

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО ”

Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра промислової біотехнології

"На правах рукопису"  
УДК 579.61

До захисту допущено  
Завідувач кафедри  
Тетяна ГОДОСІЙЧУК  
“ 09 ” квітня 2021 р.

## Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра  
за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»  
спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія

на тему: Отримання рекомбінантного білка-аналога рецепторзв'язуючого домена SARS-Cov-2 з використанням білок-експресуючої системи *Escherischia coli*

Виконав студент 2 курсу, групи БТ-91мн  
Тітов Андрій Вадимович

Науковий керівник: професор кафедри промислової біотехнології, д.б.н., Дуган О. М.

Консультант з старт-апу  
к.е.н., доцент кафедри економіки і підприємництва  
Ткаченко Т. П.

Рецензент: головний технолог ПрАТ «НВК «ДІАПРОФ-МЕД»  
Горлов А. Ю.  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студента \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2021

**Національний технічний університет України**  
**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**  
**Факультет біотехнології і біотехніки**  
**Кафедра промислової біотехнології**

Рівень вищої освіти - другий (магістерський)

Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Освітньо-наукова програма Біотехнології

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри промислової  
біотехнології

\_\_\_\_\_ Тетяна ГОДОСІЙЧУК  
(підпис)

“17” лютого 2021 р.

### ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студентіві

Тітову Андрію Вадимовичу

1. Тема дисертації Отримання рекомбінантного білка-аналога рецепторзв'язуючого домена SARS-Cov-2 з використанням білок-експресуючої системи Escherischia coli  
науковий керівник дисертації \_\_\_\_\_ Дуган Олексій Мартим'янович  
професор кафедри промислової біотехнології, д.б.н.  
затверджені наказом по університету від “ 12 ” квітня 2021 р. № 993-с
2. Термін подання студентом дисертації “ \_\_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2021 р.
3. Об'єкт дослідження штами-продуценти E. coli Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD та E. coli BL21(DE3)/pET28a-GST-RBD
4. Предмет дослідження отримання високоефективної фракції рекомбінантного білку GST-RBD.
5. Перелік завдань, які потрібно розробити:  
1) детальне ознайомлення з морфолого-фізіологічними та культуральними особливостями продуцентів, методами отримання промислових штамів; 2) дослідження впливу поживного середовища, умов культивування, концентрації хімічного індуктора на вихід високоефективної фракції білку; 3) підбір адекватної математичної моделі для опису кривих росту досліджуваного мікроорганізму; 4) відпрацювання методів очищення цільового продукту; 5) розробка стартап проекту та розрахування собівартості впровадження у виробництво ІФА тест-системи на основі отриманого рекомбінантного білку.
6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу \_\_\_\_\_ графіки, \_\_\_\_\_ математичних моделей кривих росту мікроорганізму отриманих під час експерименту; графік, що відображає економічні процеси під час розробки економічної частини дипломного проекту.

7. Орієнтовний перелік публікацій \_\_\_\_\_ 3 тези конференцій \_\_\_\_\_

8. Консультанти розділів дисертації

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Старт-ап	Ткаченко Т.П. к.е.н., доц. каф. економіки і підприємництва		

9. Дата видачі завдання “ 17 ” лютого 2021 р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Літературний огляд. Дослідження стану проблеми.	18.01.2021р.	
2	Оптимізація умов мікробної експресії розчинної форми рекомбінантного білка	28.01.2021р.	
3	Відпрацювання технології хроматографічного очищення рекомбінантного протеїну	12.02.2021р.	
4	Розробка стартап-проекту	26.02.2021р.	
5	Статистична обробка експериментальних даних	8.03.2021р.	
6	Оформлення магістерської дисертації	12.03.2021р.	
7	Подання дисертації до ЕК	17.05.2021р.	

Студент \_\_\_\_\_

Андрій ТІТОВ

Науковий керівник \_\_\_\_\_

Олексій ДУГАН

## РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація містить 77 с., 14 рис., 31 табл., 82 посилання.

Пандемія коронавірусної інфекції, спричинена новим збудником SARS-CoV-2, стрімко поширилась на всіх континентах і становить серйозну загрозу для здоров'я людей. В умовах пандемічної ситуації є важливим розробка вітчизняних діагностичних тест- систем призначених для аналізу сироватки або плазми крові на нуклеокапсидний антиген вірусу Sars-CoV-2.

Робота виконувалась на базі науково-виробничої компанії «Діапроф-Мед».

Мета роботи - розробка технології виробництва рекомбінантного аналога білка вірусу SARS-Cov-2.

Завдання дослідження:

- 1) детальне ознайомлення з морфолого-фізіологічними та культуральними особливостями продуцентів, методами отримання промислових штамів;
- 2) дослідження впливу поживного середовища, умов культивування, концентрації хімічного індуктора на вихід високоефективної фракції білку;
- 3) підбір адекватної математичної моделі для опису кривих росту досліджуваного мікроорганізма;
- 4) відпрацювання методів очищення цільового продукту;
- 5) розрахування собівартості впровадження у виробництво ІФА тест-системи на основі отриманого рекомбінантного білку.

Запропоновано, в якості продуцента рекомбінантного білку, використовувати штам *E. coli* Rosetta (DE3) з плазмідною *pET28a-GST-RBD*.

Предмет дослідження: отримання високоефективної фракції рекомбінантного білку *GST-RBD*.

В роботі застосовані хімічні, біологічні, мікробіологічні, імунологічні, статистичні, аналітичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів: досліджено оптимальні умови отримання розчинної фракції протеїну, поживне середовище ТВ, температура культивування – 37 °С, концентрація ПТГ – 0,1 мМ, проведення індукції за оптичної густини – 0,3 о.о та час культивування після індукції – 4 години.

Отриманий препарат може бути використаний для створення ІФА тест-систем за для виявлення інфікування SARS-CoV-2, або для перевірки ефективності вакцинування (Індійська вакцина Covishield спрямована на утворення антитіл до RBD антигенів). Також препарат може бути використаний у складі діагностичної системи як додатковий антиген для збільшення специфічності тестування.

За темою дисертації було опубліковано 5 наукових праць, у тому числі: 1 наукова стаття та 4 тези на всеукраїнських та міжнародних конференціях.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** РЕКОМБІНАНТНИЙ БЛОК, SPIKE, ВІРУС SARS-COV-2, ESCHERICHIA COLI, ROSETTA (DE3), ПТГ, ЛОГІСТИЧНА ФУНКЦІЯ ФЕРХЮЛЬСТА, МЕТОД ІМАХ, АФІННА ХРОМАТОГРАФІЯ, АТЗТ НВК ДІАПРОФ МЕД.

## ABSTRACT

The graduation project contains 77 pages, 14 figures, 31 tables, 82 references.

The coronavirus pandemic, caused by the new SARS-CoV-2 pathogen, has spread rapidly across all continents and poses a serious threat to human health. In a pandemic situation, it is important to develop domestic diagnostic test systems designed to analyze serum or plasma for nucleocapsid antigen of Sars-CoV-2 virus.

The work was performed on the basis of the research and production company "Diaprof-Med".

Therefore, the aim of the work was to develop a technology for the production of a recombinant analog of the SARS-Cov-2 virus.

The objectives of the research were:

- 1) detailed acquaintance with morphological-physiological and cultural features of producers, methods of obtaining industrial strains,
- 2) study of the influence of nutrient medium, cultivation conditions, concentration of chemical inducer on the yield of highly efficient protein fraction;
- 3) selection of an adequate mathematical model to describe the growth curves of the studied microorganism;
- 4) development of methods of purification of the target product;
- 5) calculation of the cost of introduction into production of ELISA test system on the basis of the received recombinant protein.

It is proposed to use as a producer of recombinant protein strain of E. coli Rosetta (DE3) with plasmid: pET28a-GST-RBD.

Subject of research: obtaining a highly efficient fraction of recombinant GST-RBD protein.

Research methods are used in the work: chemical, biological, microbiological, immunological, statistical, analytical methods.

Scientific novelty of the obtained results: the optimal conditions for obtaining the soluble fraction of protein, nutrient medium TB, cultivation temperature - 37 °C, IPTG concentration - 0.1 mM, induction at optical density - 0.3 o.d. and cultivation time after induction - 4 hours. The resulting drug can be used to create ELISA test-systems for the detection of SARS-CoV-2 infection, or to test the effectiveness of vaccination (Indian vaccine Covishield aims to form antibodies to RBD antigens). The drug can also be used in the diagnostic system as an additional antigen to increase the specificity of testing.

On the topic of the dissertation was published 5 scientific papers, including: 1 scientific article and 4 abstracts at national and international conferences.

KEY WORDS: RECOMBINANT PROTEIN, SPIKE, SARS-COV-2 VIRUS, ESCHERICHIA COLI, ROSETTA(DE3), IPTG, LOGISTIC FUNCTION OF FERHULST, IMAX METHOD, AFFINITY CHROMATOGRAPHY, ATZT NVK DIAPROF MED.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ .....	9
ВСТУП .....	10
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	14
1.1. Класифікація продуцента .....	14
1.2. Можливі проблеми під час синтезу рекомбінантного білка .....	23
1.3. Характеристика рекомбінантного білка .....	27
1.4. Компонентний склад мікробіологічного препарату .....	29
<b>РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА</b> .....	31
<b>2.1. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b> .....	31
<b>2.2. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ</b> .....	37
2.2.1. Відбір клона-продуцента рекомбінантного білка GST-RBD .....	37
2.2.2. Оптимізація умов мікробної експресії розчиненої форми рекомбінантного протеїну <i>GST-RBD</i> .....	40
2.2.3. Математичне моделювання кривих росту штама-продуцента та визначення його фізіологічної активності .....	42
2.2.4. Відпрацювання технології хроматографічного очищення рекомбінантного протеїну <i>GST-RBD</i> .....	45
<b>РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ</b> .....	47
3.1. Резюме стартап-проекту .....	47
3.2. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу .....	49
3.3. Визначення ключових факторів успіху проекту .....	53
3.4. Визначення потенційних споживачів .....	54
3.5. Ціна інноваційної пропозиції на ринку .....	57
3.6. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту .....	65
3.7. Ризики стартап-проекту та методи управління ними .....	67
ВИСНОВКИ .....	71
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	72

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

ПЛР – полімеразно ланцюгова реакція

ІФА – імуноферментний аналіз

ІМАХ – іммобілізаційна метал-афінна хроматографія

кДа - атомна одиниця маси (а.о.м., інша назва Дальтон)

LB – поживне середовище (англ. Lysogeny broth – літичне середовище)

ОГ – оптична густина

о.о. – оптичні одиниці

ТВ - поживне середовище (англ. Terrific broth – дивовижне середовище)

ПТГ - ізопропіл - $\beta$ -D-1-тіогалактопіранозид

ПААГ-SDS - електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію

ТЕМЕД – тетраметилендіамід

Таг –“Protein tags”- це пептидні послідовності, генетично прищеплені до рекомбінантного білка

В - Річний обсяг реалізації

Чсп – чисельність персоналу за списком

Чяв – кількість персоналу на зміні

Кпер – кількість змін на день

ПП с.р – середньорічний виробіток працівника

К – капіталовкладення

ОФ – основні фонди

ОбК – оборотні фонди

П – прибуток

Ц – ціна продукції

С – собівартість продукції

Р – рентабельність

Тпов – період повернення капіталовкладень

ФВ – фондівдача виробничих фондів

ФС – фондоємність

ПП – продуктивність праці

Е - коефіцієнт економічної ефективності

## ВСТУП

В грудні 2019 року в місті Ухань (Китайська Народна Республіка) виник спалах атипової пневмонії, викликана  $\beta$ -коронавірусом. 12 січня 2020 р. він був визначений Всесвітньою організацією охорони здоров'я як новий коронавірус (2019-nCoV), а захворювання названо коронавірусною хворобою (Coronavirus Diseases -2019, COVID-19). Міжнародний комітет з вивчення коронавірусів (SCG) 11 лютого запропонував називати новий вірус Sars-CoV-2 [1,2].

Розповсюдження Sars-CoV-2 відбувається повітряно-крапельним шляхом від людини до людини, головним чином, між членами родини, родичами та друзями, що тісно спілкуються з хворим чи інфікованим під час інкубаційного періоду. Через швидке поширення по світу, захворювання отримало статус пандемії й визнано пріоритетом №1 для боротьби в багатьох країнах світу [3].

Найбільш вразливими верствами населення є люди похилого віку, при цьому, рівень смертності зростає у геометричній прогресії приблизно після 65 років. Наступною можна виділити групу людей, що мають хронічні захворювання (серцево-судинні захворювання, діабет, хронічні захворювання дихальних шляхів, тощо), перенесли складні хірургічні втручання, онкохворі. До того ж, одним з факторів, що впливає на перебіг захворювання та смертність, є спосіб життя. Легені, ослабленні палінням, більш вразливі до респіраторних захворювань [4].

Епідемія коронавірусу ставить багато викликів перед людством. До них відносяться: розробка методів індивідуального захисту, лікування, діагностування хвороби та вдосконалення культури гігієни.

Зокрема медична система світу не була готова до такої активності вірусу-й швидкого розповсюдження захворювання. У групі ризику захворіти присутні особи, які за своєю професійною діяльністю, мають найпоширеніший контакт з широкими верствами населення: працівники медичної, педагогічної, правоохоронної і соціальної сфер. І, саме через свою діяльність, вони є гіпотетичними подальшими розповсюджувачами вірусу.

Для підвищення контролю за розповсюдженням захворювання є необхідним впровадження масового тестування населення, та періодичного і ретельного обстеження працівників відповідних сфер діяльності у групі “ризик”. Основними методами діагностування є [5-9]:

- Тести полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) – орієнтовані на пошук РНК вірусу, які вказують на її наявність/відсутність в організмі пацієнта. Дані МОЗ показують 100% ефективність цих тестів лише у перші 7 днів хвороби, на другому тижні їхня ефективність складає приблизно 20% [10].
- Імуноферментний аналіз (ІФА) — це вид аналізу, за допомогою якого виявляється комплекс «антиген — антитіло», який виробляється коли організм уражений вірусом [11, 12].

Застосування тестів ІФА має ряд переваг перед ПЛР тестуванням, а саме: вартість аналізу, можливість вказати на якому етапі хвороби пацієнт чи вже перехворів. В Україні є велика мережа лабораторій, що здатна проводити перераховані аналізи. Окрім наведеного, застосування ІФА-тестів покликано розвантажити ПЛР-діагностування і перевірити - чи отримав пацієнт імунітет після вакцинування [13-15].

