскування флаконів та картриджів

Перед початком миття флакони оглядають на наявність можливих

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						53
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

дефектів або пошкоджень. Для миття використовують машини роторного або лінійного типу. Мийка флаконів відбувається за температури 60°C протягом 30 хв з додаванням миючих засобів. Спершу ополіскують теплою водою, а після - холодною. Далі ополіскування здійснюють водою для ін'єкцій.

ДР 3.2. Висушування та стерилізація флаконів та картриджів

Сушіння флаконів здійснюється у сухо-жарових шафах протягом 15-30 хв з підтримкою температури 50°C під тиском 0,5 атм. В зоні стерилізації температура сягає 360°C, а на виході складає 23°C. Стерилізація відбувається протягом 1 год.

ДР 4. Підготовка пробок та ковпачків

ДР 4.1. Миття та ополіскування пробок і ковпачків

Перед початком миття пробки та ковпачки оглядають на наявність можливих дефектів або пошкоджень. Пробки і ковпачки миють з використанням миючих засобів протягом 30 хв за температури 60°C. Ополіскування відбувається спочатку теплою водою, а потім холодною.

ДР 4.2. Сушіння та стерилізація пробок та ковпачків

Сушіння пробок та ковпачків здійснюється в сушильних шафах протягом 15-30 хв за температури 50°C. Пробки та ковпачки стерилізуються автоклавуванням під тиском 0,5 атм при температурі 120°C протягом 20 хв.

ДР 5 Підготовка лабораторного посуду

ДР 5.1. Миття та ополіскування посуду

Миття посуду проводиться вручну при температурі 40-60°C з використанням миючих засобів. Ополіскування відбувається очищеною водою за температури 30-35°C.

ДР 5.2. Сушіння та стерилізація посуду

Сушіння лабораторного посуду відбувається у сушильних шафах за температури 60°C. Стерилізація посуду проходить в автоклавах під тиском 0,5 атм при температурі 110-112°C, 30-45 хвилин [56].

ДР 6. Приготування буферних розчинів для хроматографії

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						54
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ДР 6.1. Приготування буферу для іонообмінної хроматографії

Для приготування буферу до очищеної води 50 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЕДТА, 32% 2-пропанол, рН=8,3.

ДР 6.2. Приготування буферів для високоефективної рідинної хроматографії

Для приготування буферу використовується вода очищена, 0,05 М ацетату натрію, 2-пропанол 10%, вода очищена, рН=3.

ДР 7. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 7.1. Приготування середовища для культивування

Сукупність компонентів, що входять до складу глюкозо-пептонного середовища, забезпечує поживні потреби для зростання бактерій групи кишкової палички. *E. coli* утилізує глюкозу, утворюючи кислоти і газу, які спостерігаються наявністю бульбашок газу в поплавцях та зміною кольору середовища із зеленого в жовтий у присутності індикатора бромтимолового синього. До складу середовища входить хлорид натрію 5 г/л, Д-глюкоза 5 г/л, пептон 10 г/л та вода очищена. Перемішування компонентів середовища відбувається у біореакторі за допомогою лопатевої мішалки та наявною сорочкою для підтримання температури. Робочий об'єм – 10 л. Коефіцієнт заповнення 0,7. Умовний тиск складає 0,6 МПа. Швидкість обертання мішалки 24-30 об/хв. Потужність привода мішалки 0,37 кВт. Стерилізація середовища періодична, проводяться в реакторі за температури 135°C протягом 45-60 хв, а після охолоджують до температури 35-38°C.

ДР 7.2 Приготування поживного середовища для ферментації

Культивування *E. coli* проводять на середовищі наступного складу (у г/л): гідролізат казеїну солянокислий - 30, глюкоза – 30, екстракт пекарських дріжджів - 14, фосфат калію двозаміщений - 6, фосфат калію однозаміщений - 3, сульфат магнію - 0,5, хлорид натрію - 5, ампіцилінова натрієва сіль - 0,05. доводять водою для ін'єкцій. Для змішування використовують ферментер об'ємом 0,16 м³ з лопатевою мішалкою. Потужність привода мішалки 0,37 кВт. Швидкість мішалки складає 24-30 об/хв із потужністю привода 0,37 кВт.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

Коефіцієнт заповнення 0,7, $p=0,6$ МПа, рН середовища приблизно 7-7,2 та регулюють за допомогою розчину натрій гідроксиду. Стерилізація відбувається при температурі 120-130 °С, тиск умовний 0,2 МПа протягом 45 хв, а після охолоджують до температури 35-38°С.

ТП 8. Підготовка посівного матеріалу *E. coli*

ТП 8.1.Відновлення музейної культури

Музейну культуру висівають у пробірки на глюкозо-пептонне середовище та залишають в термостаті на 10 годин при температурі 28 °С

ТП 8.2. Культивування культури в колбах

Отриманий інокулят поміщають у колби ємністю 750 мл з коефіцієнтом заповнення 0,3 та глибинно культивують у термостатичній качалці протягом наступних 12 годин за температури 37 °С.

ТП 8.3. Культивування культури в інокуляторі

Отриманий інокулят переміщають до інокулятора ємністю 15 л з коефіцієнтом заповнення 0,7 та культивують за температури $T=37$ °С, $pH=6,9\pm 0,2$ протягом 8 год, аерація киснем $pO_2=40\pm 15\%$. Кожні 30-40 хвилин відбирають пробу та вимірюють оптичну густину посівної культури. Культивування закінчується при досягненні оптичної густини 7-8 одиниць при довжині хвилі 540 нм.

ТП 9. Виробниче культивування *E.coli JM109/pHINS05*

Вирбниче культивування *E.coli* відбувається у ферментері ємністю 0,16 м³ із об'ємом поживного середовища 100,8 л. Об'ємом інокулята, що вноситься, складає 11,2 л. Культивування проводять використовуючи такі параметри: рН 6,9±0,2, температура 36°С; $pO_2=25-55\%$, аерація 0,4%. Кожні 30-40 хвилин відбирають пробу та вимірюють оптичну густину посівної культури. При досягненні оптичної густини 7-9 одиниць, вводять індуктор біосинтезу - ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид. Культивування триває до утворення внутрішньоклітинних включень гібридного білку у 90-95% клітин [51].

ТП 10. Сепарація клітин

Ріст культури в ферментері припиняють уповільненням інтенсивності

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

перемішування інокуляту. Отриману культуру охолоджують до температури 10-14 °С та концентрують на сепараторі у 8-10 разів.

ТП 11. Руйнування клітинної стінки

До отриманої суспензії додають Tris-основний концентрацією до 0,1 М, сечовину концентрацією до 1,5 М, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) до 0,01 М. Далі отриманий розчин тричі пропускають через гомогенізатор при температурі 15-20 °С та тиску 750 атм.

ТП 12. Центрифугування з подальшим відділенням осаду

Отриманий гомогенат клітин направляють до проточної центрифуги ($g=18000$). В ній на роторі осаджується основна маса тілець включень, яка складає не менше 90%. Утворений вологий осад тілець включень вивішують з ротору центрифуги та заморожують та зберігають при -40 °С. Втрата гібридного білку при виділенні тілець включення не перевищує 15%.

ТП 13. Рефолдинг проінсуліну

Рефолдинг проінсуліну використовують з метою утворення подвійних дисульфідних зв'язків. Буфер для рефолдингу містить наступні складові: гліцин від 0,5 мМ до 20 мМ; гліцерин - приблизно від 1% до 20%; ЕДТА від 0,1 мМ до 5мМ, рН=11,2. Рефолдинг відбувається при температурі переважно 10 °С. Час інкубаційного періоду становить 6 годин.

ТП 14. Ферментативний гідроліз гібридного білку

Протеолітичне розщеплення проінсуліну відбувається за одночасної обробки карбоксипептидазою Б та трипсином. Карбоксипептидаза Б, трипсин та гібридний білок для утворення буферу беруться з концентраціями 1,25:2000:1 відповідно. Протеолітичне розщеплення проводять у буфері при температурі інкубації, яка становить 6 °С, з рН переважно 10,5 та часом інкубації 14 годин [57].

ТП 15. Іонообмінна хроматографія

Процес проходить в іонообмінному реакторі із вмістом в ньому іонообмінного сорбенту. Для даного хроматографічного очищення використовують буферний розчин наступного складу: 50 мМ Трис-НСl, 1 мМ

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						57
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ЕДТА, 32% 2-пропанол, рН=8,3. Інсуліновий розчин пропускають через фільтр (0,5 мкм) і подають на колонку. Сорбований інсулін елюють градієнтом концентрації натрію хлориду (0,1-0,3М) протягом 2,5 годин. Регенерація сорбенту проводять 0,5 М розчином гідроксиду натрію.

ТП 16. Високоєфективна рідинна хроматографія

Хроматографічні колонки для ВЕРХ являють собою трубки із нержавіючої сталі, які з обох сторін закриті перехідниками та заповнені сорбентом. Тиск колонок приблизно 70 атм. Насосом розчин інсуліну перекачується на хроматографічну колонку з буферним розчином наступного складу: 0,05 М ацетату натрію, 2-пропанол 10%, вода очищена, рН=3. Інсулін елюють лінійним градієнту концентрації 2-пропанолу (10-28%) протягом 2,5 годин. Регенерацію сорбенту проводять на колонці з розчином: 0,05 М ацетату калію, 50% 2-пропанолу із рН=3.

ТП 17. Кристалізація

Даний процес відбувається у кристалізаторі із подальшим додаванням кислоти лимонної 50 мМ, 10% ZnCl 1,5мМ та води очищеної. Для регулювання рівня рН до 7,5, спочатку додають гідроксид натрію, а після для зниження рН до 6 додають соляну кислоту, перемішуючи лопатевою мішалкою протягом 12 год.

ТП 18. Фільтрування

Для фільтрування суспензії використовують друк-фільтри ДСЕов 0,4-11-12-01, щоб під тиском відділити кристали. Далі 0,9% розчином солі кристали промивають і вивантажують до збірника. На виході маємо кристали інсуліну чистотою 98%.

ТП 19. Сублімаційна сушка кристалів інсуліну

Сушка кристалів проводиться у спеціальних реакторах протягом 15 год за температури від -40 до -20°C в умовах абсолютного вакууму. Спочатку відбувається замороження інсуліну, а потім подають тепло і відбувається сублімація льоду.

ТП 20. Приготування розчину інсуліну

Розчинення здійснюється додаванням заморожених кристалів інсуліну у

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						58
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

воді для ін'єкцій із додаванням допоміжних речовин. В реактор з механічним перемішуючим пристроєм ($n = 1 \text{ с}^{-1}$) при температурі 20-25 °С завантажують наступні компоненти (у г/л): кристали інсуліну - 3,53, хлорид цинку 0,007 , гліцерин – 15,5, метакрезол – 2,92, залишок – вода для ін'єкцій. Для регулювання рівня рН до 7,4 можуть бути використані гідроксид натрію та хлоридна кислота.

ТП 21. Розлив у флакони та картриджі, маркування

Розлив у флакони та картриджі проходить автоматизовано за асептичних умов.

До флаконів об'ємом 5 мл або 10 мл наливають розчин, закупорюють резиноювою пробкою і горлечко замотують алюмінієвими ковпачками. Далі на флаконах наклеюють етикетки із зазначенням дати виготовлення, умови та термін зберігання, активність розчину і т.п.

В картриджі наливають по 3 мл готового розчину. 1 мл розчину містить 100 МО, відповідно один картридж містить 300 МО. Заповнені картриджі закупорюють гумовими пробками з обох сторін

ПМВ 22. Пакування флаконів та картриджів

Пакування картриджів здійснюється наступним чином: в блістерну упаковку складають по 5 картриджів і потім кладуть до картонної упаковки.

Пакування флаконів здійснюється упаковкою по 1 флакону в картонну упаковку. Готові коробки відправляються на склад.

ЗВ 23. Знешкодження відходів

Відпрацьоване повітря направляють на фільтруючі системи, де воно очищується. Перевіряють чистоту повітря та потім використовують повторно.

Утворені рідкі відходи, суспензії та розчини із залишками осадженої біомаси зруйнованих клітин направляють до біофільтру для знезараження та знешкодження. Після очищення відбувається перевірка на чистоту для можливості подальшого повторного використання у технічних цілях або можуть бути направлені до водойм.

Відпрацьований фільтрувальний матеріал направляють до контейнеру для горючих відходів, де він направляється на установку термічного знешкодження

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						59
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

відходів.

Бракований матеріал для пакування збирають в картонні коробки та направляють до пунктів прийому вторинної сировини без попередньої обробки.

ПВ 24. Переробка відходів

Конденсат та інші органічні розчинники, що використовувались для миття або ополіскування, надходять із виробництва у збірники, де їх нейтралізують та розводять необхідною кількістю водопровідної води, щоб їх гранично допустима концентрація шкідливих речовин не перевищувала норму.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>60</i>

4.4 Матеріальний баланс

Таблиця 4.2 – Матеріальний баланс стадії виробництва.

Використано					Отримано				
Стадія	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Стадія	Назва кінцевого продукту або напів-продукту, відходів та витрат	Кількість		
		кг	шт	л			кг	шт	л
ДР7.1	Хлорид натрію	0,06			ДР7.1	Середовище для інокуляту	12		
	Д-глюкоза	0,07							
	Пептон	0,12							
	Вода очищена	11,75							
Всього		12			Всього		12		
ДР7.2.	Гідролізат казеїну	3,15				Поживне середовище	103		
	Глюкоза	3,15				Витрати	2		
	Екстракт пекарських дріжджів	1,47							
	Фосфат калію двозаміщений	0,63							
	Фосфат калію однозаміщений	0,315							
	Сульфат магнію	0,053							
	Хлорид натрію	0,53							
	Ампіцилінова натрієва сіль	0,005							
Вода для ін'єкцій	95,7								

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9202.00 ПЗ

Арк.

61

Продовження таблиці 4.2

Всього		105			Всього		105		
ТП8.1	Музейна культура			0,1		Відновлена культура			0,2
	Пробірки		10			Витрати			0,1
	Глюкозо-пептонне середовище			0,2		Брудні пробірки		10	
Всього			10	0,3	Всього			10	0,3
ТП8.2	Відновлена культура			0,2		Інокулят першої генерації			1,4
	Глюкозо-пептонне середовище			1,4		Витрати			0,2
	Колби (750мл)		2			Брудні колби		2	
Всього			2	1,6	Всього				1,6
ТП8.3	Інокулят першої генерації			1,4		Інокулят другої генерації			11,2
	Середовище для інокуляту			10,6		Витрати			0,8
Всього					Всього				12
ТП9	Інокулят другої генерації			11,2		Культуральна рідина			115
	Поживне середовище			100,8		Витрати			2
	Ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид			5					
Всього				117	Всього				117
ТП10	Культуральна рідина			115		Біомаса			11,5
						Відходи рідкі			103,5

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9202.00 ПЗ

Арк.

62

Продовження таблиці 4.2

Всього							115
ТП11	Біомаса		11,5		Суспензія		23
	Буферний розчин		11,5				
Всього					Всього		
ТП12	Суспензія		23		Осад		8
					Супернатант		15
Всього				23	Всього		
ТП13	Осад		8		Суспензія		24
	Буфер для рефолдингу		16				
Всього				24	Всього		
ТП14	Суспензія		24		Суспензія ферментована		30
	Ферментна суміш		1				
	Буферний розчин		5				
Всього				30	Всього		
ТП15	Суспензія ферментована		30	ТП15	Розчин інсуліну		25
	Буфер для хроматографії		120		Відпрацьований буфер		155
	Розчин нітрій хлориду		30				
Всього				180	Всього		
ТП16	Розчин інсуліну		25	ТП16	Розчин інсуліну		20
	Буфер для ВЕРХ		100		Відпрацьований буфер		130
	2-пропанол		25				
Всього				150	Всього		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9202.00 ПЗ

Арк.

63

Кінець таблиці 4.2

ТП17	Розчин інсуліну			20		Суспензія кристалів			45
	Кислота лимонна			20					
	Регулятори рН			0,5					
Всього				45	Всього				45
ТП18	Суспензія кристалів			45	ТП18	Кристали			18
	Розчин NaCl			5		Фугат			32
Всього				50	Всього				50
ТП19	Кристали			18	ТП19	Заморожені кристали			3
						Волога			15
Всього				18	Всього				18
ТП20	Заморожені кристали	3			ТП20	Розчин інсуліну	85		
	Хлорид цинку	0,006							
	Гліцерин	13							
	Метакрезол	2,48							
	Вода для інекцій	66,32							
Всього		85			Всього		85		
ТП21	Розчин інсуліну			80	ТП21	Флакони		4980	49,98
	Флакони(10мл)		5000			Брак		40	0,04
	Резинові пробки		8000			Використані пробки		8000	
	Картриджі		3000			Картриджі		2980	29,98
	Ковпачки		5000			Використані ковпачки		5000	
Всього			21000	80	Всього			21000	80

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9202.00 ПЗ

Арк.

64

Продовження таблиці 4.3

ДР4.2 Висушування та стерилізація пробок та ковпачків К _т 4.2, К _{мб} 4.2	Пробки та ковпачки Час стерилізації Температура	Годинник, термометр	безперервно кожну операцію	τ=30-45хв, t=110-112 °С
ДР5.1 Миття та ополіскування посуду К _т 5.1	Лабораторний посуд Час миття, температура	Годинник, термометр	Під час миття та ополіскування	τ=30хв, t=40-60 °С
ДР5.2 Висушування та стерилізація посуду К _т 5.2, К _{мб} 5.2	Лабораторний посуд Час стерилізації температура	Годинник, термометр	безперервно кожну операцію	τ=30-45хв, t=110-112 °С
ДР6.1 Приготування буфера для іонообмінної хроматографії К _т 6.1	Готовий буфер, концентрація, рН	Мірний посуд, рН-метр	кожну операцію	рН 8,3, С(Трис-НCl)=0,05М, ЕДТА 0,01М, 2-пропанол - 32%
ДР6.2 Приготування буферів для ВЕРХ К _т 6.2	Готовий буфер концентрація, рН	Мірний посуд, рН-метр	кожну операцію	рН=3, С(CH ₃ COONa)=0,05М, 2-пропанол – 10%
ДР7.1 Приготування середовища для культивування К _т 7.1, К _{мб} 7.1	Поживне середовище, тиск, швидкість обертів мішалки, температура, час стерилізації	Манометр, тахометр, термометр, годинник	безперервно під час приготування та стерилізації	p=0,6 МПа, ω=24-30 об/хв, t=135°С, τ=45-60 хв
ДР7.2 Приготування поживного середовища для ферментації К _т 7.2, К _{мб} 7.2	Поживне середовище тиск, швидкість обертів мішалки, рН, тиск під час стерилізації, температура стерилізації, час стерилізації	Манометр, тахометр, рН-метр, термометр, годинник	безперервно під час приготування та стерилізації	p=0,6 МПа, ω=24-30 об/хв, рН=7-7,2, p=0,2 МПа, t=120-130°С, τ=45-60 хв
ТП8.1 Відновлення музейної культури К _т 8.1, К _{мб} 8.1	Культура <i>E.coli</i> JM109/pHINS05, температура, час	Термометр, годинник	безперервно під час культивування	t=28°С, τ=10 год
ТП8.2 Культивування культури в колбах К _т 8.2, К _{мб} 8.2	Посівний матеріал, температура, час	Термометр, годинник	безперервно під час культивування	t=37°С, τ=12 год