В умовах пандемічної ситуації є важливим розробка вітчизняних тест-систем призначених для аналізу сироватки або плазми крові на нуклеокапсидний антиген вірусу Sars-CoV-2.

Як експресуюча система була обрана *Escherichia coli* – найбільш вивчена та широко використовувана система для отримання чужорідних білків про- та еукаріотичного походження, на основі яких розробляють лікарські та діагностичні препарати.

Ефективність мікробного синтезу та якість рекомбінантного протеїну залежить від багатьох факторів, серед яких важливий вплив здійснює фізіологічний стан культури клітин на момент індукції.

Вже досліджено та описано у науковій літературі фази росту біологічних популяцій, зокрема і мікробних. Для кількісної характеристики фізіологічної активності застосовують такі кінетичні показники: питома швидкість росту та

відмирання бактеріальних клітин, середній час генерації, тощо. Для промислового культивування широкого поширення отримав метод, за допомогою якого можливо встановити закономірності ростових процесів і визначити вплив зовнішніх факторів. Такій підхід є ефективним при дослідженні динаміки росту мікробного продуцента *E. coli* в контрольованій індукцибельними промоторами експресійній системі [16].

Тому, актуальність даної роботи полягає у відпрацюванні умов культивування нових штамів *E. coli* в лабораторних умовах з подальшим масштабуванням виробництва.

У зв'язку з цим, мета нашої роботи полягала у підборі умов для отримання високоефективної фракції білку RBD зі штамму-продуцента *E. coli* Rosetta/pET28a-GST-RBD за промислового культивування

До задач дослідження належало:

- 1) детальне ознайомлення з морфолого-фізіологічними та культуральними особливостями продуцентів, методами отримання промислових штамів,
- 2) дослідження впливу поживного середовища, умов культивування, концентрації хімічного індуктора на вихід високоефективної фракції білку;
- 3) підбір адекватної математичної моделі для опису кривих росту досліджуваного мікроорганізму;
- 4) відпрацювання методів очищення цільового продукту;
- 5) розрахування собівартості впровадження у виробництво ІФА тест-системи на основі отриманого рекомбінантного білку.

За темою дисертації було опубліковано 5 наукових праць, у тому числі: 1 стаття подана до друку в журнал (СКОПУС) та 4 тези на всеукраїнських та міжнародних конференціях.

В перше, було досліджено вплив поживного середовища та умов культивування на отримання високоефективної фракції рекомбінантного білка GST-RBD, в перше застосовано логістичну функцію Ферхюльста для штаму *E. coli* Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD та відпрацьовано методи очищення цільового продукту.

Отримані результати були застосовані на підприємстві ПрАТ "НВК"Діапроф-Мед", під час виробництва ІФА тест-систем DIA®-SARS-CoV-2 С СЕ.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Виробництво рекомбінантних білків у мікробних системах змінило біохімію білків. Раніше для отримання невеликих кількостей цільового білка необхідні були кілограми тваринних чи рослинних тканин, або величезні обсяги біологічних рідин. Здатність експресувати, очищати, та отримувати бажаний рекомбінантний білок у великих кількостях відкриває величезні можливості його використання в наукових дослідженнях для створення нових комерційних продуктів [17].

### 1.1. Класифікація продуцента

Вибір клітини хазяїна продуцента є дуже важливим. Це визначає певну технологію, необхідну для реалізації різноманітних проектних рішень, будь то молекулярні інструменти для втручання в клітини тварин, рослин, або мікроорганізмів, розробка обладнання чи реагентів.

Серед доступних для досліджень родів і видів мікроорганізмів є бактерії, дріжджі, нитчасті гриби та одноклітинні водорості. Представники перерахованих родів мають сильні та слабкі сторони, і їх вибір може підпорядковуватися білку, який може бути цікавим або досліднику, або відповідним фірмам-виробникам біологічно-активних речовин, вакцин, чи сироваток. Наприклад, якщо потрібні еукаріотичні посттрансляційні модифікації білка (наприклад, глікозилювання білка), то система експресії прокариотів для цього може бути непридатною, тощо [18].

Обраним нами організмом-продуцентом для отримання рекомбінантного білка, є *Escherichia coli*. Її штами-продуценти відносяться до IV групи патогенності (умовно-патогенні) за класифікацією Державних санітарних правил ДСП 9.9.5.03599 «Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності» [2]. Систематичне положення *E. Coli*: царство: *Bacteria* (Бактерії); тип: *Proteobacteria* (протеобактерії); клас: *Gamma Proteobacteria* (Гамма-протеобактерії); порядок: *Enterobacteriales*; сімейство: *Enterobacteriaceae*; рід: *Escherichia*; вид: *Escherichia coli* (Кишкова паличка).

**Морфолого-цитологічні ознаки** Для отримання цільового білку було створено 2 штами: *E. coli* BL21(DE3)pLysS/pET28a-GST-RBD та *E. coli* Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD. На основі клітин реципієнтів: *E. coli* BL21(DE3)pLysS, *E. coli* Rosetta (DE3). В якості плазмиди було застосовано *pET28a-GST-RBD*, яка продукує поліпептид з молекулярною масою ~36 кДа.

*Escherichia coli* – це Грамм негативні, поодинокі чи в парах, прямі палички, розміром 1,1-1,5x2,0-6,0 мкм. Містять багато надмолекулярних компонентів, у тому числі: внутрішню та зовнішню мембрану стінку, периплазму, кристалічний S шар, джгутики, пілі або фімбри, цитоплазму, тільця включення, нуклеоїд (хромосома), полісоми, плазмиду. Рух відбувається за допомогою перетрихіальних джгутиків або нерухомі [19]. Не утворюють спори.

**Культуральні ознаки** На щільних поживних середовищах *E. coli* утворюють вологі, круглі, опуклі колонії середньої величини, з гладкою блискучою поверхнею і рівним краєм (S-форма). Або R-форма: пласкі та сухі, зі злегка хвилястим краєм і шорсткою поверхнею. У рідких середовищах ростуть у вигляді інтенсивного рівномірного помутніння середовища з утворенням осаду, іноді плівкою на поверхні, або кільцями на стінці пробірки. Осад розбивається при струшуванні з утворенням гомогенної суспензії. На диференційно-діагностичних середовищах (Ендо, ЕМС, Плоскірева) ешерихії розщеплюють лактозу з накопиченням кислоти, внаслідок чого змінюється забарвлення індикатора, тому колонії мають яскраве забарвлення:

- на середовищі Ендо – виростають колонії малинового кольору з металевим блиском, або і без нього;
- на середовищі ЕМС (Левіна) – виростають темно-фіолетові колонії з металевим блиском і без нього;
- на середовищі Плоскірева – червоні колонії з жовтуватим відтінком;

Проба з метиленовим червоним - позитивна. Реакція Фогеса-Проскауера - негативна. Зазвичай - цитратнегативні. Негативні за ознакою утворення  $H_2S$ , гідроліза сечовини і активності ліпази. О-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозидпозитивні. Добре виражені сахаролітичні властивості:

розщеплюють глюкозу, лактозу, маніт, мальтозу, сахарозу, арабінозу та інші вуглеводи до кислоти і газу (є штами, які не ферментують лактозу і сахарозу); відновлюють нітрати до нітритів; протеолітичні властивості виражені слабо: ешерихії утворюють індол [20, 21].

**Фізіолого-біохімічні ознаки.** Факультативні анаероби, що володіють як дихальним, так і бродильним типом метаболізму. Оптимальна температура культивування 37 °С, але здатні до зростання в широкому діапазоні температур від 10 до 45°С. Оптимальний рН=7,0-7,5. При культивуванні на багатих середовищах, за оптимальних умов, час її подвоєння становить близько 20 хв. (варто вказати, що експресія рекомбінантного білка може надати метаболічне навантаження на мікроорганізм, що, у свою чергу, призведе до значного збільшення часу генерації, тобто, часу подвоєння).

Теоретична межа щільності культури в культуральній рідині, за оцінками, становить близько 200 г сухої маси клітин/л або приблизно  $1 \times 10^{13}$  життєздатних клітин/мл [22]. Однак, експоненціальне зростання на складних середовищах призводить до щільності, що не наближається до цієї кількості. Наприклад, за періодичного вирощування кишкової палички при 37°С із використанням середовища LB, отримують менше  $1 \times 10^{10}$  клітин/мл [23], що значно менше від теоретично розрахованого.

Елективне середовище г/л: ферментний гідролізат казеїну – 17; папаїновий перевар соєвої муки – 3; суміш солей жовчних кислот – 1,12; глюкоза - 2,5; натрій хлорид – 5; калій гідрофосфат – 4. Кінцеве значення рН (при 25 °С)  $7,3 \pm 0,2$ ; рівень рН при необхідності доводять натрій гідроксидом.

Для промислового культивування підходить середовище Luna-Bertam (LB) г/л: триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5; натрій хлорид – 5. рН середовища 7,0-7,2. При необхідності рівень рН доводять натрій гідроксидом.

Триптон забезпечує поживне середовище азотом, вуглецем, вітамінами, мінералами та амінокислотами. Дріжджовий екстракт є джерелом вітамінів (особливо вітамінів В-групи). Пептон або гідроліз казеїну є джерелом амінокислот та низькомолекулярних пептонів. Глюкоза або гліцерин слугують

джерелом енергії. Солі фосфатів калію ( $K_2HPO_4$  та  $KH_2PO_4$ ) виконують функцію буферних розчинів для запобігання зниження рН під час росту бактерій. NaCl забезпечує відповідний осмос для мембран. Також в поживні середовища можуть включатись додатково солі як макроелементів:  $K^+$  (якщо не входить до складу буферних розчинів),  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , так і мікроелементів:  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  тощо - усі вони можуть каталізувати різні процеси, або входити до складу певного ферменту. При підборі поживного середовища також необхідно звертати увагу на цільовий продукт, а саме, на необхідні речовини для його синтезу, та запобігати можливій взаємодії деяких компонентів поживного середовища із цільовим продуктом.

*E. coli* є чутливими до антибіотиків, але може швидко адаптуватись, набувати резистентності до них. Це є одним із ключових моментів, що використовують у біотехнології та генній інженерії для створення різноманітних рекомбінантних білків.

Природна резистентність - це постійна видова ознака бактерій і легко прогнозована. Справжня природна стійкість характеризується відсутністю у мікроорганізмів мішеней для впливу антибіотика [24].

Під набутою стійкістю розуміють властивість деяких штамів мікроорганізмів не гинути за концентрації антибіотика, що пригнічує основну частину мікробної популяції.

Можливі ситуації, коли більша частина мікробної популяції проявляє набуту стійкість. Формування резистентності у всіх випадках зумовлено або набуттям нової генетичної інформації, або зміною рівня експресії певних генів [25].

Є два принципових генетичних механізми необхідних для формування резистентності до антибіотиків. Це набуття нових для бактерії генів детермінантів резистентності. Найчастіше детермінантами резистентності слугують плазмідни чи транспозони [25].

Через наявність плазмідни обраний нами штам-продуцент рекомбінантного білка є стійким до антибіотика - канаміцину.

**Антигенні властивості.** У *Escherichia coli* було виявлено три типи антигенів: О-, К- і Н-антиген. О-антиген – соматичний, це ліпополісахарид клітинної стінки і він є термостабільним. За О-антигеном визначають серологічну групу ешерихій. Відомо 171 різновидів О-антигену.

К-антиген – капсульний. Може бути представлений трьома антигенами: А, В, і L, які відрізняються чутливістю до температури та різних хімічних речовин. Найбільше практичне значення віднайшов В-антиген. За структурою К-антигену виділено 100 сероваріантів ешерихій. К-антиген володіє здатністю до маскувати О-антиген, викликаючи феномен О-інаглютинабельності. У такому випадку О-антиген можна виділити лише після руйнування К-антигену (наприклад: кип'ятінням, тощо). Н-антиген (джгутиковий) має білкову природу і є термолабільним. Відомо 57 типів Н-антигену у ешерихій. Антигенну структуру *E. coli* визначають у реакції аглютинації і, таким чином, встановлюють антигенну формулу культури. Якщо штам аглютинується ОК-сироваткою 0111:K58 (В4) і Н-сироваткою "6", то антигенна формула культури буде мати вигляд 0111:В4:Н6.

Умовно-патогенні й патогенні ешерихії не відрізняються за культуральними, морфологічними, тинкторіальними та біохімічними властивостями. Вони відрізняються лише за антигенною структурою. Окрім сероваріанта, у *E. coli* визначають фаговаріант що є необхідним для з'ясування епідеміологічної ситуації. Ешерихії можуть продукувати токсичні сполуки - коліцини, тому можна проводити їх коліциногенотипування для з'ясування епідеміологічного стану водойм[19].

**Система експресії.** Основна маса клітинної ДНК бактерій міститься в хромосомі (в хромосомі *E. coli*, міститься близько 4 млн пар нуклеотидів). Однак окрім бактеріальної хромосоми, *E. coli* може містити велику кількість невеликих кільцевих молекул ДНК – плазмід [27-29].

Плазмідний вектор, що містить необхідні елементи для трансляції ДНК(гену цільового протеїну) називається експресійним. У структурі експресійної плазміді можна виділити наступні основні елементи: сайт ініціації

реплікації, селективний маркер, експресійна касета (промотор з регуляторним оператором), сайт зв'язування рибосом, множинний клонуючий сайт, послідовність термінації транскрипції, додаткові послідовності) [30].

Більшість експресійних систем плазмід також містять у своєму складі маркер селективності (частіше за все, він надає резистентність до певного антибіотика). Зазвичай експресійні системи мають власний промотор, сайт зв'язування рибосом, старт-кодон, тобто все що необхідно для транскрипції. Дослідник має лише вставити цільовий ген в правильну рамку зчитування після старт-кодону [31,32]. Також експресійні плазміди дозволяють отримувати злиті білки з додатковими N- або C-кінцевими пептидними послідовностями (або з їх поєднанням), полегшуючи афінну очистку або поліпшують розчинність продукту. Також між генами цільового білка і додаткового поліпептиду можуть бути присутніми лінкерні ділянки для розпізнавання високоспецифічними протеолітичними ферментами.

При створенні штама-продуцента необхідно враховувати сумісність клітин-реципієнтів та плазміди, наприклад, при використанні векторів рЕТ - системи з промоторами T7 / lac, потрібно переконатися, що експресійний штам несе в собі ген, що кодує T7 РНК-полімеразу (інтегрований в геном у вигляді профага  $\lambda$ DE3 або у вигляді окремого ферменту). У випадку штамів, розроблених фірмою Novagen, вони мають у своїй назві аббревіатуру DE3.