Продовження таблиці 4.3

ТП8.3 Культивування культури в інокуляторі К _т 8.3, К _х 8.3 К _{мб} 8.3	Посівний матеріал, температура, рН, час, оптична густина	Термометр, рН-метр, годинник, фотоколориметр	безперервно під час культивування	t=37°C, τ=8 год, рН=6,9±0,2 D=7-8 при 540 нм
ТП9 Виробниче культивування <i>E.coli JM109/pHINS05</i> К _х 9, К _т 9, К _{мб} 9	Культуральна рідина, рН, час, температура, аерація, оптична густина	рН-метр, годинник, термометр, барботер, фотоколориметр	безперервно під час культивування	t=36°C, τ=12 год, рН=6,9±0,2, аерація – 0,4%, D=7-9 при 540 нм
ТП10 Сепарація клітин К _т 10	Культуральна рідина, температура, кількість повторювань	термометр, власноруч рахують або вводять у програмному забезпеченні сепаратора	під час даної операції	t=10-14°C, N=8-10 разів
ТП11 Руйнування клітинної стінки К _т 11, К _{мб} 11	Розчин біомаси, тиск, температура	Термометр, манометр (або покази вимірювання вбудованих у гомогенізатор пристроїв контолю)	під час даної операції	t=15-20°C, p=750 атм
ТП12 Центрифугування з подальшим відділенням осаду К _т 12	Розчин тілець включення, кількість обертів центрифуги	Програмне забезпечення центрифуги	під час даної операції	g=18000
ТП13 Рефолдинг інсуліну К _т 13	Паста проінсуліну, рН, час інкубації, температура, концентрація білку	рН-метр, термометр, годинник, мікроскопіювання	протягом усієї операції	рН=11,2, t=10°C, τ=6 год, C=50 мг/мл
ТП14 Ферментативний гідроліз гібридного білка К _т 14	Інокулят з проінсуліном Рівень рН Температура Тривалість	рН-метр, термометр, годинник	під час кожної операції	рН=10,5, t=6°C, τ=14год
ТП15 Іонообмінна хроматографія К _т 15	Хроматографічна очистка, градієнт концентрації час елюації	Годинник, ваги, мірний посуд	під час хроматографії	C(NaCl)=0,1-0,3M, τ=2,5 год

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП БТ-9202.00 ПЗ

Арк.

68

Кінець таблиці 4.3

ТП16 Високоєфективна рідинна хроматографія К _т 16	Хроматографічна очистка, концентрація інсуліну, час елюації	Годинник, ваги, мірний посуд	під час хроматографії	C _{інс} >95%, τ=2,5 год
ТП17 Кристалізація К _т 17	Режим кристалізації рН, Час	рН-метр Годинник	Кожну операцію	рН 6 12 годин
ТП18 Фільтрування К _т 18	Розчин інсуліну та домішкових білків, тиск	Манометр	Кожну операцію	70кПа
ТП19 Сублімаційна сушка кристалів К _т 19	Вологий інсулін, температура , тиск	Термометр Манометр	Кожну операцію Кожну операцію	від -40 до +20°C 50-70 Па
ТП20 Приготування розчину інсуліну К _т 20	Мікробіологічна чистота Концентрація компонентів, рН	Ваги, мірний посуд, рН-метр	Кожну операцію Кожну операцію	Крис. інсул – 3,53 г/л, ZnCl ₂ – 0,007 г/л, гліцерин – 15, 5 г/л, метакрезол – 2,92 г/л, залишок – вода для ін'єкцій рН=7,4
ТП21 Розлив у флакони та картриджі, маркування К _т 21	Інсулін у флаконах та картриджах, відповідність маркування	Ваги, правильність маркування відповідно вимогам	Під час маркування,	Правильність маркування
ПМВ22 Пакування флаконів та картриджів К _т 22	Зовнішній вигляд Кількість флаконів та картриджів	Візуально	Підрахунок під час пакування	Кількість флаконів та картриджів в упаковці
ЗВ23 Знешкодження відходів К _х 23, К _т 23, К _{мб} 23	Знешкодженні відходи, стерильність	Кількісний та хімічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних норм і правил
ПВ24 Переробка відходів К _х 24, К _т 24, К _{мб} 24	Знешкоджені відходи, ефективність очистки	Кількісний та хімічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД для конкретного матеріалу чи речовини

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва рекомбінантного інсуліну людини
представлена на 2 аркушах формату А1. ДП БТ-9202.01 ТС

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						69
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.

Процес виробництва біологічно активних речовин в тому числі і біомаси проводиться з використанням власних обраних способів. А особливість вибору та їх реалізація впливатимуть на весь виробничий процес. Тому вибір ферментера, який здійснює гідродинамічні і масообмінні процеси, а також функціонує як теплообмінник, є важливим етапом під час культивування

При виборі типового ферментера варто виділити наступні основні вимоги для культивування:

- Консистенція ПС;
- спосіб культивування (глибинний чи поверхневий)
- періодичний, напівперіодичний чи безперервний процес біосинтезу цільового продукту;
- визначення необхідного об'єму ферментеру враховуючи продуктивність виробництва;
- швидкість росту, від якої залежить потрібний час підтримування стабільних параметрів культивування;
- рівень асептики в процесі культивування;
- використання повітря як одним із найбільш економічно-доцільним джерелом кисню (вміст кисню в повітрі складає 21%);
- інтенсифікація біотехнологічних процесів несуттєво залежить від конструктивних змін в апаратурі; процеси біосинтезу і в основному, детерміновані генетичним потенціалом біологічного агенту. [58]

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>		<i>Бондар А.О.</i>			<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Конс.</i>						<i>70</i>	<i>98</i>
<i>Керівн.</i>		<i>Сироїд О.О.</i>			<i>КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ</i>		
<i>Затверд.</i>							

За способом культивування проведення процес поділяють на поверхневий і глибинний. В основному на сучасних підприємствах застосовують глибинний спосіб культивування, оскільки поверхневий метод має ряд суттєвих недоліків:

- вимагає обладнання великих габаритів відносно невисокого виходу,
- висока складність роботи, що знижує ефективність:
- недосконала чистота праці.

Оскільки для культивування *E. coli* відбувається за оптимальних умов (температура близька до 37 °С та рН = 7) то існує ризик контамінації культуральної рідини мезофільними і нейтрофільними МО, концентрація яких найбільша у навколишньому середовищі. Тому, при біосинтезі забезпечення асептичних умов є необхідною складовою, яке при поверхневому культивуванні неможливе. Асептичність під час культивування контролюється постійно. Вона зумовлена перша за все попередньою стерилізацією обладнання і комунікацій, стерилізацією компонентів поживного середовища, наявного стерильного аераційного повітря та стерильною чистотою усіх компонентів і речовин, які надходять у ферментер. Створення надлишкового тиску у ферментері усуває можливість контамінації. Отже, культивування доцільно проводити саме глибинним культивуванням.

Глибинне культивування у свою чергу ділиться на періодичне і безперервне.

Здійснюючи культивування безперервно, культуру зазвичай фіксують в експоненційній фазі постійною подачою нового ПС та відведенням культуральної рідини. Але на практиці частіше зустрічається використання періодичного способу культивування через простоту проведення процесу та низьку вірогідність контамінації. Тому культивування продуценту відбуватиметься періодичним способом [59].

В процесі біосинтезу від засобів для герметизації ферментеру залежить забезпечення потрібного рівня асептики. У ферментерів із комбінованим введенням найбільш вразливим місцем вважається місце введення валу мішалки в ферментер.

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

Щоб забезпечити асептичність біосинтезу, використовують торцеві ущільнення з паровим захистом в якості герметизуючої пристрій для обертаючих валів. Торцеві ущільнення є також є необхідною складовою частиною для ферментерів з комбінованим введенням енергії, які працюють в асептичних умовах.

Держинськхіммаш випускає шість типів торцевих ущільнювачів для герметизації валів апаратів: ТД-6, ТДП, ТДМ, ТДПЗ, ТТ та ТСК. Вони здатні працювати при надлишковому тиску до 0,25 МПа, температурі середовища від 30 до 250 °С та швидкості обертання валу до 10 с⁻¹. Торцеві ущільнення, які контактують з культуральним середовищем, виготовляються зі сталі Х18Н10Т і Х17Н13М2Т, а також з титану ВТ1-0. Термін експлуатації для них становить не менше 2000 годин. Припустимий зазор валу в зоні торцевого ущільнення не перевищує 9,25 мм, а кутовий зазор валу не перевищує 0,25 мм. [60]

Існують три основні засоби введення енергії в поживне середовище:

- ферментери з підводом енергії газовою фазою,
- ферментери з підводом енергії рідкою фазою,
- ферментери з підводом енергії газовою та рідкою фазою.

Ферментери з підводом енергії газовою фазою представлені на рис. 5.1.:

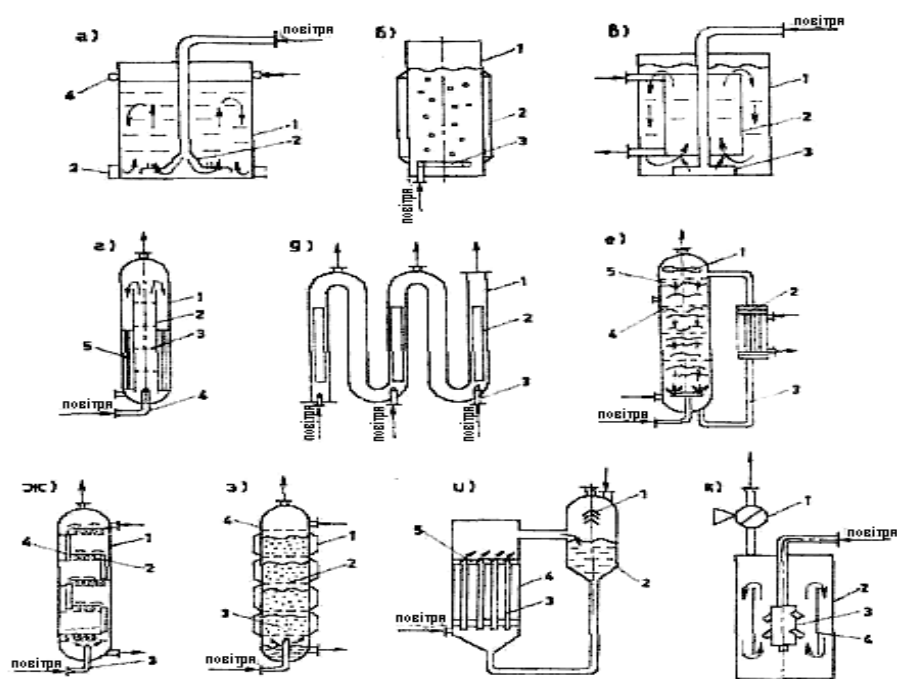


Рис. 5.1. Схеми ферментерів з підводом енергії газовою фазою: *а* – Ферментер барботажний $H_0/D \leq 2$; *б* – Ферментер барботажний колонний $2 < H_0/D < 10$; *в* – Ферментер барботажний ерліфтний $H_0/D < 2$; *г* – Ферментер газліфтний колонний $2 < H_0/D < 10$; *д* – Ферментер газліфтний петльовий колонний; *е* – Ферментер газліфтний рециркуляційний колонний; *ж* – Ферментер тарілчастий колонний; *з* – Ферментер з плаваючою насадкою колонний; *и* – Ферментер трубчастий; *к* – Ферментер газліфтний пульсаційний. [60].

Ферментери з підводом енергії рідкою фазою представлені на рис. 5.2.:

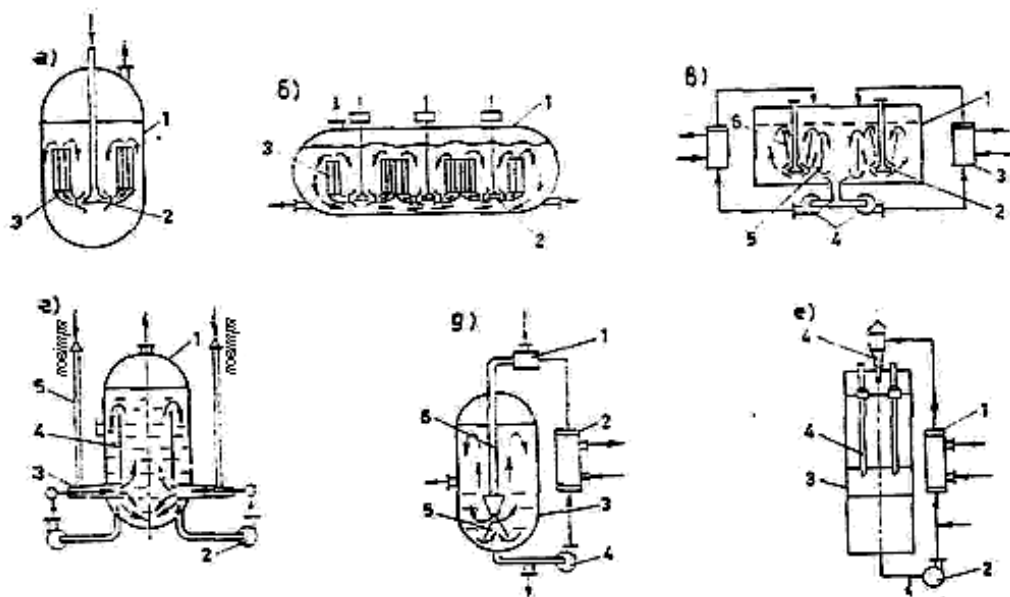


Рис. 5.2 . Ферментери з підводом енергії рідкою фазою: *а* — одновальний ферментер із самозасмоктуючою мішалкою; *б* — ферментер із самозасмоктуючими мішалками багатовальний; *в* — ферментер із самозасмоктуючими мішалками багатовальний з зовнішнім циркуляційним контуром; *г* — ферментер ежекційний; *д* — ферментер струменевий з затопленим струменем; *е* — ферментер струменевий з падаючим струменем [60].

Ферментери з підводом енергії рідкою та газовою фазою представлені на рис. 5.3:

						ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			73

взаємодіючих фаз. До цієї групи апаратів відносяться ферментери в рідку фазу, в яких енергія вводиться одночасно за допомогою перемішуючого пристрою і насоса, або тільки насоса. Енергія газової фази доставляється стандартним способом через аеруючі пристрої відомих конструкцій.

Вибір мішалки для перемішування

Зустрічаються апарати з різними перемішувачами: лопатевими, турбінними, пропелерними, рамними мішалками. Вибір мішалки залежить від мети перемішування та характеристики компонентів. Основні типи мішалок зображені на рисунку 5.4.

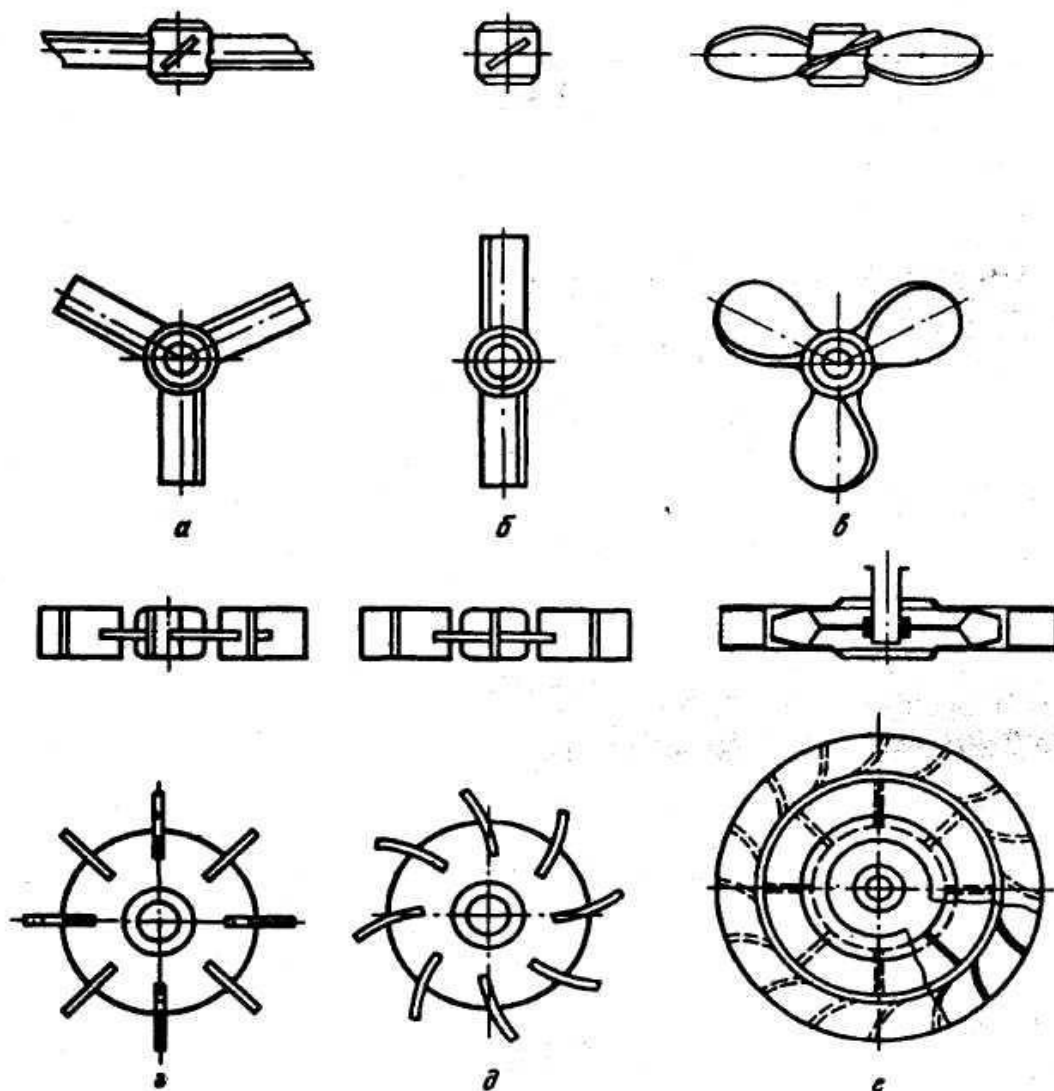


Рис 5.4. Основні типи мішалок: а - трилопатева; б - дволопатева; в - пропелерна; г - відкрита турбінна; д - відкрита турбінна з похилими лопатями; е - закрыта турбінна [71]

При великих швидкостях обертання перемішуючого пристрою рідина, що піддається перемішуванню, створює круговий рух, утворюючи воронку навколо валу. Глибина цієї воронки збільшується зі зростанням числа обертів та зменшенням густини і в'язкості середовища. Щоб запобігти утворенню воронки, в апараті розміщують відбивні перегородки. Вони не лише виконують функцію розділення, але і сприяють виникненню вихорів і ,як наслідок, збільшенню турбулентності системи. [61-62]

Турбінні мішалки забезпечують перемішування суспензій та в'язких рідин. Турбінне колесо, що обертається на вертикальному чи горизонтальному валу., має схожий принцип дії з колесом відцентрового насоса. Рідина входить у колесо вздовж осі через центральний отвір і, прискорившись за рахунок лопатей, викидається з колеса в радіальному напрямку. Іноді обертове колесо встановлюють усередині нерухомого напрямного колеса з лопатями. Таким чином досягається плавна зміна напрямку потоку рідини та зменшуються гідравлічні витрати.

Турбінні мішалки бувають відкриті й закриті.

Відкриті турбінні мішалки є вдосконаленою конструкцією простих лопатевих мішалок. Обертання кількох лопатей, що розташовані під кутом до вертикальної площини, утворює додаткові до радіальних потоки вздовж вертикальні вздовж рідини, що сприяє інтенсивному перемішуванню. Інтенсивність збільшується при установці ряду відбивних перегородок [63].