Регуляторна система Lac-оперону є однією з найбільш часто використовуваних систем для створення рекомбінантних білків в *E. coli*. Зазвичай, потрібний ген вставляється в комерційний вектор (наприклад найпоширеніші вектори рЕТ), які містять:

1. Ген, що кодує стійкість до антибіотиків.
2. Ген lacI з оперона lac, що кодує репресор lac (LacI).

Необхідний для дослідника ген вставляють відразу після послідовності ДНК-промотора T7, послідовності ДНК-оператора lac і сайту зв'язування рибосоми (на місці початку майбутньої транскрипції мРНК).

Вектор являє собою коротку кільцеву плазмиду (використана в нашій роботі: pET-28a містить 5369 п.н.), яка поглинається *E.coli* і доповнює, але не замінює існуючий геном. Коли клітина *E. coli* ділиться, вона створює нові копії своєї власної (4,6 млн. п.н.) хромосоми «господаря», яка кодує всі білки, необхідні для функціонування *E. coli*, а також і нові копії меншого вектора клонування, в який вбудовано необхідний ген, щоб кожна дочірня клітина мала і те, і інше [33].

Щоб запобігти непотрібній експресії вбудованого гена, в комерційних векторах використовують промотор T7, який відповідає лише РНК-полімеразі з бактеріофага T7. РНК-полімераза кишкової палички, яка транскрибує мРНК для вироблення всіх необхідних білків для неї, не може розпізнати промотор T7 перед вбудованим геном. Репресор lac (LacI) специфічно зв'язується для послідовності таким чином з головною борозенкою операторної послідовності що блокує РНК-полімеразу T7 від зв'язування промоторної послідовності [34].

Перш ніж необхідний ген буде прочитаний, має відбутися дві події:

- 1) репресор lac (LacI) повинен “випасти” з послідовності ДНК-оператора перед цільовим геном, що необхідний для синтезу цільового білка.
- 1) РНК-полімераза T7 повинна почати синтезуватись і розпізнавати промотор T7.

Коли обидва ці фактори виконані, транскрипція гена буде відбуватися надзвичайно швидко. Якщо процес індукції буде відбуватися під час середини фази логарифмічного зростання (залежить від складу поживного середовища), вихід цільового білка буде максимальним.

**Механізм індукції IPTG.** Ген, що кодує саму РНК-полімеразу T7, був вбудований в багатьох комерційно доступних штаммах *E.coli* в рамках модифікованої системи lac-оперону. Це можна перевірити наявністю приставки біля назви штаму *E.coli* - DE3, наприклад штам клітин *E.coli* BL21 (DE3). Замість промоторної послідовності T7 вбудована промоторна послідовність lac, яка здатна взаємодіяти з нативною РНК-полімеразою *E.coli*. Як тільки білок-репресор lac (LacO) втрачає спорідненість з послідовності lac-промотора ДНК в хромосомі господаря, РНК-полімераза T7 буде транскрибуватися і

транслюватися. В деякі штами *E.coli* додатково вбудовують ще додатковий ген, що кодує лізоцим Т7, який інактивує промотор Т7, тобто штами, подібні BL21 (DE3) рLysS. Це утримує фонові рівні експресії РНК-полімерази Т7 від експресії цільового білка до індукції (Рисунок 1.1) [35-38].

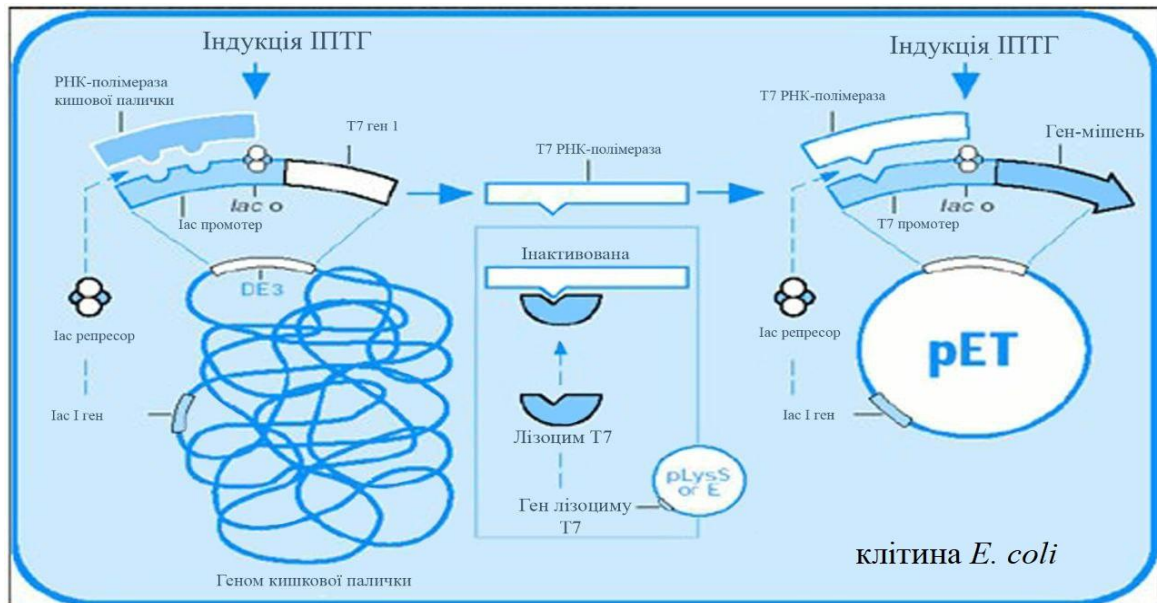


Рис 1.1 Механізм дії IPTG [38]

Білок репресор lac (LacO) еволюціонував, в бік реагування на присутність лактози (комбінованого галактозо-глюкозодисахариду). Як хромосома *E.coli*, так і плазмідна вставка мають копії гена-репресора lac I, щоб гарантувати, що білка LacO завжди достатньо для інгібування усіх lac та T7 промоторів. За відсутності лактози, lac-репресор зв'язується з послідовністю промотора на ДНК і згинає ДНК на 40 градусів. Це блокує доступ РНК-полімерази Т7 до промоторного сайту і, таким чином, запобігає протіканню транскрипції цільового гену перед індукцією.

Коли лактоза зв'язується з LacI, вона викликає конформаційні зміни в структурі білка, що робить її нездатною зв'язуватися з послідовністю ДНК-оператора. IPTG є структурним імітатором лактози (він нагадує галактозний цукор), який також зв'язується з репресором lac і викликає аналогічні

конформаційні зміни, які значно знижують його спорідненість до ДНК [39]. На відміну від лактози, IPTG не є частиною будь-яких метаболічних шляхів і тому не буде руйнуватися або використовуватися клітиною (Рис 1.2). Це гарантує, що концентрація IPTG буде залишатись постійною, що робить його більш ефективним індуктором *lac* оперона, ніж сама лактоза.

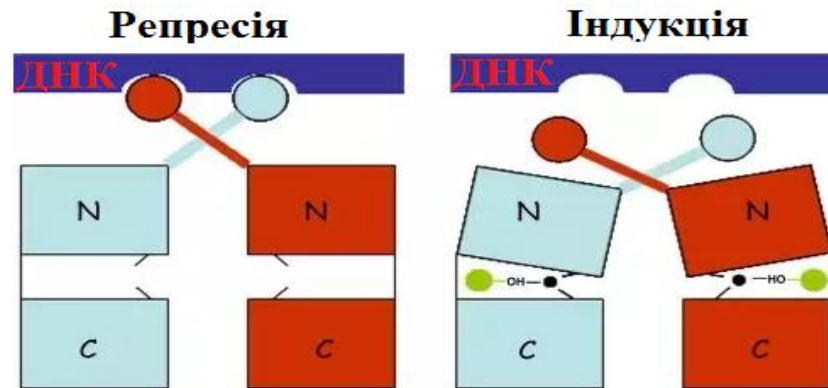


Рисунок 1.2. На наведеній схемі молекула індуктора (IPTG або лактоза) – зелена точка, а чорна точка – це молекула води. [39]

На репресорі утворюється мережа водневих зв'язків з водою та гідроксильною групою галактозного кільця, що чудово вписується в конформацію *lac*- репресора, через що зменшується спорідненість до ДНК оператора в 1000 разів. Як тільки репресор-*lac* більше не може зв'язуватися з оператором, нативна РНК-полімераза *E.coli* починає транскрибувати у великих кількостях ген РНК-полімерази T7, що вбудований в його хромосому. Як тільки білок РНК-полімерази T7 експресується, він зв'язується з послідовністю промотору T7 перед вбудованим геном на вставці плазмиди і транскрибує ген-мішень[40].

Велика зацікавленість в технологіях рекомбінантних білків, створила величезний попит на ринку послуг і тепер дослідник не мусить проходити складний і клопіткий етап відбору та селекції мікроорганізмів, що є досить важливим, бо є можливість замовити максимально відповідний для поставлених задач штам-продуцент. Поправу одним з найрозповсюджених штамів для

отримання рекомбінантних білків вважають *Escherichia coli* BL21, але він не є універсальним рішенням адже існує багато білків з нехарактерними кодонами для *E. coli*, що зменшує вихід деяких продуктів, або навіть взагалі відсутність цільового продукту. Тому на АТЗТ НВК «ДіаПроф Мед» був замовлений штам клітини реципієнта *E. coli* Rosetta (DE3), який є похідним від відомого штаму *E. coli* BL21, призначений для посиленої експресії еукаріотичних білків, які містять кодони, що рідко використовуються в *E. coli* [41-43]. Цей штам поставляє тРНК для кодонів AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA.

## 1.2. Можливі проблеми під час синтезу рекомбінантного білка

Навіть після ретельного вибору плазміди та клітини реципієнту не можна спрогнозувати: чи буде відбуватись надсинтез цільового продукту та його накопичення у активній формі [44-46]. Можна зіткнутись з різними ситуаціями, які перешкоджають отриманню цільового продукту і також є багато стратегій для їхнього вирішення що описано в таблиці 1.1.

Табл. 1.1 Проблеми та загальні стратегії їх подолання під час отримання рекомбінантних білків *E. coli*

Можливе пояснення	Стратегія вирішення
<b>Відсутність або низький вихід продукту</b>	
1	2
Білок є токсичним для клітини, відбувається “протікання” промотору	<p>Необхідний контроль базальної індукції:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Додавання глюкози в поживне середовище при використанні векторів експресії що містять <i>lac</i>- промотори [47];</li> <li>2. Використовувати промотор з більшим рівнем регулювання;</li> <li>3. Використовувати малокопійні плазмідні вектори;</li> <li>4. Застосування клітин-реципієнтів що краще експресують токсичні протеїни (С41 або С43);</li> <li>5. Застосування штамів <i>E. coli</i>, що здатні секретувати білки у периплазму або у поживне середовище.</li> </ol>

## Продовження таблиці 1.1

1	2
Зміщення кодонів	1. Необхідна оптимізація частоти кодонів в кДНК, для кращого використання кодонів хазяїна; 2. Використання штамів скоригованих з урахуванням зміщення кодонів; 3. Збільшення виходу цільового білку за рахунок збільшення кількості біомаси: оптимізація складу або підбір нових поживних середовищ, забезпечення аерації, запобігання піноутворенню, використання додаткових джерел вуглецю.
<b>Утворення тілець включень</b>	
Неправильне формування дисульфідних зв'язків	Застосування штамів <i>E. coli</i> , що здатні виводити білки у периплазму [48]
Неправильний фолдинг білка	1. Паралельна експресія молекулярних шаперонів; 2. Внесення до середовища хімічних шаперонів; 3. Зміна хімічного індуктора та/або додаткове підживлення культури; 4. Сповільнення синтезу цільового білку: зниження температури культивування, зміна концентрації хімічного індуктора.
Низька розчинність білка	Створення гібридного цільового білка, злиття його з тагами що збільшують розчинність (GST, SUMO, MBP, тощо) [49, 50]
Необхідність у пост-трансляційних модифікаціях	Змінити продуцента (культури еукаріотичних клітин, дріжджі, тощо)
<b>Відсутність імунохімічної активності білка</b>	
Неповний фолдинг білку	1. Сповільнення синтезу цільового білку: зниження температури культивування, зміна концентрації хімічного індуктора [51]; 2. Контролювати утворення дисульфідних зв'язків і дозволяти фолдинг <i>in vitro</i> [52].
Мутації в кДНК	1. Застосування <i>recA</i> – штами для забезпечення стабільності плазмід; 2. Проводити трансформацію <i>E. coli</i> перед кожним культивуванням.

До параметрів, що впливають на вихід рекомбінантного білка, але рідко обговорюються, можна віднести підготовку нічної культури та час індукції. Під час підготовки нічної культури може відбуватись “просочування” промотору, що може призводити до сповільнення росту клітин та низького кінцевого виходу протеїну. Окрім цього в початковій культурі клітини можуть перебувати у різних фізіологічних станах і при розведенні у свіжому поживному середовищі, клітини почнуть рости з різною швидкістю. Це ускладнює визначення точки індукції і призводить до невідтворюваності результатів. Належний інокулят (культуру в активній фазі росту) можна підготувати, культивуючи культуру протягом ночі (культивування 16-18 год) за температури нижче оптимальної для неї (20-25°C). Після інокуляції та подальшого росту культури, додають хімічний індуктор, зазвичай у середині фази логарифмічного росту, оскільки культура швидко росте і трансляція білку максимальна. Індукцію можна проводити і на початку логарифмічного росту, це призводить до більшого виходу розчинних фракцій білку, ймовірно, це пов'язано зі зниженою швидкістю синтезу білка і, відповідно, його агрегації у тільця включення.

Якщо активність гетерологічного білка токсична для клітини, може відбутися генетична перебудова вектора експресії, що, у свою чергу, призведе до втрати активності, що дозволить штаму-продуценту вижити. Цю структурну нестабільність плазміди можна виявити лише шляхом секвенування ДНК після очищення плазміди в кінці процесу. Будь-яка точкова мутація, делеція, інсерція або перегрупування може пояснювати низьку активність очищеного рекомбінантного білка.

**Утворення тілець включень.** Коли в *E. coli* вбудовують чужорідний ген просторово-часовий контроль його експресії втрачається. Середовище *E. coli* для рекомбінантного протеїну може відрізнитись за рН, осмолярністю, окислювально-відновним потенціалом, кофакторами, механізмами згортання тощо. Окрім цього, за великого рівня експресії, гідрофобні ділянки, що присутні у поліпептиді, доступні для взаємодії з подібними областями. Усі ці фактори призводять до нестабільності та агрегації білка –до утворення, так званих, тілець

включень. Для подолання цього ефекту можна об'єднати білок з тагом (так званні “таги спорідненості”), що діє як підсилювач розчинності. У деяких випадках утворення тілець включень може бути перевагою, якщо білок піддається рефолдингу без втрати своїх якостей *in vitro*. Тоді умови навпаки коригують у бік утворення тілець включень, забезпечуючи простий спосіб отримання одностадійного очищеного рекомбінантного білка.

Для багатьох рекомбінантних білків утворення правильних дисульфідних зв'язків є дуже важливим для досягнення їх біологічно активної тривимірної конформації. Утворення помилкових дисульфідних зв'язків може призвести до неправильного згортання білка та його агрегації у тільця включення. Для вирішення цієї проблеми варто застосовувати штами Origami (Novagen), SHuffle (NEB), Rosetta-gami™(Novagen) тощо [53].

Під час очищення білків з тілець включень, денатурованих сечовиною, а потім повторного рефолдинку *in vitro*, при додаванні осмолітів (хімічних шаперонів) в концентрації 0,1-1 М збільшує вихід розчинного протеїну. Також осмоліти, можна додавати і у поживне середовище *in vivo*, такі як: пролін, гліцин-бетаїн та трегалозу, тощо. Окрім цього, для правильного згортання білків можуть бути потрібні кофактори у поживному середовищі, наприклад, іони металів (цинк, залізо, магній, тощо), поліпептидних кофакторів. Додавання цих факторів збільшує не лише кількість отриманого протеїну, а і швидкість фолдингу розчинної форми протеїнів [54, 55].

Зниження швидкості напрацювання білка дає змогу щойно транскрибованому рекомбінантному білку час правильно згорнутись. Також зменшення концентрації клітинного білка сприяє його правильному згортанню. Коли накопичення тілець включень є проблемою, то одна із стратегій її вирішення - це культивування за нижчої температури 15-25 °C (описано успішне напрацювання рекомбінантного білка за температури 4°C протягом 72 годин). За низьких температур рекомендовано застосовувати штам-продуцент ArticExpress™ (Stratagene).

### 1.3. Характеристика рекомбінантного білка

Розробка серологічних тестів для виявлення різних класів антитіл до коронавірусу SARS-CoV-2 (рис. 1.3 а), заснована на їхній взаємодії з рекомбінантними високоспецифічними білками, що володіють вираженими антигенними властивостями. На сьогодні, в якості антигенних компонентів, у діагностичних тестах застосовують 2 вірусних білка – білок шипа S та нуклеокапсиду N. Було виявлено що білок нуклеокапсиду N легко може бути напрацьований у прокаріотичній системі експресії, так як має невеликий розмір і не має сайтів глікозилювання. В той самий час, отримання рекомбінантного протеїну S, або його фрагментів (S<sub>1</sub>, RBD, тощо), є більш складним процесом, але має ряд переваг. Наприклад, встановлено, що більша частина вірус нейтралізуючих антитіл виробляється саме до антигену RBD. Також напрацювання рекомбінантного білка S, або його фрагменту RBD є перспективним для діагностування утворення імунітету після вакцинавання.

Геномна РНК SARS-CoV-2 (рис 1.3 б) має довжину близько 29,9 кілобази (29903 п. н.) і кодує один великий поліпротеїн, довжиною 9860 амінокислот (а/к). Поліпротеїн розщеплюється вірусними і клітинними протеазами з утворенням щонайменше 10 вірусних білків [56].

Білок шипа SARS-CoV-2 S є висококонсервативним серед усіх коронавірусів людини (HCoV) і бере участь у розпізнаванні рецепторів, прикріпленні вірусу та проникнення до клітини господаря. Завдяки своїм незамінним функціям він є однією з найважливіших цілей для вакцини проти COVID-19 та медичних досліджень [57].

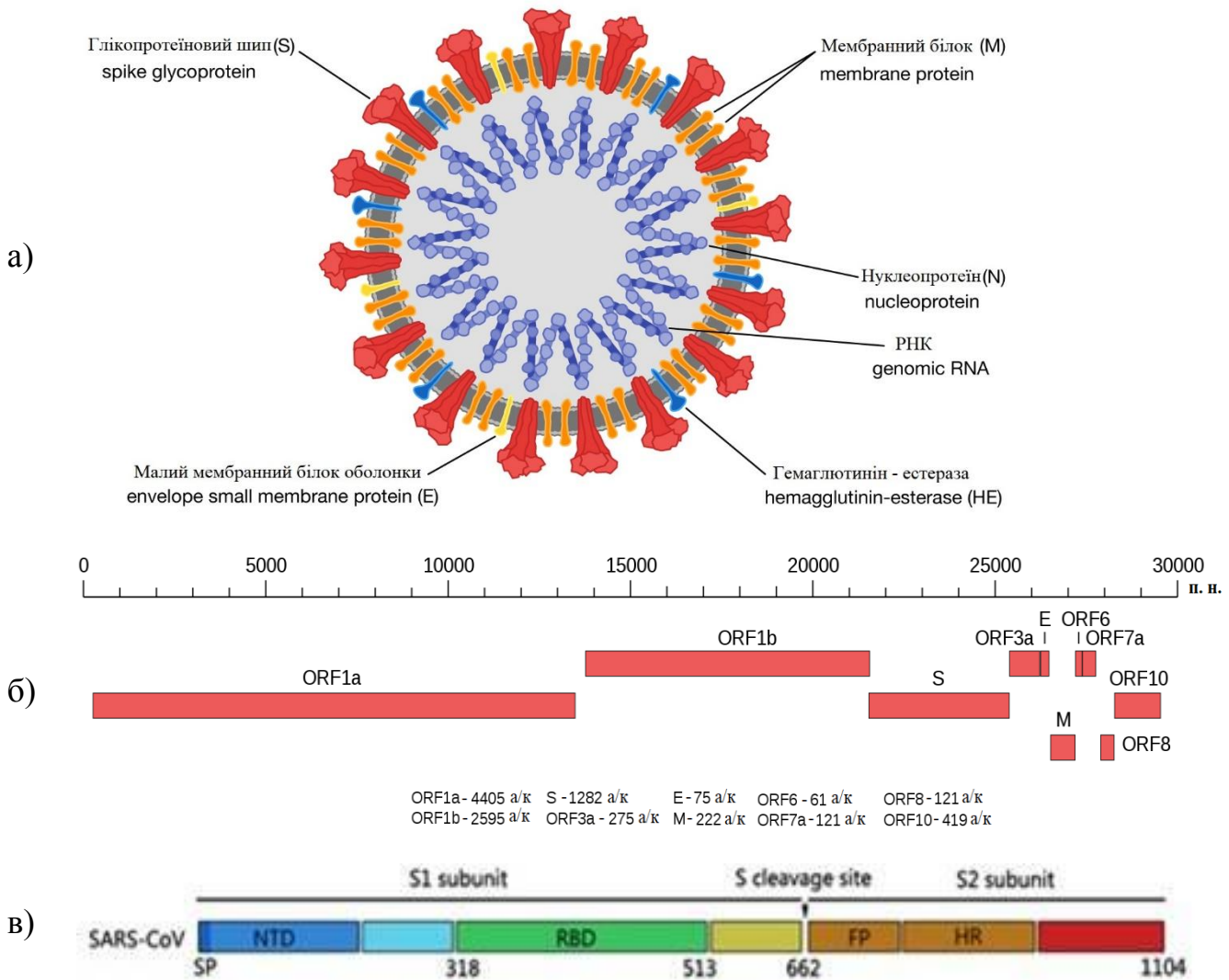


Рис 2.2 а) Схематична структура вірусу SARS-CoV-2 [57]; б) Повний геном SARS-CoV-2 [57]; в) Доменна карта білка S вірусу SARS-CoV-2 [56]

При розмірі 180–200 кДа білок S складається з позаклітинного N-кінця, трансмембранного (TM) домену, закріпленого у вірусній мембрані, та короткого внутрішньоклітинного C-кінцевого сегмента. Загальна довжина SARS-CoV-2 S становить 1273 а/к і складається з сигнального пептиду (амінокислоти 1–13), розташованого на N-кінці, субдиниці S1 (14–685 залишків) та субдиниці S2 (686– 1273 залишки); дві останні області відповідають за зв'язування рецепторів

та злиття мембран відповідно. У субодиниці  $S_1$  є N-кінцевий домен (14–305 залишків) та рецептор-зв'язуючий домен (RBD, 319–541 залишки); злитий пептид (FP) (788–806 залишків), гептапептид повторюють послідовність 1 (HR1) (912–984 залишки), HR2 (1163–1213 залишки), домен TM (1213–1237 залишків) та домен цитоплазми (1237–1273 залишки) містять субодиницю  $S_2$  [58, 59].

Білковий домен RBD, розташований у субодиниці  $S_1$ , взаємодіє з клітинним рецептором ACE2 в області амінопептидази N [60].

Отримання рекомбінантного білку S не є доцільним через його великі розміри – як було зазначено раніше. Є доцільним використати його фрагмент, який викликає імунну відповідь. Такою ділянкою було обрано RBD (рис. 1.3 в). Даний фрагмент має значно меншу масу  $\approx 36$  кДа. Що є доцільним для отримання шляхом мікробного синтезу.

Для збільшення імуногенності протеїну можливе створення його нових форм: множинні комплекси (димери або тримери), злиття з іншим імунодомінантним доменом (наприклад Fc-домен, тощо).

Даний рекомбінантний білок RBD є одним з головних потенційних компонентів тест-системи для діагностики вірусу. Цей антиген може бути придатним для детекції антитіл, специфічних до білку вірусу SARS-Cov-2 людини, методом імуноаналізу.

#### 1.4. Компонентний склад мікробіологічного препарату

Кінцевим продуктом є рекомбінантний білок RBD-GST вірусу SARS-Cov-2, що випускається у флаконах з концентрацією 3 мг/мл.

Форма випуску препарату: буферний фосфатно-сольовий розчин, pH 7,4.

Склад буферу (в розрахунку на 1 л): Тріс-HCl -40 мМоль;  $\text{Na}_2$ -ЕДТА (10 мМоль) – 3,8 г; сечовина (4 Моль) - 250 г; 2-меркаптоетанол (10 мМоль)- 750 мкл; NaCl (0,5 Моль) – 30 г; вода дистильована - до 1 л. Як консервант застосовують – метилізотіазолінон.

Для рекомбінантних білків, що використовуються в діагностичних цілях, застосовують особливі вимоги, а саме:

- 1) високий ступінь їхнього очищення;
- 2) рекомбінантний аналог білка повинен бути цілковитою копією природного поліпептида.

Кожна партія препарату має перевірятись на вміст білків, ліпідів і вуглеводів.

Чистота препарату > 98% (за результатами ДСН-електрофорезу).

Вміст білків штама-продуцента має не перевищувати 200 нг/мг білка.

Здатність до зв'язування перевіряють методом ІФА.

## РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Мікробні культури та експресуючі вектори.** В якості реципієнта було використано штами *E. coli Rosetta (DE3)* [ $F^-$  ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE<sup>b</sup> (Cm<sup>R</sup>)] та *E. coli BL21(DE3)*, [ $F^-$  ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)], які були трансформовані рекомбінантною плазмідною pET28 (Novagen, США), що містить вставку гену, який кодує амінокислотну послідовність рецептор-з'язуючого домену (RBD) субодиниці S1 глікопротеїну S коронавірусу SARS-Cov-2, зливу з послідовностями глутатіон-S-трансферази (GST-tag) та His6-tag (Примітка: вектор та клітини реципієнт *E. coli* комерційно доступні на ринку; доступні для молекулярного клонування та експресії білка відповідно до рекомендованого протоколу, наданого виробниками з відповідними селективними антибіотиками).

Отримання компетентних клітин і трансформацію проводили згідно із стандартними протоколами на базі підприємства “Діапроф-Мед” [61]. Суміш клітин висівали на агаризоване селективне середовище LB (Merck, German), що містить антибіотик канаміцин у кінцевій концентрації 50 мкг/мл [62]. Клоні-трансформанти використовували для приготування посівного матеріалу. Нічну культуру (18 годинну), об’ємом 1 л, вирощували у колбах на шейкері-інкубаторі (Eppendorf, Austria) за температури 30 °C при 160 об/хв на поживному середовищі LB з додаванням канаміцину (Arterium, Ukraine).

**Культивування штама-продуцента.** Для отримання мікробної біомаси використовували наступні живильні середовища: ТВ (12 г/л триптон, 24 г/л дріжджового екстракту, 4 г/л гліцерину, 17 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 72 мМ К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>, рН 7,2; Merck, German); LB (10 г/л триптон, 5 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л NaCl, рН 7,2 Merck, German), модифіковане середовище №3 (сольова основа М9 з додаванням 5 г/л гідролізату казеїну, 5 г/л пептону, 5 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л глюкози, рН 7,2; Merck, German). Виробниче культивування проводили у 20-ти літрових ферментерах із 45% заповненням об’єму (9 л) (Eppendorf, Austria). Посівний матеріал, після внесення у культиватор, вирощували при

температурі 37°C в умовах інтенсивного перемішування (300 об/хв) та аерації (5 л/хв) [63]. Значення рН середовища (7,2-7,4) контролювали за допомогою рН-метра (Biobase, China) та коригували з додаванням 40% розчину NaOH (Merck, German). Через певні проміжки часу вимірювали оптичну густину клітин на спектрофотометрі (Pharmacia, Sweden) при довжині хвилі 540 нм. Для індукції біосинтезу цільового продукту у культуральне середовище додавали ізопропіл-β-D-тіагалактопіранозид (ІПТГ) (GoldBio, USA) [64, 65]. Величину накопичення рекомбінантного протеїну у клітинах бактерій та якість його очищення оцінювали за допомогою 12% ПААГ-SDS електрофорезу (Cleaver Scientific, United Kingdom). Концентрацію білку вимірювали біуретовим методом [66].

**Лізис мікробної біомаси.** Відмивання біомаси фізіологічним розчином від залишків культуральної рідини. Розчинення в лікуючому розчині (Тріс-НСІ (рН: 8,0) 30 mM; NaCl 0,5 M; Тритон X100 0,1%; ФМСФ 1 mM; Merck, German) гомогенізація на дисперсері (ІКА, Germany) 15 хв 6000 об/хв. Додати до отриманого розчину лізоцим 1,2 мг/г біомаси (Goldbio, USA) та інкубувати на водяній бані (LabExpert, United Kingdom) при 37°C 2 години. Чотири рази заморозити (- 20 °C) та розморозити (+37 °C) лізовану біомасу та внести ДНКзу (Sigma-Aldrich, USA) та 2М розчину MgSO<sub>4</sub> (Merck, German). Після того як розчин втратить в'язкість, озвучити на ультразвуковому диспергаторі (Укрросприбор, Україна) та відцентрифугувати на центрифугі (Eppendorf, Austria) 11000 об/хв. 25 хв, 4 °C. Якщо білки в розчинній фракції то перед хроматографуванням їх слід профільтрувати через фільтр (Merck, German) d=0.34 нм. Тільця включення перерозчиняють у буфері (Сечовина 8М; NaCl 0,5 M; Тріс-НСІ (рН: 8,0) 50 mM; Імідазол 25 mM; Merck, German), гомогенізують на дисперсері 5000 об/хв, 10 хв, та центрифугують 11000 об/хв, 25хв 4 °C [65].