Переваги турбінних мішалок:

- 1) ефективно перемішування в'язких рідин;
- 2) адаптовані до безперервного процесу;
- 3) висока швидкість перемішування.

Недоліками турбінних мішалок є:

- 1) складна конструкція;
- 2) використовуються для перемішування невеликих об'ємів;
- 3) висока вартість виготовлення.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						76
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

Висота еліптичної частини	$h_8=0,15 \text{ м};$
Висота відбортованої частини	$h_1=0,04 \text{ м};$
Товщина стінки	$s=0,02 \text{ м};$
Об'єм днища	$V_{\text{дн}}=39,5 \text{ м}^3;$
Маса днища	$m_{\text{дн}}=78,5 \text{ кг}.$

Для перемішування вибираємо *турбінну мішалку*.

Розміри мішалки визначають за співвідношенням:

$$\frac{D}{d_M} = 3 \div 4 \quad d_{M_p} = \frac{D}{4} \div \frac{D}{3} = \frac{0,6}{4} \div \frac{0,6}{3} = 0,15 \div 0,2 \text{ м}.$$

Найближчі стандартні розміри мішалки: 160 мм, 180 мм, 200 мм.

Вибираємо розмір $d_M = 0,2 \text{ м}$

Відстань від горизонтальної осі мішалки до днища:

$$\frac{h}{d_M} = 0,4 \div 1 \quad h = 0,4d_M \div 1d_M = 0,4 \cdot 0,2 \div 1 \cdot 0,2 = 0,08 \div 0,2 \text{ м}, \text{ приймаємо}$$

$$h = 0,2 \text{ м};$$

$$h_M = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,2 = 0,04 \text{ м}.$$

Ширину перегородки знаходять з співвідношення:

$$b = 0,1 \cdot d_M = 0,1 \cdot 0,2 = 0,02 \text{ м}.$$

Довжина лопаті знаходимо із співвідношення:

$$l = 0,25 \cdot d_M = 0,25 \cdot 0,2 = 0,05 \text{ м};$$

$$\xi_M = 8,4.$$

Кількість мішалок:

$$z_M = 1.$$

Визначимо висоту рідини:

Повна висота днища:

$$h_{\text{дн}} = h_1 + h_8 = 0,04 + 0,15 = 0,19 \text{ м}.$$

Об'єм циліндричної частини апарата за формулою:

$$V_y = V - 2V_{\text{дн}} = 0,16 - 2 \cdot 39,5 \cdot 10^{-3} = 0,081 \text{ м}^3.$$

Розраховуємо площу основи циліндричної частини:

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						79
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$F_{осн.ц} = \frac{\pi D^2}{4} = \frac{\pi \cdot 0,6^2}{4} = 0,283 м^2.$$

Розраховуємо висоту циліндричної частини:

$$h_{ц} = \frac{V_{ц}}{F_{ос.ц.}} = \frac{0,081}{0,282} = 0,287 м.$$

Розраховуємо висоту апарата

$$h_{н.ап} = h_{ц} + 2h_{дн} = 0,28 + 2 \cdot 0,19 = 0,67 м.$$

Висота рівня рідини:

$$H_p = \frac{4 \cdot (V_p - V_{дн})}{\pi D^2} + h_{дн} = \frac{4 \cdot (0,112 - 0,0395)}{3,14 \cdot 0,6^2} + 0,19 = 0,446 м.$$

Відстань від дна до верхньої точки мішалки

$$h_3 = h_1 + h_m = 0,04 + 0,04 = 0,08 м.$$

Отже, мішалка повністю занурена у рідину

Розрахунок глибини воронки.

Відповідно до описаної технології частота обертання мішалки становить 180 об/хв

$$n = 3 \text{ с}^{-1}$$

Розраховуємо параметр висоти завантаження апарата:

$$\gamma = \frac{8H_p}{D} + 1 = \frac{8 \cdot 0,446}{0,6} + 1 = 6,95.$$

Розраховуємо центробіжний критерій Рейнольдса за формулою:

$$Re_{ц} = \frac{\rho_c n d_m^2}{\mu_c} = \frac{1010 \cdot 3 \cdot 0,2^2}{0,9 \cdot 10^{-3}} = 134666,67.$$

Для турбінної мішалки параметр гідравлічного опору:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M Z \cdot R_{ц}^{0,25}} = \frac{6,95}{8,4 \cdot 1 \cdot (1,34 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,043.$$

За значенням параметру E на рис. 5.6 визначаємо параметр розподілення швидкості.

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						80
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Потужність електродвигуна:

$$N_{el} = \frac{K_n \cdot K_n \cdot \sum K_i N_p + N_{уц}}{\eta} = \frac{1 \cdot 0,86 \cdot 1,1 \cdot 61 + 49,8}{0,9} = 119,7 \text{ Вт}.$$

Вибираємо електродвигун ГАМАК АГМ 71 2а з номінальною потужністю 0.37 кВт та $n=50 \text{ с}^{-1}$.

Розрахунок барботера

Розраховуємо висоту мішалки над барботером:

$$h_{\partial} = 0,25d_m = 0,25 \cdot 0,2 = 0,05 \text{ м}.$$

Оскільки на 1 м^3 поживного середовища треба $0,4 \text{ м}^3$ повітря на 1 хв, розраховуємо витрату повітря, яке подається в ферментер:

$$W_z = V_c \frac{0,4}{60} = 1,12 \cdot \frac{0,4}{60} = 0,007 \text{ м}^3 / \text{с}.$$

Приймаємо швидкість газу в трубі барботера $\omega_{\sigma} = 10 \text{ м/с}$.

Розраховуємо внутрішній діаметр труби барботера:

$$d_{\sigma.в.} = \sqrt{\frac{4W_z}{\pi\omega_{\sigma}}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,007}{\pi \cdot 10}} = 0,03 \text{ м}.$$

Приймаємо для барботера трубу стандартним діаметром $d_{\sigma.н.} \times s_{\sigma.} = 0,06 \times 0,0035 \text{ м}$.

Зі співвідношення визначаємо діаметр барботера:

$$D_{\sigma} = 6d_{\sigma.н.} = 6 \cdot 0,06 = 0,36 \text{ м}.$$

Приймаємо, що швидкість газу в отворах барботера $\omega_o = 10 \text{ м/с}$, а діаметр отворів барботера $d_o = 5 \text{ мм} = 0,005 \text{ м}$.

Розраховуємо кількість отворів в барботері:

$$z_o = \frac{4W_z}{\pi d_o^2 \omega_o} = \frac{4 \cdot 0,007}{\pi \cdot 0,005^2 \cdot 10} = 35,6 = 36 \text{ отв.}$$

Розраховуємо крок розміщення отворів:

$$t_{отв} = \frac{\pi D_{\sigma}}{z_o} = \frac{\pi \cdot 0,36}{36} = 0,03 \text{ м}.$$

5.2.3 Тепловий розрахунок

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		83

Приймаємо, що теплофізичні властивості посівного матеріалу, поживного середовища та культуральної рідини співпадають. Об'єми поживного середовища та посівного матеріалу:

$$V_{nm} = 0,1 \cdot V_p = 0,1 \cdot 0,112 = 0,0112 \text{ м}^3;$$

$$V_{nc} = V_p - V_{nm} = 0,112 - 0,0112 = 0,1008 \text{ м}^3.$$

Розраховуємо маси поживного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини:

$$m_{кр} = V_{кр} \rho_c = 0,112 \cdot 1010 = 113,12 \text{ кг};$$

$$m_{nm} = V_{nm} \rho_{nm} = 0,0112 \cdot 1010 = 11,312 \text{ кг};$$

$$m_{nc} = V_{nc} \rho_{nc} = 0,1008 \cdot 1010 = 101,808 \text{ кг}.$$

Енергія надходить у ферментер:

1) із посівним матеріалом:

$$E_{nm} = m_{nm} c_c t_c = 11,312 \cdot 4122,7 \cdot 36 = 1,679 \text{ МДж};$$

2) із поживним середовищем:

$$E_{nc} = m_{nc} c_c t_c = 101,808 \cdot 4122,7 \cdot 36 = 15,11 \text{ МДж};$$

3) із повітрям:

$$E_{нов} = \rho_{нов} W_z c_{нов} t_{нов} \tau_k = 1,143 \cdot 0,007 \cdot 1005 \cdot 36 \cdot 43200 = 12,5 \text{ МДж},$$

де $\rho_{нов}$ – густина повітря при температурі 36 °C ($\rho_{нов} = 1,143 \text{ кг/м}^3$); спов. – питома теплоємність повітря ($c_{нов} = 1005 \text{ Дж/(кг} \cdot \text{K)}$);

4) теплота, яка виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

$$E_{дис} = N_p \cdot \tau_k = 61 \cdot 43200 = 2,639 \text{ МДж};$$

5) теплота, яка виділяється в процесі дисиміляції цукрів:

$$E_{цук} = m_{цук} \cdot q_{цук} = 3,9 \cdot 16,7 \cdot 10^6 = 51,82 \text{ МДж},$$

де $m_{цук}$ – маса цукру, яка є сумою маси глюкози та маси цукру в дріжджовому екстракті (1,6% цукру):

$$m_{цук} = m_{nc} (C_{зл} + C_{др.екс}) = 101,808 \cdot (0,03 + 0,03 \cdot 0,016) = 3,1 \text{ кг},$$

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						84
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$q_{цук} = 16,7 \text{ МДж/кг.}$$

Визначаємо сумарне надходження енергії до ферментера:

$$\sum E_{надх} = E_{пм} + E_{пс} + E_{пов.над} + E_{дис} + E_{цук} = 1,68 + 15,11 + 12,5 + 2,639 + 51,82 = 83,755 \text{ МДж.}$$

Витрати теплової енергії відбуваються:

1) із культуральною рідиною:

$$E_{кр} = m_{кр} c_c t_c = 113,12 \cdot 4122,7 \cdot 36 = 16,79 \text{ МДж};$$

2) із повітрям:

$$E_{пов.вум} = \rho_{пов} W_2 c_{пов} t_{пов} \tau_k = 1,143 \cdot 0,007 \cdot 1005 \cdot 36 \cdot 43200 = 12,5 \text{ МДж};$$

3) втрати теплоти в навколишнє середовище приймаємо 2 % від усіх витрат:

$$E_{втр} = 0,02 \cdot (E_{кр} + E_{пов.вум}) = 0,02 \cdot (16,79 + 12,5) = 0,586 \text{ МДж.}$$

Визначаємо сумарні витрати теплоти:

$$\sum E_{вум} = E_{кр} + E_{пов.вум} + E_{втр} = 16,79 + 12,5 + 0,586 = 29,88 \text{ МДж.}$$

Теплове навантаження у ферментері:

$$E_m = \sum E_{надх} - \sum E_{вум} = 83,755 - 29,88 = 53,87 \text{ МДж.}$$

Оскільки $E > 0$, то для підтримання заданої температури культивування необхідно проводити охолодження.

Приймаємо початкову температуру теплоносія $t_1 = 16^\circ \text{C}$, кінцеву – $t_2 = 24^\circ \text{C}$, тоді різниця між ними – $\Delta t = t_2 - t_1 = 24 - 16 = 8^\circ \text{C}$.

Розраховуємо середню температуру води:

$$t_{сеп} = \frac{t_1 + t_2}{2} = \frac{24 + 16}{2} = 20^\circ \text{C}.$$

Визначаємо теплофізичні параметри води за цієї температури:

$$\rho_6 = 998,2 \text{ кг/м}^3;$$

$$\nu_6 = 1,006 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с};$$

$$c_6 = 4183 \text{ Дж/(кг}\cdot\text{K)};$$

$$\lambda_6 = 0,599 \text{ Вт/(м}\cdot\text{K)};$$

$$Pr_6 = 7,02.$$

Розраховуємо тепловий потік:

$$Q = \frac{E_m}{\tau_k} = \frac{53,87}{43200} = 1247,1 \text{ Вт}.$$

Розраховуємо витрату води для відведення тепла:

$$G_6 = \frac{Q}{c_6 \cdot \Delta t} = \frac{1247,1}{4183 \cdot 8} = 0,037 \text{ кг/с}.$$

Розраховуємо меншу та більшу різниці температур:

$$\Delta t_m = t_c - t_2 = 36 - 24 = 12^\circ \text{C}$$

$$\Delta t_6 = t_c - t_1 = 36 - 16 = 20^\circ \text{C}$$

$\frac{\Delta t_6}{\Delta t_m} \leq 2$, тоді середня різниця температур теплоносіїв розраховується за

формулою:

$$\Delta t_{\text{сеп}} = \frac{\Delta t_m + \Delta t_6}{2} = \frac{12 + 20}{2} = 16^\circ \text{C}.$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі середовища в реакторі

Розраховуємо критерій Нуссельта:

$$Nu_1 = C \cdot Re_u^\alpha \cdot Pr_c^{0,33},$$

де C і α – коефіцієнти критеріального рівняння (для апарата з турбінною мішалкою та відбивними перегородками $C = 0,76$; $\alpha = 0,67$).

$$Nu_1 = 0,76 \cdot (134666,67)^{0,67} \cdot (6,184)^{0,33} = 3789,12.$$

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі:

$$\alpha_1 = \frac{Nu_1 \cdot \lambda_c}{D} = \frac{3789,12 \cdot 0,6}{0,6} = 3789,12 \text{ Вт/(м}^2 \cdot \text{К)}.$$

Визначення коефіцієнта тепловіддачі води в сорочці

Розраховуємо площу перетину сорочки:

$$f = 0,785(D_1^2 - (D + 2s)^2),$$

де D_1 – внутрішній діаметр сорочки ферментера

$$D_1 = D + (0,1 \div 0,3) = 0,6 + 0,1 = 0,7 \text{ м}.$$

					ДП БТ-9202.00 ПЗ	Арк.
						86
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$f = 0,785 \cdot (0,7^2 - (0,6 + 2 \cdot 0,02)^2) = 0,063 \text{ м}^2.$$

Розраховуємо швидкість води в сорочці:

$$\omega_6 = \frac{G_6}{\rho_6 \cdot f} = \frac{0,037}{998,2 \cdot 0,18} = 0,0006 \text{ м/с}.$$

Розраховуємо критерій Рейнольдса:

$$\text{Re}_2 = \frac{\omega_6 \cdot (D_1 - (D + 2s))}{\nu_6} = \frac{0,0002 \cdot (0,7 - (0,6 + 2 \cdot 0,02))}{1,006 \cdot 10^{-6}} = 35,28,$$

$\text{Re}_2 < 2300$, відповідно, режим руху води – ламінарний.

Приймаємо, що температури стінки ферментера середня між температурою середовища та охолоджувальної води:

$$t_{cm} = \frac{t_c + t_{cp}}{2} = \frac{36 + 20}{2} = 28^\circ \text{C}.$$

Розраховуємо критерій Нуссельта:

$$\text{Nu}_2 = C \cdot (Gr \cdot \text{Pr})^a,$$

де C і a – коефіцієнти, значення яких залежить від $(Gr \cdot \text{Pr})$.

$$Gr \cdot \text{Pr} = H_c^3 (t_{cm} - t_{cp}) \cdot B,$$

де H_c – висота стінки сорочки ($H_c = H_p = 0,446 \text{ м}$); $B = 24,7 \cdot 10^9$ (для $t_{cm} = 28^\circ \text{C}$).

$$Gr \cdot \text{Pr} = 0,446^3 \cdot (28 - 20) \cdot 24,7 \cdot 10^9 = 17,6 \cdot 10^9;$$

$(Gr \cdot \text{Pr}) > 10^9$, тоді коефіцієнти: $C = 0,15$, $a = 0,33$.

$$\text{Nu}_2 = C \cdot (Gr \cdot \text{Pr})^a = 0,15 \cdot (17,6 \cdot 10^9)^{0,33} = 360,53.$$

Розраховуємо коефіцієнт тепловіддачі від води до стінки апарата:

$$\alpha_2 = \frac{\text{Nu}_2 \cdot \lambda_6}{H_c} = \frac{360,53 \cdot 0,6}{0,446} = 483,76 \text{ Вт/(м}^2 \cdot \text{К)}.$$

Визначення коефіцієнта теплопередачі

Розраховуємо коефіцієнт теплопередачі від середовища до охолоджуючої

ВОДИ:

$$K_m = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_{cm}}{\lambda_{cm}} + \frac{1}{\alpha_2}},$$

повинні мають бути простої форми, бути технологічними у виготовленні, розміри їх визначають залежно від міцності та жорсткості конструкції.

Також для ефективної подачі рідин без втрат, потрібно обрати насос згідно ГОСТ 20791-83. Для цього спочатку розрахуємо потужність, потрібну для перекачування води.

Приймаємо $H = 5 \text{ м}$ - напір.

$$N_n = G_{\text{вод}} \cdot H \cdot g ,$$

де $G_{\text{вод}}$ - витрата вод для відводу тепла, H – напір води, g – прискорення вільного падіння.

$$N_n = G_{\text{вод}} \cdot H \cdot g = 0,037 \cdot 5 \cdot 9,81 = 1,81 \text{ Вт} .$$

Потужність електродвигуна

$$N_{pe} = \frac{N_n}{\eta_n \cdot \eta_n} = \frac{1,81}{0,88 \cdot 0,98} = 2,1 \text{ Вт} ,$$

де $\eta_n=0,88$, $\eta_n=0,98$ - коефіцієнти корисної дії (ККД) насосу та передачі від електродвигуна до насоса відповідно.

Висновок: встановимо циркуляційний насос марки BPS 25-4ESA-180, з наступними характеристиками:

- продуктивність – 0,0008 м³/с;
- напір - 5 м;
- номінальна потужність 22 Вт

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

У процесі виробництва цільового продукту за допомогою бактерії *E. coli* використовуються рухомі пристрої, що приводяться в рух за допомогою електричної енергії, і відбуваються процеси з великим виділенням енергії. Проект передбачає використання внутрішньоцехового транспорту, такого як трубопроводи, ручні візки та тара для продукту. Під час виробництва дотримуються вимоги щодо охорони праці, пожежобезпеки та екобезпеки.

При розміщенні обладнання в приміщеннях дотримуються безпеки, забезпечується зручність обслуговування та можливість проведення ремонту.

Між обладнанням обов'язково залишається прохід не менше 2 метрів, а для

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		89

апаратів, які потребують перевірки або огляду, - не менше 0,8 метра. Робоче місце повинно мати достатнє освітлення. Відповідальність за дотримання правил охорони праці покладається на безпосередніх керівників підрозділів, а на рівні підприємства - на директора та головного інженера [65].

Робітники зобов'язані проходити інструктаж по охороні праці, який повторюється кожні пів року, а при підвищених вимогах до обладнання вони отримують спеціальне навчання та складають екзамени. Для забезпечення безпеки праці і мікробіологічної промисловості застосовуються індивідуальні засоби захисту. Якщо робітники працюють з агресивними реагентами, їм рекомендується використовувати захисні мазі, крім рукавиць [66].

У виробництві інсуліну використовуються певні вимоги безпеки щодо ферментеру. Він має мати витяжні труби для видалення повітря, а збір проб проводиться таким чином, щоб уникнути контакту персоналу з культуральною рідиною. Речовини завантажуються у ферментер за допомогою спеціальних ліній подачі. Ферментер повинен бути обладнаний контрольно-вимірювальними приладами, такими як термометри, манометри, витратоміри і контролер рівня рідини. Ферментер, його компоненти та обладнання для вимірювань і управління повинні використовуватися відповідно до встановлених умов, включаючи певну температуру і характеристики навколишнього середовища.