**Отримання очищеного препарату рекомбінантного протеїну.** Хроматографічне очищення рекомбінантних білків, що були виділені з тілець включень та з розчинної фракції клітинного лізату, проводили з використанням методів імобілізованої метало-афінної хроматографії (IMAX) ( GE Healthcare, USA) із застосуванням сорбенту IDA-toyopearl (TOSOH, Японія), попередньо

активованими іонами нікелю (Merck, German). Процедуру виконували на хроматографічній системі "Bio-Rad" (США). Ілюцію досліджуваних зразків здійснювали різними концентраціями розчину імідазолу (40-200 мМ) (Sigma-Aldrich, USA).

Наступний етап з доочищення проводили методом афінної хроматографії з використанням сорбенту глутатіон-сефарози (Amersham, США). Елюцію цільових білків з носія проводили за допомогою розчину глутатіону 10мМ, відновленого в 50мМ Тріс-НСl, рН 8,0 (Merck, German) [67-69].

*Оцінка імунохімічних властивостей білкових фракцій.* Імунохімічні характеристики рекомбінантного білку *GST-RBD* оцінювали у складі тест-системи у форматі непрямого ІФА [70]. Результати обчислювали за допомогою індексу (коефіцієнту) позитивності (ІП) згідно з формулою (2.1):

$$\text{ІП} = \frac{A_{\text{ср.ОГ}^+} - A_{\text{ср.ОГ}^-}}{3 \cdot SD_{\text{ср.ОГ}^-}}, \quad (2.1)$$

де: ІП - коефіцієнт позитивності; він є універсальним показником, що використовується в якісних імуноферментних тестах; ср.ОГ<sup>+</sup> - середнє арифметичне значення оптичної густини позитивних сироваток; *cut off* = ср.ОГ<sup>+</sup> + 3\*SD, це сума ср.ОГ<sup>+</sup> - середнє арифметичне значення оптичної густини негативних сироваток та трьох величин середньоквадратичного відхилення SD [14].

Для приготування імуносорбенту використовували 96-лункові планшети (MediSorp, Biofile Medium, China), в лунки яких вносили досліджуваний антиген у концентрації 0,5 мкг/мл у 0,5М калій-бікарбонатному буфері рН 9,6 або фосфатно-сольовому, рН 7,2-7,4. Специфічні імунні комплекси антиген-антитіло виявляли, використовуючи кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma-Aldrich, USA) моноклональні антитіла, що розпізнають IgG. Як проявник імуноензимної реакції використовували хромоген 5,5'-тетраметилбензидин (Kementek Diagnostics, Denmark), розведений у 0,15М цитратному буфері (рН 4,6) (Merck,

German) разом з перекисом водню. Реакцію зупиняли додаванням 0,5М сірчаної кислоти. Оптичну густина вимірювали на спектрофотометрі (Pharmacia, Sweden) за двох довжин хвиль 450 та 620 нм. Для визначення показників якості отриманих компонентів використовували внутрішньовиробничу панель позитивних та негативних сироваток крові, що містять та не містять імуноглобуліни класу G до коронавірусу SARS-CoV-2, а також комерційні контрольні зразки та набори сироваток “1st International Reference Panel for Anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin”(NIBSC, United Kingdom)

*Математичне моделювання кривих росту бактеріальних популяцій.* В умовах промислового виробництва широке застосування отримав метод, що дозволяє встановити закономірності ростових процесів і визначити вплив зовнішніх факторів [71-73]. Такий підхід є ефективним при дослідженні динаміки росту бактерій *E.coli* у контрольованій індукційними промоторами білок-експресійній системі.

Для апроксимації емпіричних кривих росту була застосована функція Ферхюльста наступного вигляду (2.2):

$$Y = C + \frac{A - C}{1 + e^{-\alpha(t - t_0)}} \quad (2.2)$$

де  $x$  – оптична густина бактерій,  $O\Gamma_{540}$ ;  $t$  – час росту культури, год;  $A$  - верхня асимптота функції (максимальне значення оптичної густини);  $C$  - нижня межа, з якої починається ріст функції (початкова оптична густина).

Показники  $\alpha$  і  $\beta$  вираховували за допомогою логарифмування функції Ферхюльста:

$$\ln \frac{Y - C}{A - Y} = \alpha(t - t_0) \quad (2.3)$$

Вираз (2) демонструє залежність між змінними  $Y = \frac{A - C}{1 + e^{-\alpha(t - t_0)}}$  і  $t$  описується рівнянням прямолінійної регресії.

Найбільш гарно вивченим кінетичним параметром, що характеризує динаміку зростання мікроорганізмів є відносна швидкість росту  $\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$ . Ця величина відображає приріст біомаси  $dx$  в одиницю часу  $dt$ , віднесеної до одиниці зростаючої біомаси  $x$  (год<sup>-1</sup>) [74, 75].

Для дослідження характеристик росту мікроорганізму під часу культивування, було побудовано сигмоїдну криву. Характерною особливістю кривих сигмоїдного типу є наявність точки перегину, що вказує на момент переходу зростаючої швидкості росту в ту що зменшується. Для її розрахунку необхідно розрахувати першу та другу похідні функції (2.2).

Першу похідну функції Ферхюльста (2.2), що являє собою абсолютну швидкість росту бактеріальної популяції, знайдено по формулі:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{K \cdot x \cdot (x_0 - x)}{x_0 \cdot (x - x_0)}, \quad (2.4)$$

Графік функції — має один екстремум (максимум), відповідно максимальне значення абсолютної швидкості росту бактерій — при значенні аргументу  $t=t_e$ ,

де  $t_e = -\frac{1}{\mu} = \left| -\frac{1}{\mu} \right|$  (при умові  $t \geq 0$ , показники  $i$  і  $0$ )

Другу похідну функції Ферхюльста (2.2), що характеризує прискорення росту культури, знаходили з виразу:

$$\frac{d^2x}{dt^2} = \frac{K \cdot x \cdot (x_0 - x)^2}{x_0 \cdot (x - x_0)^2}, \quad (2.5)$$

Графік отриманої функції міститиме два екстремума – максимум (в точці  $T_1$ ) при значенні аргументу  $t=t_1$  та мінімум (в точці  $T_2$ ) при значенні аргументу  $t=t_2$ , а при значенні  $t=t_e$  функція рівна 0, що є умовою існування точки перегину на графіку основної функції.

Для визначення аргументів  $t_1$  та  $t_2$  що відповідають двом точкам перегину на графіку функції першої похідної функції Ферхюльста і при виконанні умови — було отримано наступні вирази:

$$\frac{-}{-} \quad (2.6)$$

Результати досліджень аналізували та обробляли загальноприйнятими статистичними методами із використанням програм MatCAD та TotalLab. Достовірність результатів встановлювали за допомогою обчислення  $t$ -критерію Стьюдента, а відповідність математичних моделей оцінювали на основі використання критерія Фішера ( $F$ -тест) із застосуванням методів регресійного та дисперсійного аналізів [76, 77].

## 2.2. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 2.2.1. Відбір клона-продуцента рекомбінантного білка GST-RBD

У роботі були використані генно-інженерні конструкції плазмиди *pET28a-GST-RBD*, продуктами експресії яких у бактеріальній системі реципієнтних штамів *E. coli BL21(DE3)* та *E. coli Rosetta (DE3)* є протеїн що містить імунодомінантні ділянки протеїну S вірусу SARS-CoV-2, злиті з *His6-tag* та послідовністю глутатіон-S-трансферази [55].

На початковому етапі досліджень було проведено скринінг трансформованих мікробних клітин для відбору надпродуцентів. Результати електрофореграм (рис. 2.1) показали що не всі трансформанти здатні до надсинтезу.

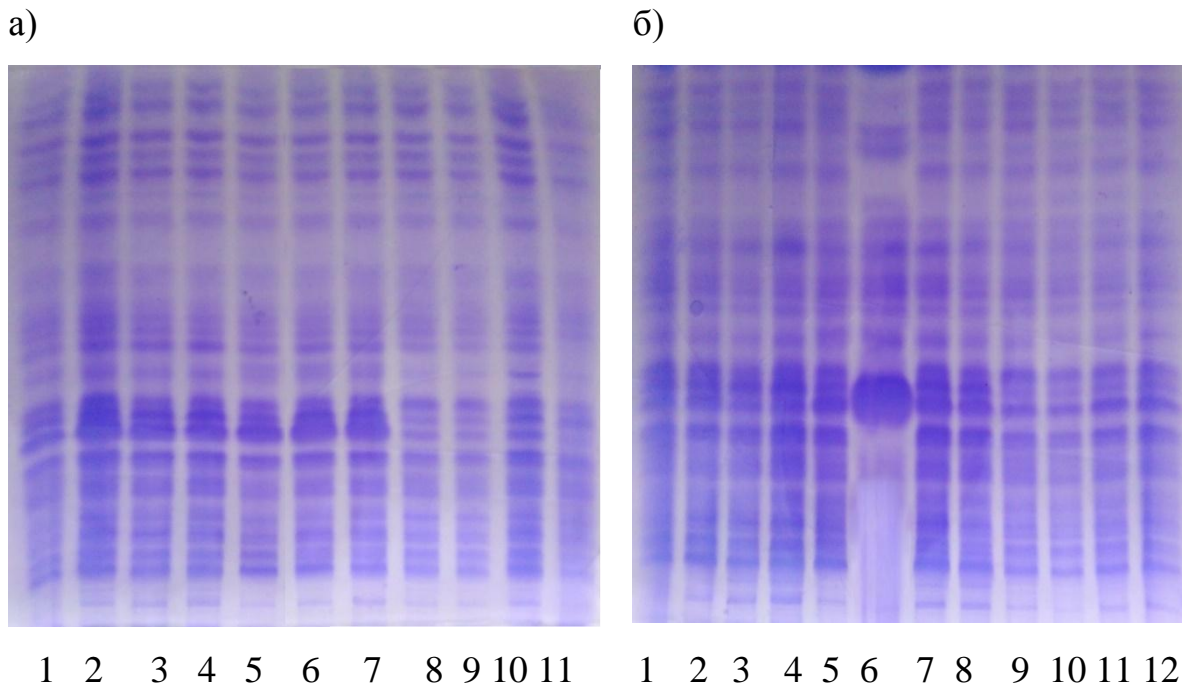


Рис. 2.1 Електрофореграма зразків біомас клонів-трансформантів *E. coli*, отримані після індукції 1 мМ IPTG протягом 4 год. а) клони-трансформанти *E. coli BL21(DE3)/pET28a-GST-RBD*. Зразок №1 – лізат вихідного штаму реципієнта *E. coli BL21(DE3)*; б) клони-трансформанти *E. coli Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD*. Зразок №1 – лізат вихідного штаму реципієнта *E. coli Rosetta (DE3)*, №6 – хроматографічно очищений протеїн GST-RBD.

Найкращі клони-продуценти були відібрані та дослідженні на величину рівня експресії та плазмідну стабільність, шляхом декількокоразового пересівання культури, та використані в подальшій роботі.

Було проведено серія культивувань на поживному середовищі LB з варіюванням температурних режимів. Експериментальні дані накопичення білку в продуцентах представлені на рисунку 2.2.

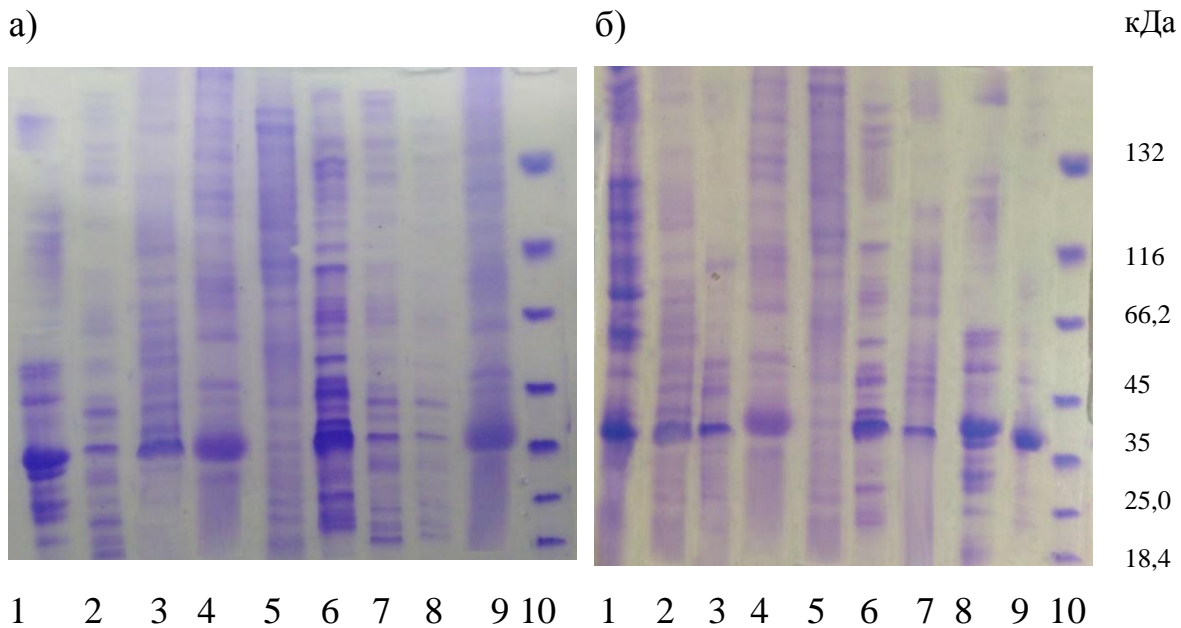


Рис. 2.2 Електрофореграма накопичення рекомбінантних протеїнів у клітинах бактерій штамів продуцентів за різних температурних умов культивування а) штам реципієнт *E. coli BL21(DE3)*; б) штам реципієнт *E. coli Rosetta (DE3)*. Треки: 1 та 6 сумарні протеїни в біомасі після індукції; 2 та 7 білки супернатанту після лізису клітин; 3 та 8 білки після відмивки тілець включень; 4 та 9 –тільця включення розчиненні в буфері з 8М сечовиною; 5 – біомаса до індукції; 1-4 температура культивування 25 °С; 6-9 температура культивування 37 °С; 10 маркери молекулярної маси (Fermentas, Литва)

Так за температури культивування продуцента *E. coli Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD* 25 °С синтез протеїну відбувався як у вигляді тілець включень (вихід  $\approx$  4,3 мг/г біомаси), так і в розчинній формі (вихід  $\approx$  2,4 мг/г біомаси); тоді як за температури 37°С переважала його агрегація (вихід  $\approx$  6,6 мг/г біомаси). Для іншого штаму *E. coli BL21(DE3)/pET28a-GST-RBD* температурний режим суттєвого не впливав на локалізацію рекомбінантного білку в клітині. За досліджених умов протеїн нагромаджувався переважно у вигляді тілець включень (вихід  $\approx$  10,1 мг/г та 8,2 мг/г біомаси при 25 °С та 37 °С відповідно).