Виробництво такого роду має екологічні проблеми, зумовлені використанням значних кількостей технічної води та повітря, що перетворюються на викиди. Ці викиди містять живі та мертві клітини мікроорганізмів-продуцентів, які можуть негативно впливати на навколишнє середовище у великих кількостях. Велика увага приділяється знешкодженню та переробці відходів. Дотримання встановлених норм є обов'язковим [64].

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						90
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ВИСНОВКИ

1. Для виробництва рекомбінантного інсуліну людини середньої тривалості дії було обрано продуцент *Escherichia coli* JM109/pHINS05. Вихід готового продукту при використанні даного штаму 3 кг готових кристалів інсуліну для розчинення.

2. Описано морфологічні, фізіолого-культуральні та інші ознаки мікроорганізму *E. coli*. Представлено механізми дії лікарського препарату інсуліну на біохімічні процеси.

3. Було представлено інформацію про геном *Escherichia coli* JM109/pHINS05, наведені методи створення високопродуктивного промислового продуценту, запропановано та описано використання методу генної та клітинної інженерії для отримання плазміди *E. coli*.

4. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту, для культивування було обрано середовище наступного складу (у г/л): гідролізат казеїну солянокислий - 30, глюкоза – 30, екстракт пекарських дріжджів - 14, фосфат калію двозаміщений - 6, фосфат калію однозаміщений - 3, сульфат магнію - 0,5, хлорид натрію - 5, ампіцилінова натрієва сіль - 0,05.

5. У проєкті було проведено конструктивні, технологічні й теплові розрахунки та обрано ферментер габаритами 760×720×1290 мм, об'ємом 0,16 м³ та масою 800 кг із відкритою турбінною мішалкою потужністю 0,37 кВт, наявною сорочкою та барботером.

6. Згідно з вимогами до виробництва продукції, розроблено опис технологічної схеми, матеріального балансу, представлено технологічну та апаратурні схеми.

ДП БТ-9202.00 ПЗ

ВИСНОВКИ

Стадія	Аркуш	Аркушів
	91	98
КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ		

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Бондар А.О.		
Конс.				
Керівн.		Сироїд О.О.		
Затверд.				

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espin J, Corchero JL, Vazquez E, Villaverde A: Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. Microb Cell Fact. 2009.
2. Jenkins N: Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects. Cytotechnology. 2007. 10.1007/s10616-007-9075-2.
3. German M (2004). Insulin Gene Regulation. У LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM. Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text (вид. 3rd). American Institute of History of Pharmacy.
4. Makrides SC: Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. Microbiol Rev. 1996, 60: 512-538.
5. Kane JF: Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol. 1995, 6 (5): 494-500.
6. Chance R, Frank B: Research, development production and safety of biosynthetic human insulin. Diabetes Care. 1993
7. Chance R, Glazer N, Wishner K: Insulin Lispro (Humalog). Biopharmaceuticals, an Industrial Perspective. Edited by: Walsh G, Murphy B. 1999. 10.1007/978-94-017-0926-2_6.
8. Walsh G: Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. Appl Microbiol Biotechnol. 2005. 10.1007/s00253-004-1809-x.
9. Wildt S, Gerngross TU: The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. Nat Microbiol. 2005. 10.1038/nrmicro1087.
10. Gerngross TU: Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. Nat Biotechnol. 2004. 10.1038/nbt1028.
11. Thim L, Hansen MT, Norris K, Hoegh I, Boel E, Forstrom J, Ammerer G, Fiil NP: Secretion and processing of insulin precursors in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986. 10.1073/pnas.83.18.6766.
12. Kjeldsen T: Yeast secretory expression of insulin precursors. Appl Microbiol

Biotechnol. 2000. 10.1007/s002530000402.					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розроб.</i>	<i>Бондар А.О.</i>				<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Конс.</i>						<i>92</i>	<i>98</i>
<i>Керівн.</i>	<i>Сироїд О.О.</i>				<i>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ</i>		
<i>Затверд.</i>					<i>КПІ ім. І. Сікорського, ФБТ</i>		

13. Frank B: Manipulation of the position of proline in the B chain produced monomeric insulins, 1991.
14. Havelund S, Plum A, Ribel U, Jonassen I, Volund A, Markussen J, Kurtzhals P: The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin. Pharm Res. 2004. 10.1023/B: PHAM.0000036926.54824.37.
15. Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig W, Grinna L: High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast pichia pastoris. Biotechnology. 1987. 10.1038/nbt1287-1305.
16. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Book Review (недоступная ссылка) Int. J. of Syst. Bact.; July 1985, p. 408
17. M. Basavaraju and B.S. Gunashree: Escherichia coli: An Overview of Main Characteristics. Intechopen. 2022. 10.5772/intechopen.105508.
18. Університет ім. П. А. Столыпина «Биологические характеристики бактерии ESCHERICIA COLI» Мікробіологія, реферат, 2008. URL: <https://studfile.net/preview/1152611/page:3/#1152611> (дата звернення 12.06.2023)
19. Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification. Prog Lipid Res. 2010.
20. Jianli Wang, Wenjian Ma & Xiaoyuan Wang: Insights into the structure of Escherichia coli outer membrane as the target for engineering microbial cell factories. 2021.
21. C.A. Batt: ESCHERICIA COLI | Escherichia coli. Encyclopedia of Food Microbiology. 2014
22. Германов Н.И. 'Микробиология' - Москва: Просвещение, 2010 - с.227.
23. «Escherichia coli (E. coli) морфологія, розташування, культуральні характеристики, діагностика», Microbiologynote, стаття, остання редакція 2023.
24. Robert D. Utiger, «Insulin», Britannica, article, 2023. URL: <https://www.britannica.com/science/insulin> (дата звернення 13.06.2023)
25. «Diabetes and insulin», Betterhealth, article, 2021. URL: <https://www.betterhealth.vic.gov.au/health/conditionsandtreatments/diabetes-and-insulin> (дата звернення 13.06.2023)

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		93

26. «Инсулинотерапия — умное лечение», Аптека.ua, статья, 2003. Режим доступа: <https://www.apteka.ua/article/14181> (дата звернення 11.06.2023)
27. Андреевичева Т.Ю. Баландина Л.В. Костакова Г.А. «СПОСОБ ОЧИСТКИ ИНСУЛИНА», 2000, RU 2146944
28. Мальцев К.В, Мирошников А.И, Вульфсон А.Н, Гаврюченкова Л.П., Громова О.А. «Способ выделения и очистки инсулина или его биотехнологических предшественников», патент, 1997. URL: <https://findpatent.ru/patent/208/2081122.html> (дата звернення 12.06.2023)
29. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0: Insulin, human, 2005:0838. URL: <http://www.uspbpep.com/ep50/Insulin,%20human.pdf> (дата звернення 12.06.2023)
30. The United States Pharmacopeial Convention: Insulin. 2019. URL: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/insulin-ira-guid-bdc7d5e6-856e-4b9e-9c33-fcf20d01e040.pdf (дата звернення 12.06.2023)
31. Rhodes CJ (2004). Processing of the Insulin Molecule. У LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM. Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text (вид. 3rd). American Institute of History of Pharmacy. ISBN 0-7817-4097-5
32. Біохімія: посібник для вузів/ під ред. Е.С.Северина - 5-е вид., - 2009. - 768 с. URL: <https://studfile.net/preview/2244032/page/7/> (дата звернення 12.06.2023)
33. В.М. Шийбак. «Биохимические механизмы синтеза и секреции инсулина», hepatology and gastroenterology №1, 2017.
34. Bilous, Rudy W (2010). Handbook of diabetes (вид. 4th). Wiley-Blackwell. ISBN 978-1-4051-8409-0.
35. Біологічна хімія / Л.М. Вороніна, В.Ф. Десенко, Н.М. Мадієвська та ін. — Х., 2000.
36. Ajala, Oluwole & Alshammary, Miznah & Alzamel, Mai & Gao, Jia & Iliopoulos, Costas & Radoszewski, Jakub & Rytter, Wojciech & Watson, Bruce. (2019). On the cyclic regularities of strings.

37. JM109 Competent Cells. URL: <https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200235.pdf> (дата звернення: 15.06.2023).
38. Walsh G, Jefferis R: Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol.* 2006, 24: 1241-1252.
39. Huang CJ, Lin H, Yang X: Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2012, 39: 383-399.
40. Overton TW: Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today.* 2014, 19 (5): 590-601.
41. De Marco A: Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat Protoc.* 2007, 2 (10): 2632-2639.
42. Elbing KL, Brent R. Recipes and Tools for Culture of *Escherichia coli*. *Curr Protoc Mol Biol.* 2019 Jan;125(1):e83.
43. Walker GC. The SOS response of *Escherichia coli*. In: Ingraham J, Low KB, Magasnik B, Niedhart F, Schaecter M, et al., editors. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Vols. I and II. Washington (D.C.): American Society of Microbiology; 1987. Chapter 89.
44. Tang M, Shen X, Frank EG, O'Donnell M, Woodgate R, et al. UmuD'2C is an error-prone DNA polymerase, *Escherichia coli* Pol V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8919–8924.
45. RU2376368C2 - strain of bacteria *Escherichia coli* JM109/pHINS21 - producer of hybrid protein with human proinsulin and method for production of human proinsulin - Google Patents. URL: <https://patents.google.com/patent/RU2376368C2/en> (дата звернення: 15.06.2023)
46. Fischer E, Sauer U: Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur J Biochem.* 2003, 270: 880-891.
47. Zhang Z, Gosset G, Barabote R, Gonzalez CS, Cuevas WA, Saier MH: Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2005, 187: 980-990.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
						95
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

- проектування: Навч. посібник. /Ю.І. Сидоров, Р.Й. Влязло, В.П. Новіков- Львів: «Інтелект-Захід», 2008.- 736 с
59. Ю.В. КАРЛАШ. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій. Київ: НУХТ, 2013
60. В.М. Поводзинський. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій. Київ: НУХТ, 2006
61. Оборудование микробиологических производств /К.А.Калунянц, Л.И. Голгер// Москва, Агропроиздат, 1987 – 398с.
62. ГОСТ 20680-86 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Общие технические требования».
63. Цвігун С.П. Процеси і апарати харчових виробництв: Конспект лекцій. Київ, 2010.
64. Т.П. Пирог, О.А. Ігнатова. Загальна біотехнологія: Підручник. Київ: НУХТ, 2009. – 336с.
65. «Охорона праці під час виробництва лікарських засобів» - Служба охорони праці (СОП): веб сайт. URL: <https://pro-op.com.ua/article/1265-ohorona-prats-pd-chas-virobnitstva-lkarskih-zasobv> (дата звернення 16.06.2023)
66. Охорона праці та охорона праці в галузі: Курс лекцій / укладач: С. В. Супрунович, Луцьк: ВНУ імені Лесі Українки, 2021. 50 с.
67. Кишкова паличка в організмі людини: роль та значення – Освіта.UA, реферат: веб-сайт, URL: <https://ru.osvita.ua/vnz/reports/biolog/27269/> (дата звернення 18.06.2023)
68. Escherichia coli – Wikipedia, стаття, веб-сайт. URL:https://de.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli(дата звернення 18.06.2023)
69. Insulin – TeachMePhysiology, стаття, веб-сайт. URL: <https://teachmephysiology.com/endocrine-system/pancreas/insulin/>(дата звернення 18.06.2023)
70. Інсулін – Вікіпедія, стаття, веб-сайт. URL: <https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%86%D0%BD%D1%81%D1%83%D0%BB%D1%96%D0%BD>(дата звернення 18.06.2023)

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		97

71. Перемішування матеріалів – Allreferat, реферат, веб-сайт. URL: https://allreferat.com.ua/uk/tehnologii_remont_avtomobili/referat/3763/page/2(дата звернення 18.06.2023)

72. Ружинська Л.І. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв. Навч. посібник/ Укладачі: Л.І. Ружинська, І А Буртна, В.М.Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: НТУУ «КПІ», 2014 – 130 с.

					<i>ДП БТ-9202.00 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		<i>98</i>

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології та біофармації

ГРАФІЧНИЙ ІЛЮСТРАЦІЙНИЙ МАТЕРІАЛ

до дипломного проєкту
рівень вищої освіти перший (бакалаврський)
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

**Тема: Технологія виробництва рекомбінантного інсуліну людини
середньої тривлості дії. Дільниця виробничого біосинтезу**

Виконав:

Студент групи БТ-92

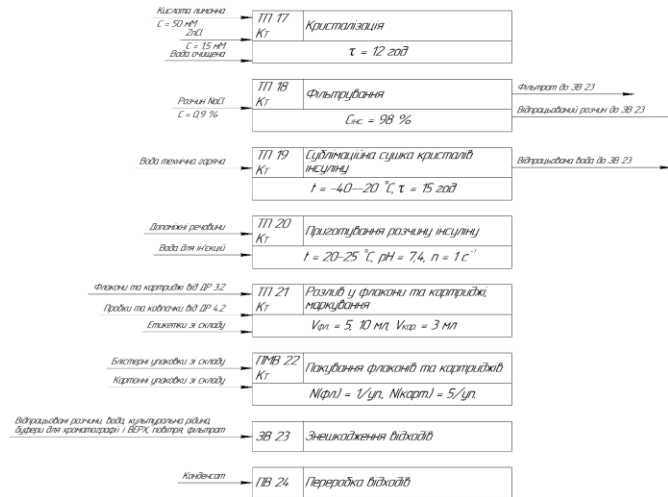
Бондар Артем Олександрович

Керівник:

асистент. каф. пром.

біотехнології та біофармації,

Сироїд О.О.



АРМІН-20 Інформаційна система © 2021 ДП "ЛП" "Система управління" Розробка для графічного оформлення
 ЛПВ 1/2021
 ЛПВ 1/2021
 ЛПВ 1/2021
 ЛПВ 1/2021

Не для комерційного використання

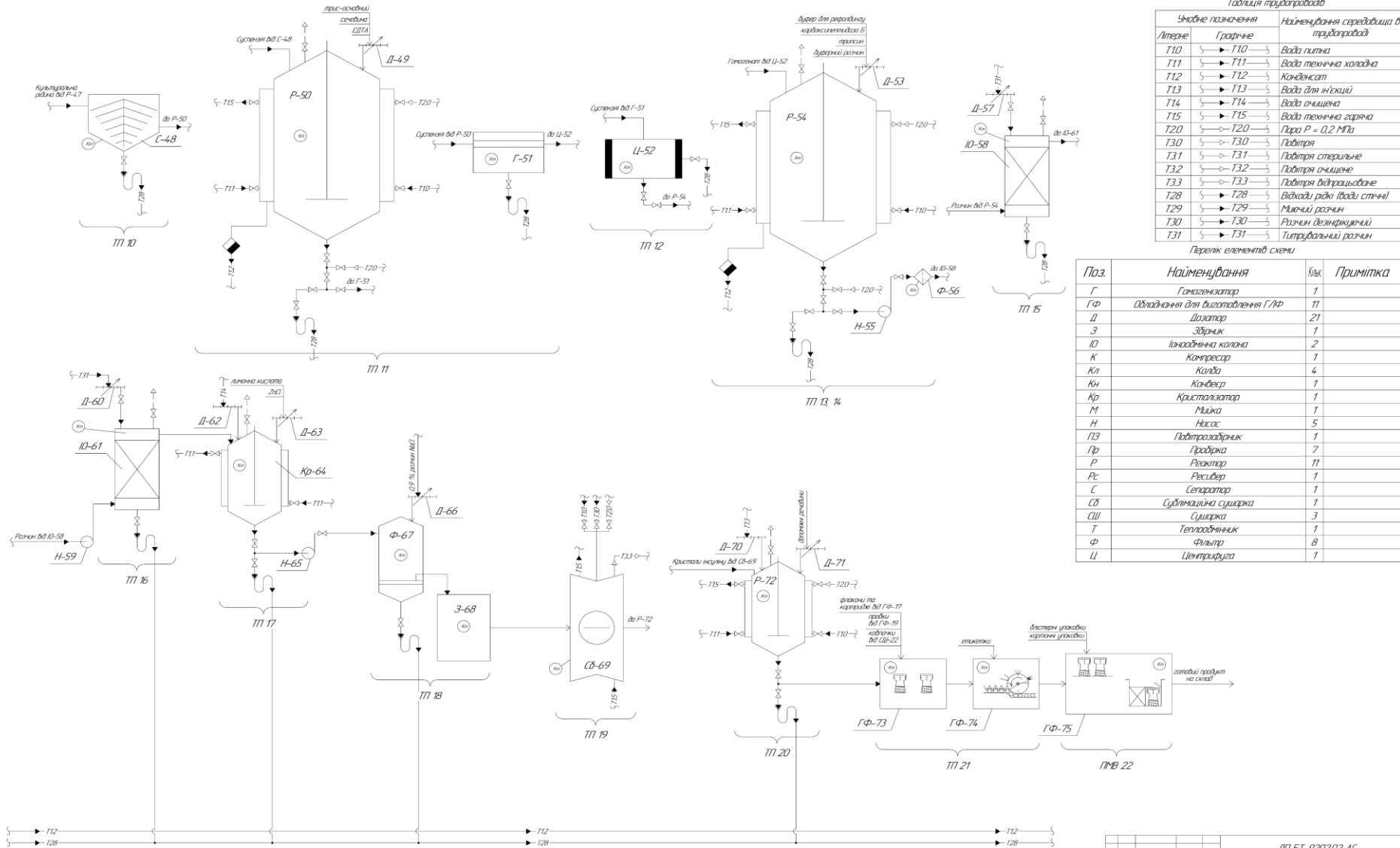
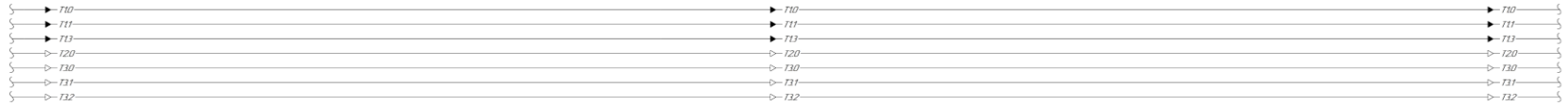


Таблица трубопроводов

Литера	Графичне	Найменування середовища в трубопроводі
T10	→ T10	Вода питна
T11	→ T11	Вода технічна холодна
T12	→ T12	Конденсат
T13	→ T13	Вода для інжекції
T14	→ T14	Вода очищена
T15	→ T15	Вода технічна гаряча
T20	→ T20	Пара P = 0,2 МПа
T30	→ T30	Повітря
T31	→ T31	Повітря стерильне
T32	→ T32	Повітря очищене
T33	→ T33	Повітря відрацьоване
T28	→ T28	Відходи ріди (води стічні)
T29	→ T29	Молочні розчини
T30	→ T30	Розчин дезінфекційний
T31	→ T31	Тирубальний розчин

Перелік елементів схеми

Поз.	Найменування	Кільк.	Примітка
Г	Гомогенізатор	1	
ГФ	Обладнання для виспавлення Г/ФР	11	
Д	Дозатор	21	
З	Збірник	1	
Ю	Іонаобмінна колонка	2	
К	Компресор	1	
Кл	Конда	4	
Кн	Конвеєр	1	
Кр	Кристалізатор	1	
М	Миця	1	
Н	Насос	5	
ПЗ	Підтрозабірник	1	
Пр	Пробірка	2	
Р	Реактор	11	
Рс	Ресивер	1	
С	Сепаратор	1	
СВ	Сублімаційна сушарка	1	
СШ	Сушарка	3	
Т	Теплообмінник	1	
Ф	Фільтр	8	
Ц	Центрифуга	1	

КРПМНС-01/02 Інформація про авторів: © 2021 ДП "АКОН-Система проєктування", м. Київ, вул. М. Гоголя, 10/11, 01011
 Для комерційного використання