Імунохімічні характеристики очищеного рекомбінантного білка *GST-RBD* у складі імуносорбенту діагностичної тест-системи визначали на основі

обчислення індексу позитивності згідно формули (2.1) та занесено до таблиці 2.1.

Отримані експериментальні данні показали найвищу активність в розчинної форми білка продуцента *E. coli Rosetta*, температура культивування майже не впливала на його імунохімічні показники. Варто також зазначити, що продуцент *E. coli BL21* хоч і не утворював розчинної форми білка, однак, отримані тільця включення мали вищу активність ніж тільця включення *E. coli Rosetta*.

Таблиця 2.1

**Порівняння імунохімічної активності продуцентів рекомбінантного білку *GST-RBD*, при різній температурі культивування**

Продуцент	Тільця включення		Розчинна фракція	
	Температура культивування			
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
	індексу позитивності (ІП)			
<i>E. coli BL21(DE3)/pET28a-GST-RBD</i>	2,45	2,48	Не виявлено	
<i>E. coli Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD</i>	2,22	2,18	3,16	3,14

Дані таблиці 2.1 свідчать про те, що найвищу імунохімічну активність мав протеїн виділений з розчиненої фракції продуцента *E. coli Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD*. Більш високі показники чутливості та специфічності діагностичної тест-системи, при сорбції розчинного протеїну *GST-RBD*, слугують переконливим аргументом для подальшої оптимізації мікробної експресії для максимального виходу саме розчинної фракції протеїну

### 2.2.2. Оптимізація умов мікробної експресії розчиненої форми рекомбінантного протеїну *GST-RBD*

З метою оптимізації умов для культивування штаму-продуцента *E. coli Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD* використали поживні середовища LB, TB та модифіковане середовище LB. В ході експерименту стало очевидно, що від складу живильного середовища залежить не лише загальний вихід біомаси, але і якісні характеристики отриманого продукту [31]. Тому, було проведено серію дослідів з пошуку найбільш ефективного поживного середовища, в результаті чого нами було з'ясовано, що найбільший вихід цільового продукту спостерігали на середовищі TB – 12,3 мг на 1 г біомаси або 68,9 мг протеїну (в розрахунку на одиницю об'єму – 1 дм<sup>3</sup>) культурального середовища.

В подальшій роботі застосовували саме середовище TB. Дані дослідів наведені в таблиці 2.2. Як видно з таблиці, 3 середовище (LB модифіковане) дало найбільший вихід біомаси (5,6 г/л), що можна пояснити наявністю у складі глюкози та мікроелементів. Та при подальшій роботі, було з'ясовано, що вихід біомаси не корелює з виходом цільового продукту, і на середовищі TB було отримано більше цільового протеїну. Можна припустити що наявність глюкози в середовищі LB модифіковане, може конкурувати з хімічним індуктором, через їхню хімічну подібність, це у свою чергу може викликати “просочування оперона” передчасну індукцію, тощо. На відміну від середовища TB, що містить зовсім інше джерело вуглецю – гліцерин, що і не викликає вище зазначених проблем.

Таблиця 2.2

**Вихід біомаси та очищеного білку *GST-RBD* в залежності від складу поживного середовища, застосованого для культивування штаму *E. coli* *Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD***

№	Поживне середовище	Загальний вихід біомаси, г/л	Кількість очищеного протеїну після лізису біомаси, мг/г		Кількість очищеного протеїну, мг/л	
			Із фракції супернатанту	Із фракції тілець включень	Із фракції супернатанту	Із фракції тілець включень
1	LB	2,3	7,1	5,8	14,2	11,6
2	TB	3,7	8,5	6,1	17	12,2
2	LB (модифікований)	5,6	4,7	4,4	9,4	8,8

Важливими чинниками, що впливають на отримання розчиненої форми білку, є температурний режим культивування та концентрація хімічного індуктора ПТГ у поживному середовищі. Тому рівень накопичення рекомбінантного протеїну *GST-RBD* у бактеріальних клітинах досліджували залежно від температури культивування (25 °C та 37 °C) та в присутності різних концентрацій ПТГ (0,1 мМ та 1 мМ) які вносили у поживне середовище при оптичній густині  $OD_{540}=0,3$  о.о та  $OD_{540}=0,7$  о.о

При визначенні оптимальної концентрації ПТГ враховували як показник ефективності біосинтезу, так і економічну доцільність використання хімічного індуктора. Згідно з результатами електрофоретичного аналізу зразків біомас (рис. 2.3), отриманих при культивуванні продуцента з використанням ПТГ у кінцевих концентраціях 0,1 мМ та 1 мМ, найбільший вихід розчинної фракції білку спостерігали за умов культивування за температури 37°C при внесенні індуктора у концентрації 0,1 мМ на початку експоненційної фази росту ( $OD_{540}=0,3$  о.о).

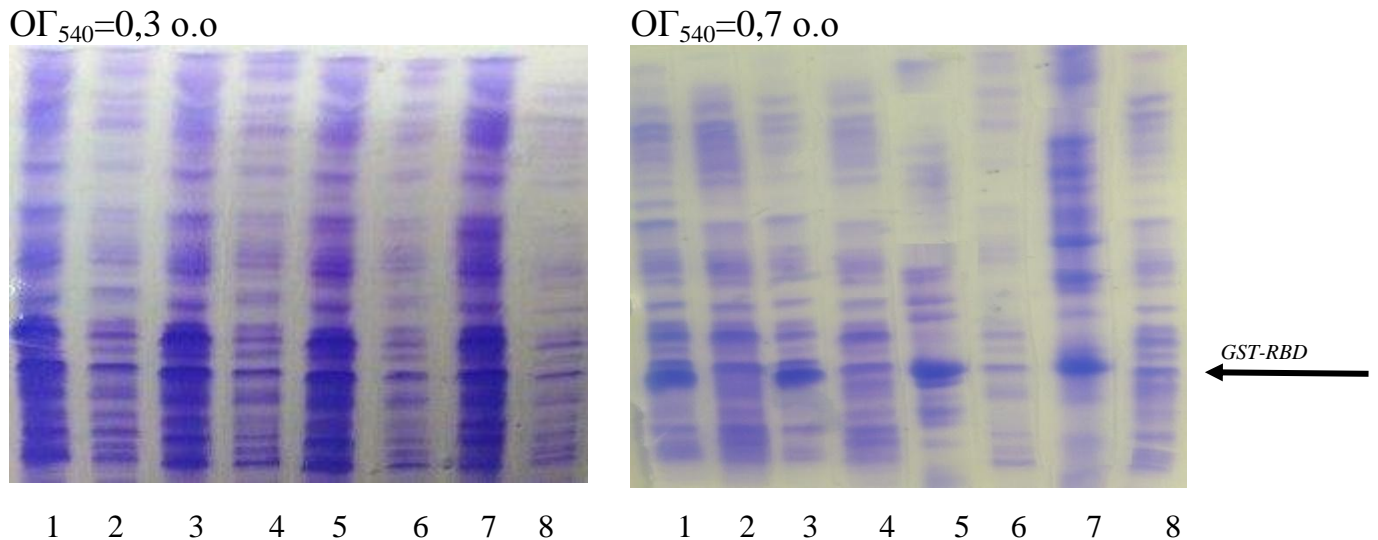


Рис 2.3 Порівняльні електрофореграми локалізації рекомбінантного білку *GST-RBD* у клітинах штаму продуцента *E. coli Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD*. Треки 2, 4, 6, 8- розчинна фракція рекомбінантного протеїну *GST-RBD*; 1, 3, 5, 7 – тільця включення; 1-4 – температура культивування 25 °С; 5-8 – температура культивування 37 °С; 1, 2, 5, 6 – індукція біосинтезу при 0,1 мМ IPTG; 3, 4, 7, 8 – 1 мМ IPTG

### 2.2.3. Математичне моделювання кривих росту штама-продуцента та визначення його фізіологічної активності

Отримані в ході дослідної роботи криві залежності оптичної густини клітин штама-продуцента від часу мали характерну для росту мікроорганізмів s-подібну (сигмоїдну) форму (рис. 2.4 а). Наразі описана велика кількість динамічних моделей, що застосовуються для опису сигмоїдних кривих. Опираючись на проаналізовану літературу, нами була обрана логістична формула Ферхюльста, з невеликою кількістю параметрів. Існує декілька форм аналітичного виразу цієї функції. Для апроксимації емпіричних кривих росту була застосована функція Ферхюльста (2).

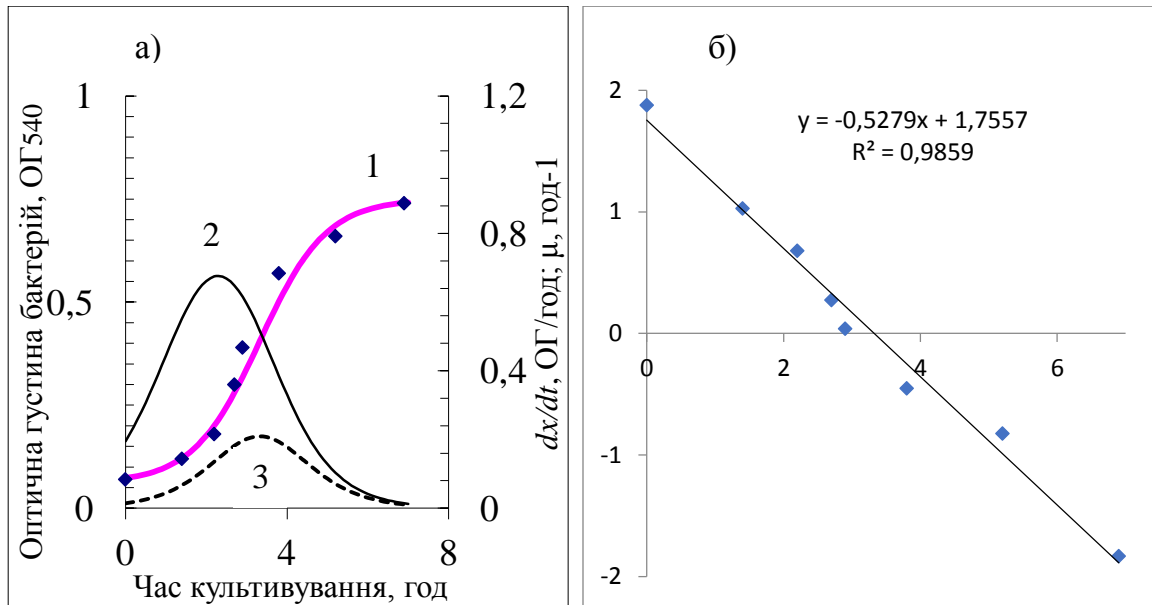


Рисунок 2.4 а) Крива росту штама продуцента *E. coli Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD*. Експериментальні данні (точки) апроксимовані по моделі логістичної функції Ферхюльста (крива 1). Де  $A=0,75$ ;  $C=0,06$ ;  $\alpha=1,7557$ ;  $\beta=-0,5279$ . По осі ординат (праворуч) – величина абсолютної ( $\frac{dx}{dt}$ , крива 2) та питомої ( $\mu$ , крива 3) швидкості росту.

б) Лінійна анаморфоza логістичної функції Ферхюльста для визначення кінетичних параметрів  $\alpha$  та  $\beta$  кривих росту штама, представлених на рисунку а).

Характерною особливістю кривих сигмоїдного типу є наявність точки перегину, що вказує на момент переходу зростаючої швидкості росту в ту що зменшується. Для її розрахунку необхідно розрахувати першу (4) та другу похідні (5) логістичної функції.

В мікробіологічних дослідженнях, при описі динаміки росту бактеріальних популяцій, виділяють декілька стадій, що відповідають певній фізіологічній активності клітин. Вирахування координат критичних точок  $T_1$  (2,25; 0,2),  $T_2$  (4,4; 0,6) і точки перегину  $T_e$  (3,32; 0,4) на сигмоїдній кривій дозволяє розрізнити чітко в часі основні фази росту мікроорганізму (рис. 2.5) [78].

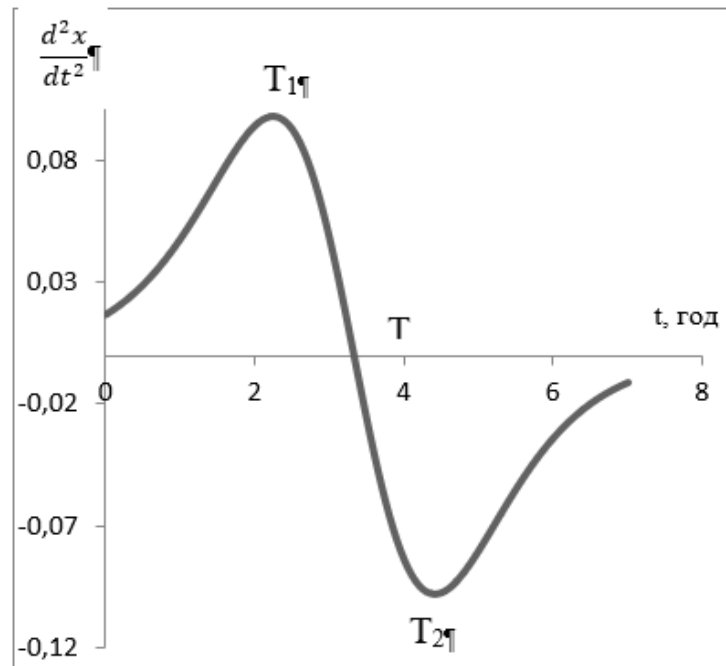


Рисунок 2.5 Залежність прискорення росту штамма-продуцента від часу культивування.  $T_1$  – фаза максимального пришвидшення росту,  $T_e$  – перегин логістичної кривої,  $T_2$  – максимальна фаза від’ємного прискорення росту (сповільнення)

Підготовчий період, що включає лаг- фазу і фазу пришвидшеного росту, можна спостерігати від моменту внесення в культуру інокулята при  $t = 0$  і продовжується до моменту  $t = t_1$ , де пришвидшення росту бактерій досягає максимального значення, майже лінійний ріст клітин (експотенційна фаза) триває певний інтервал часу від моменту  $t = t_1$  до точки перегину кривої при  $t = t_e$ ; далі настає фаза сповільненого росту – проміжок часу від  $t = t_e$  до моменту часу  $t = t_2$ , котрому відповідає максимальне значення негативного пришвидшення (сповільнення) роста культури.

Отримані результати статистичного дослідження вказують, що значення оптичної густини  $OG_{540}=0,2$  О.О. відповідає періоду максимального прискорення росту, а значення  $OG_{540}=0,7$  О.О. фазі уповільнення росту бактерій.

На початку дослідної роботи було встановлено, що фізіологічний стан клітин мікроорганізму на початку запуску біосинтезу має вплив на локалізацію цільового продукту. Так, при проведенні індукції культури що перебувала у фазі уповільненого росту ( $OG_{540}=0,7$  О.О.), накопичення цільового продукту відбувалось переважно у вигляді тілець включень (84% та 81,5% при додаванні

0,1мМ та 1мМ ПТГ, відповідно). При внесенні хімічного індуктора при оптичній густині  $ОГ_{540} = 0,3$  О.О., тобто між  $T_1$  та  $T_e$ , між фазою максимально прискореного росту та точкою перегину, протеїн *GST-RBD* накопичувався як у вигляді тілець включень (64,7% та 62% при додаванні 0,1мМ та 1мМ ПТГ, відповідно), так і у розчинному вигляді У таблиці 2.3 наведені отримані данні виходу біомаси та очищеного рекомбінантного білку *GST-RBD*, виділеного з розчиненої фракції клітинного лізату.

Таблиця 2.3

**Загальний вихід біомаси та очищеного протеїну *GST-RBD* залежно від фізіологічного стану мікробних клітин в момент хімічної індукції**

Фізіологічний стан культури	Концентрація ПТГ, мМ	Загальний вихід біомаси, г/л	Вихід очищеного протеїну із розчиненої фракції	
			мг/г	мг/л
Фаза прискореного росту ( $ОГ_{540} = 0,3$ О.О.)	0,1	3,05	18,1	55,2
	1,0	3,4	14,3	48,6
Фаза уповільненого росту ( $ОГ_{540} = 0,7$ О.О.)	0,1	4,28	2,9	12,4
	1,0	4,15	3,22	13,3

Проаналізувавши отримані дані, можна стверджувати, що при використанні поживного середовища ТВ для культивування *E. coli* Rosetta (DE3)/pET28a-GST-RBD при температурі культивування 37 °С і проведенні хімічної індукції використовуючи ПТГ концентрації 0,1; трохи пізніше фази прискореного росту мікробної популяції ( $ОГ_{540} = 0,3$  О.О.) з подальшим культивуванням 4 години дає змогу отримати найбільший вихід розчинної форми протеїну (55,2 мг/л з поживного середовища або 18,1 мг/г з біомаси)

#### 2.2.4. Відпрацювання технології хроматографічного очищення рекомбінантного протеїну *GST-RBD*

Схему очищення рекомбінантного протеїну було нами розроблено з урахуванням його первинної структури та молекулярної будови, а саме наявності

двох тагів: на N – кінці містить глутатіон трансферазу (GST) та на C- кінці амінокислотну послідовність His<sub>6</sub>-tag. Спершу було використано метод ІМАХ, що застосовує Ni<sup>2+</sup> IDA-toyorearl, а на другому етапі очищення використали афінну хроматографію. Очищену білкову фракцію наносили на колонку з глутатіон сефарозою. Отриманий питомий вихід білку з клітинного супернатанту за оптимізованих умов склав ~70% (72,46%) від усієї кількості рекомбінантного білку в клітині штама-продуцента.

Варто зазначити, що двостадійне очищення білку підвищило якісні характеристики очищеного білкового препарату ІП = 5,47±0,43.

### РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ

Ідея створена на базі підприємства АТЗТ НВК «Діапроф-Мед», що вже більше 20 років є виробником тест-систем.

Таблиця 3.1. Опис ідеї стартап-проекту

Зміст ідеї	Напрямки застосування	Вигоди для користувача
Отримання рекомбінантного білка для подальшого використання в тест системах та лабораторних дослідженнях	Проведення тестування захворювання в лікарнях та лабораторіях.	Якісна та доступна діагностика перебігу захворювання з високою точністю.
	Лабораторне дослідження білку, для розробки нових тест систем, вакцин, тощо.	Розробка більш досконалих тест-систем, для покращення надаваних послуг

#### 3.1. Резюме стартап-проекту [79]

Таблиця 3.2 Резюме проекту

Показник	Характеристика
1	2
1. Суть ідеї	Рекомбінантний білок для виробництва тест-систем із визначення IgG Sars-Cov-2 у плазмі і/ або сироватці крові людини за допомогою імуноферментного методу
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	Аналоги на ринку: рекомбінантні білки - виробництва Німеччина Merck, США Thermo Fisher Scientific; тест-системи – Великобританія DiaPharma, США Eagle Biosciences
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Даний рекомбінантний білок в складі імуноферментної тест-системи
4. Ступінь розробленості схеми реалізації	На стадії реалізації
5. Класифікація типу проекту за міжнародною класифікацією товарів	Клас 5; Базовий номер – 050007; білкові препарати на медичні потреби
6. КВЕД даного виробництва	C–21.20. Виробництво фармацевтичних препаратів і матеріалів. [80]
7. Очікувана потужність стартапу	Реалізація на малому або середньому підприємстві
8. За ступенем масштабності виробництва	Серійне
9. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне
10. За ресурсами, що будуть споживатись	Матеріаломістке, капіталомістке, інформаційномістке
11. За кількістю робітників	Середня кількість робітників.

## Продовження таблиці 3.2

1	2
12. Органи управління на етапі реалізації проекту	Національні
13. Географічне розташування - основних потужностей стартапу; - головного офісу; - мережі збуту; - постачальників матеріалів.	Виробничі потужності з офісом розташовані у місті Києві у Подольському районі. Збутова мережа налагоджена по всіх областях України. Постачальники комплектуючих як національні, так і міжнародні.
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	На стадії розробки
15. Гранична корисність ідеї стартапу	У час стрімкого поширення пандемії, як альтернатива «золотому стандарту» ПЛР, з метою розвантаження лабораторій та діагностування через тривалий проміжок часу. Потенційне використання у масовому тестуванні населення.
16. Бізнес-модель продукту	B2B
17. Вітчизняні конкуренти	На Українському ринку можна навести компанії: Novamedline, Vitrotest
18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	Іноземні конкуренти з виробництва тест-систем – Великобританія DiaPharma – 900\$, США Eagle Biosciences – 850\$. Головними перевагами зарубіжного продукту є більша впізнаваність на ринку через широкий асортимент інших товарів, великий рівень довіри клієнтів.
19. Ключові фактори успіху стартапу	Отриманий білок є високо очищеним та має високі імунохімічні характеристики, що робить його цікавим у лабораторних дослідженнях та для створення ІФА тест - систем
20. Споживачі (основні на етапі впровадження, групи, орієнтовна чисельність)	Епідемія короно вірусу вражає усі верстви населення, найбільш вразливі: люди літнього віку, люди з хронічними захворюванням, люди що перенесли хірургічне втручання. На 5 жовтня 2020 року хворобою переохворіло більше 10% населення.
21. Очікувана кількість продукту для першого етапу реалізації	Перша серія
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості	10 000 од/рік
23. Споживачі на етапі розвитку	Головними споживачами стануть добровольці, що готові перевірити ефективність тест - системи
24. Споживачі на етапі зрілості	Пацієнти з підозрою на ковід
25. Конкурентна ціна на продукт стартапу	Конкурентноспроможною є ціна в 3150 грн за тест-систему
26. Очікуваний рівень рентабельності при реалізації продукту	68%

## Продовження таблиці 3.2

1	2
27. Капіталовкладення в проект	5700400 грн
28. Період повернення капіталовкладень у проект	2,5 роки
29. Джерела фінансування	Основними джерелам фінансування можна назвати національні джерела: гранти, тощо. Також можливими є отримання міжнародного фінансування в сфері охорони здоров'я. Приватний капітал.
30. Основні компоненти продукції стартапу	Рекомбінантний білок RBD-GST аналог білка антигену вірусу Sars-Cov-2
31. Потенційні постачальники складових компонентів розробки	Постачальники: США, країни Європи, Китай, Україна, тощо.
32. Очікувана локалізація місяця реалізації результату розробки	Приватні лабораторії, лікарні.
33. Оцінка наявності посередників при реалізації	Посередником може виступати держава під час державних закупівель для лікарень
34. Методи просування результатів розробки на ринок	За допомогою реклами, та презентування продукції в лабораторіях, лікарнях, виставках, тощо.

## 3.2. Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Довкілля майже не чинить впливу на обране підприємство, але й водночас створює загрози та можливості для нього. До факторів зовнішнього середовища відносять: політичну, економічну, географічну, демографічну та культурну ситуацію, а також науково-технічний прогрес.

Таблиця 3.3 Аналіз довкілля

	<b>Загрози</b>	<b>Можливості</b>
1	2	3
<b>Економіка</b>		
1. Інфляція курсу валют	Погіршення купівельної здатності. Погіршення валютно-кредитного стану держави	Орієнтація на внутрішній ринок, стимулювання державної економіки
2. Підвищення податкового навантаження	Збільшення навантаження на підприємство	Зростання купівельної спроможності населення
3. Зростання мінімальної та середньої заробітних плат	Збільшення витрат на зарплатний фонд	Зростання купівельної спроможності населення
4. Нові робочі місця	Навантаження на заробітний фонд	Нарощування потужностей виробництва

Продовження таблиці 3.3

1	2	3
<b>Політика</b>		
1. Політична нестабільність в державі	Сповільнення економічних процесів; поганий інвестиційний клімат; нестійкий валютний курс.	відсутні
2. Лібералізація та покращення економічних умов, діджиталізація	відсутні	Зменшення податкового тиску на підприємства; зменшення кількості паперової документації – підвищення ефективності праці.
<b>Науково-технічний прогрес</b>		
1. Впровадження нових технологій у фармацевтичній сфері	Висока затратність на нове обладнання та реактиви	Застосування нових технологій, що покращують якість виготовленого товару, полегшують роботу.
2. Відплив інтелектуальних кадрів, зниження академічної доброчесності	Сповільнення науково-технічного прогресу в країні	відсутні
<b>Географія</b>		
Розташування в столиці	Велика вартість електроенергії, води та комунальних послуг	Зручна система дистрибуції продукції та отримання сировини; наявність кваліфікованих кадрів.
<b>Демографія</b>		
1. Еміграція населення та нерівномірне його розселення по території держави	Нерівномірний попит в регіонах	відсутні
<b>Культура</b>		
1. Інформування населення щодо пандемії	Велика кількість людей зневажливо ставиться до небезпеки захворювання на ковід	Збільшення зацікавленості людей в нових та доступних діагностичних засобах

До факторів оперативного довкілля відносять: споживачів, постачальників, посередників та конкурентів.

Таблиця 3.4 Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

<b>Фактори</b>	<b>Недоліки</b>	<b>Переваги</b>
1	2	3
Споживачі	Економічна та політична нестабільність. Зміна потреб споживачів, необхідність покращення наявного продукту	Покращення технологій для задоволення потреб якомога більшого числа населення
Постачальники	Труднощі та збільшення вартості при укладенні договорів на сировину та обладнання	Впровадження нових технологій
Посередники	Зростання витрат через співпрацю з посередниками	Технічний супровід, надання консультативних послуг та гарантії.
Конкуренти	Поява нових конкурентів знижує рентабельність виробництва через збільшення пропозицій на товар	Пошук нових ринків збуту

Таблиця 3.5 Оцінка зацікавленості сторін

<b>Зацікавлена сторона</b>	<b>Вплив сторони на реалізацію проекту</b>	<b>Цікавість сторони до проекту</b>	<b>Коефіцієнт впливу сторони на об'єкт</b>
1	2	3	4
<b>Суб'єкт зовнішнього оперативного середовища</b>			
Виробники (конкуренти)	Присутні виробництва, що виробляють схожі за властивостями продукти	зацікавлені	0,3
Постачальник	Виробництво продукції залежне від отримання сировини, обладнання, тощо.	зацікавлені	0,1
Споживачі	Лабораторії, лікарні зацікавлені в наданні послуг діагностики людям із симптомами захворювання або для видання відповідних довідок	зацікавлені	0,35
Посередники	Займаються логістикою та розповсюдженням продукції	зацікавлені	0,25

Продовження таблиці 3.5

1	2	3	4
<b>Зовнішнє середовище</b>			
Політичні структури	Зацікавлені у збільшенні податкових надходжень та вирішення епідеміологічних проблем	Зацікавлені	0,3
Суб'єкти економічного середовища	Поява конкуренції для інших гравців ринку, більше можливостей для споживачів, постачальників та посередників	Зацікавлені	0,4
Власники географічних об'єктів	Вплив відсутній	Відсутня	0
Суб'єкти демографії	Зменшення смертності завдяки своєчасному тестуванню	Частково	0,05
Суб'єкти культурного середовища	Інформування населення	Зацікавлені	0,1
Суб'єкти НТП	Співпраця для покращення продукту.	Зацікавлені	0,15

Таблиця 3.6 Оцінка можливостей та ризиків внутрішнього середовища

	<b>Можливості</b>	<b>Ризики</b>
1	2	3
Організація	Наявність кваліфікованого персоналу	Необхідний час для навчання та відпрацювання роботи персоналу з новою технологією
Виробництво	Власні виробничі потужності підвищують якість виконання роботи, є можливість слідкувати за якістю. Наявність власних патентів та технічної документації підвищує обізнаність та довіру споживача.	Повільні темпи на перших етапах запуску виробництва. Кваліфіковані працівники вимагатимуть високу заробітну плату.
1	2	3
Маркетинг	Висока якість товару. Високий попит на дану продукцію.	Пошук кваліфікованих маркетологів.
Фінанси	Наявні досвідчені кадри для бухгалтерського та фінансового обліку.	Потреба у фінансових вливаннях на перших етапах запуску виробництва

### 3.3. Визначення ключових факторів успіху проекту

Конкурентну спроможність товару проводять методом Шонфільда. Потенційними конкурентами обрано компанії, що випускають тест-системи. У якості конкурентів було обрано: ТОВ «ХЕМА», ТОВ «Бест Діагностик»

Оцінка характеристики проходить за п'ятибальною шкалою. Коефіцієнт значущості показника лежить в межах від 0 до 1.

Таблиця 3.7 Оцінка конкурентної спроможності за методом Шонфільда.

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Оцінка характеристик		
		Власна продукція	ТОВ «ХЕМА»	ТОВ Бест Діагностик»
Ціна	0,2	5	5	4
Чутливість тест-системи	0,3	5	3	4
Якість допоміжних матеріалів	0,1	4	4	4
Дотримання вимог нормативно-технічної документації	0,2	5	4	5
Наявність патентів та опублікованих статей, що підтверджують ефективність	0,2	4	3	3

Таблиця 3.8 Розрахунок оцінок характеристик

Характеристика	Бальна оцінка характеристик		
	Наша продукція	ТОВ «ХЕМА»	ТОВ «Бест Діагностик»
Ціна	$0,2*5=1,0$	$0,2*5=1,0$	$0,2*4=0,8$
Чутливість тест-системи	$0,3*5=1,5$	$0,3*3=0,9$	$0,3*4=1,2$
Якість допоміжних матеріалів, дотримання вимог нормативно-технічної документації	$0,1*4=0,4$	$0,1*4=0,4$	$0,1*4=0,4$
Дотримання вимог нормативно-технічної документації	$0,2*5=1$	$0,2*4=0,8$	$0,2*5=1$
Наявність патентів та опублікованих статей, що підтверджують ефективність	$0,2*4=0,8$	$0,2*3=0,6$	$0,2*3=0,6$

На основі розрахованих значень будуємо графік порівняння конкурентних переваг нашої продукції з конкурентами.

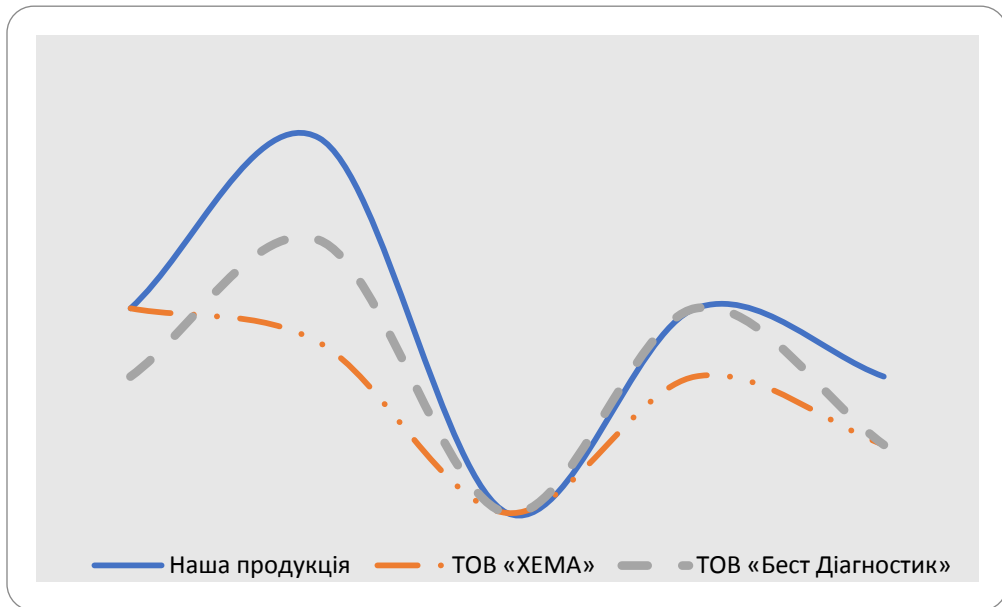


Рисунок 3.1 Порівняння конкурентних переваг виробництва з конкурентами

Таблиця 3.9 Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
1. Незалежне виробництво рекомбінантного білку з подальшим використанням у власних тест-системах	Отримання рекомбінантного білку для різних цілей: виробництво швидких та ІФА тестів, можна продавати і як кінцевий продукт
2. Виробництво на базі вже існуючого підприємства	Увійти до складу вже існуючої компанії. Менше прав та можливості приймати рішення. Нижчі ризики банкрутства.

### 3.4. Визначення потенційних споживачів

Таблиця 3.10 Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
1	2
<b>1. Юридична особа</b>	
1. Форма власності (державне, приватне, колективне, комунальне, змішане,...)	Державне, приватне

## Продовження таблиці 3.10

1	2
2 КВЕД	Секція Q Охорона здоров'я та надання соціальної допомоги Розділ 86 [81] Охорона здоров'я
3 За потужністю (малі, середні, великі)	Середні, великі
4 За масштабом виробництва (одиничні, серійні, масові)	Серійне виробництво
5 За рівнем спеціалізації (вузькопрофільні, багатoproфільні, комбіновані)	Вузькопрофільні, комбіновані
6 За ресурсами, що споживаються (працемістки, матеріаломістки, капіталомістки, інформація)	Працемістки
7 За чисельністю персоналу (малі, середні, великі)	Середні, великі
8 За сферою діяльності (виробничі, комерційні, фінансові, посередницькі, страхові...)	Комерційні, медичні
9 За приналежністю капіталу і контролю (національні, іноземні, спільні багатонаціональні,...)	Національні
10 За географічним розташуванням	Вся Україна
11 За віддаленістю органів управління (національні, міжнародні, офшорні, транснаціональні,...)	Національні
12 За характером господарської діяльності (промислові, сільськогосподарські, транспортні, будівельні, фінансово-кредитні, страхові, туристичні, консалтингові,)	Посередницькі. комерційні
13 За рівнем технологічної цілісності (провідні, дочірні, філії,...)	Провідні, філії
14 За долею іноземного капіталу (з іноземними інвестиціями (більше 10%), іноземне підприємство (100%)).	З іноземними інвестиціями
15 За формуванням статутного капіталу (унітарні, корпоративні)	Унітарні, корпоративні
16 За організацією виробничих процесів (періодичні, безперервні)	безперервні
17 За роботою протягом року (сезонні, позасезонні)	позасезонні
18 За географічним розташуванням на території України	Вся територія України
19 За наявністю вільних ОбЗ (коштів)	Вільні ОбЗ

## Продовження таблиці 3.10

1	2
20 За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи: Регіон Чисельність населення Динаміка росту регіону Структура регіону Правові обмеження торгівлі	1. Вся Україна 2. 41,9 мільйона (2019) 3. природний приріст: -0,41 % (220-те місце у світі)

Таблиця 3.11 Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія (група) клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Розробленого продукту
Державні медичні заклади (лабораторії, станції переливання крові, лікарні тощо)	Якісна швидка діагностика захворювання, що сприяє покращенню загальної динаміки захворюваності по країні
Науково-дослідні установи	Наукові дослідження, пошук нових лікувальних засобів, діагностичних тест-систем, тощо.
Приватні лабораторії та клініки	Доступна, швидка та якісна діагностика для широких верств населення
<b>Відкоригована ідея стартап проекту</b>	
Виготовлення і продаж імуноферментних тест-систем для виявлення IgG та IgM-антитіл до RBD білку вірусу SARS-Cov-2 для потреб лабораторій та медичних установ, а також експорт готової продукції за кордон. Приватне науково-виробниче підприємство.	

Таблиця 3.12 Паспорт потенційного клієнта (юридичні особи)

Характеристика	Значення	Примітки
1	2	3
Організаційно-правова форма	Державне, приватне	-
Класифікація -за потужністю -за чисельністю персоналу -за обсягом виробництва -за сезонністю виробництва -інше	1. Великі і середні підприємства 2. Великі і середні підприємства 3. Серійні 4. Позасезонні	-
Розташування -місто -сміт -село -інше	- Місто - СМТ	-
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Набори тест-систем, рекомбінантний білок	-

Продовження таблиці 3.12

1	2	3
Призначення придбаної розробки: -за призначенням -інше	Діагностика вірусу SARS-Cov-2	-
Кваліфікація персоналу підприємства -робочі -службовці -керівники	Лаборанти Медики Науково-медичні працівники	-
Потенційний обсяг споживання розробки -одиниця -1-5 -інше	Близько 1000 одиниць/рік	-

Таблиця 3.13 Запланований обсяг реалізації стартап-продукту

	Січень, 2021	Лютий, 2021	Березень, 2021	Квітень, 2021	Травень, 2021	Червень, 2021	Липень, 2021	Серпень, 2021	Вересень, 2021	Жовтень, 2021	Листопад, 2021	Грудень, 2021
Запланований обсяг виготовлення імуноферментних тест-систем	1500	1900	1400	1400	900	900	700	700	700	700	700	500

### 3.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Таблиця 3.14 Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
	Кількість, од./рік	Ціна, грн/од.	Кількість, од./рік	Ціна, грн/од. Середнє значення по всіх конкурентах
Тест-система імуноферментна	12 000	3150	10 000	$\Sigma = \frac{3300+2800}{2} = 3050$

#### Основні методи ціноутворення:

1. Витратний метод:

$C = C + \text{фіксований відсоток прибутку (від собівартості) [грн/од]} \text{ (або середня норма прибутку по даному виду товару),}$

де  $\Pi$  – прогнозована ціна товару, грн/од,

$C$  – розрахована автором ідеї, технології, методики очікувана собівартість товару, грн/од.

Ринкова ціна однієї тест-системи складає 1500 грн.

Оптова ціна закупки тест-систем без врахування торгової надбавки (не більше 12% для виробів медичного призначення) становить:

$$\Pi_{зак.} = 3150 - (3150 \cdot 0,12) = 2760 \text{ (грн.)}$$

Відпускна ціна без врахування посередницької надбавки, що складає близько 10 % становить:

$$\Pi_{відп.} = 2750 - (2750 \cdot 0,1) = 2475 \text{ (грн.)}$$

Необхідно визначити ціну для виробника без врахування ПДВ (що складає 7% для виробів медичного призначення):

$$\Pi_{вир.} = 2475 - (2475 \cdot 0,07) = 2301,75 \text{ (грн.)}$$

Ціна виробника включає в себе прибуток підприємства, а також собівартість виробництва. Прибуток підприємства приймаємо рівним 20% за одиницю продукції, тому собівартість одиниці продукції становить:

$$C_{од.} = 2301,75 - (2301,75 \cdot 0,20) = 1841,4 \text{ (грн./од.)}$$

Таким чином, ціна на одну тест-систему, визначена витратним методом, складатиме:

$$\Pi = C_{од.} + 3\%C_{од.} = 1841,4 + 38,173 = 1879,57 \text{ (грн./од.)}$$

Отримана ціна дозволяє досягти беззбитковості, але прибуток при цьому буде мінімальним.

2. Агрегатний метод:

$$= \sum_{i=1}^{i=n} \Pi_i, \text{ [грн/од. ],}$$

де  $\Pi$  – ціна ідеї, за якою автор пропонуватиме її на ринку, грн/од.;

$\Pi_i$  – ціна  $i$ -того компоненту багатоконпонентного товару, грн/од. (всі компоненти наведенні в табл. 15;

Ціна на етапі впровадження:

$$\Pi = 76,95 \text{ грн/шт}$$

Ціна при виході на планову потужність складає:

$$C = 55,3 \text{ грн/шт}$$

3. Параметричний метод – враховує вагомість якісних параметрів

$$C_{н.м.} = C_{б.м.} \frac{B_{н.м.}}{B_{б.м.}}, [\text{грн/шт.}]$$

де  $C_{н.м.}$  – ціна нової моделі, тобто ідеї, за якою ми пропонуватимемо її на ринку, грн/од.;

$C_{б.м.}$  – ціна базової моделі, тобто аналогу ідеї, яка вже існує на ринку, грн/од.;

$B_{н.м.}$  – Балова експертна оцінка нової моделі характеристик нової технології;

$B_{б.м.}$  – Балова експертна оцінка базової моделі характеристик існуючої технології.

Таблиця 3.15 Розрахунок ціни на товар

Продукт	Параметри										Ціна
	Ціна		Чутливість тест-системи		Якість допоміжних матеріалів		Дотримання вимог нормативно-технічної документації		Наявність патентів та опублікованих статей що підтверджують ефективність		
	бали	коефіцієнт вагомості	бали	коефіцієнт вагомості	бали	коефіцієнт вагомості	бали	коефіцієнт вагомості	бали	коефіцієнт вагомості	
Аналог	65	0,2	72	0,3	71	0,1	70	0,2	70	0,2	61,4
Новий продукт	67	0,2	75	0,3	80	0,1	70	0,2	85	0,2	74,9

Ціна існуючого продукту: 3050 грн, таким чином ціна розрахована параметричним методом становить:

$$C_{н.м.} = 3050 \cdot \frac{70}{61,6} = 3495 \frac{\text{грн}}{\text{шт}}$$

## 4. Конкурентний метод

Ціна конкурентів становить 3050грн/шт, але зважаючи на те, що якість нашої продукції буде вищою, ніж в конкурентів, то наша ціна може бути вищою за ціну конкурентів на 5%.

Таблиця 3.16 Калькуляція собівартості стартап-продукту

№ п/п	Етап розробки / елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник, грн
1	2	3	4
1	<b>Етап впровадження:</b>		
1.1	<i>Амортизаційні відрахування на утримання усіх ОЗ підприємства:</i>		
	Обладнання та устаткування	1/10 (амортизація ОЗ)	45 000
	Робоче обладнання	1/10 (амортизація ОЗ)	5 000
	Приміщення	1/10 (амортизація ОЗ)	50 000
	Штами клітин для проведення напрацювання біологічних агентів	1/10 (амортизація ОЗ)	4 700
1.2	<i>Затрати на сировину і матеріали:</i>		
	Середовища для культивування	500 кг	500
	Хімічні реактиви для процесів	750 кг	700
	Допоміжні матеріали, матеріали для пакування тощо	20 000 шт	200
	Готові компоненти, складові тест-систем	15 л	100 000
	Вода водопровідна	1000 м3	23
	Електроенергія	50 000 КВт	2,50
1.3	Сума заробітної плати всіх працівників підприємства:	22 особи	121 200
1.4	Єдиний соціальний внесок (нарахування на заробітну плату):	22 %	26 664
	<b>Всього:</b>	-	353 989,5
	<b>На 1 тест-систему</b>	-	76,95
2	<b>Етап виходу на планову потужність:</b>		
2.1	<i>Амортизаційні відрахування на утримання усіх ОЗ підприємства:</i>		
	Обладнання та устаткування	1/10 (амортизація ОЗ)	45 000
	Робоче обладнання	1/10 (амортизація ОЗ)	5 000
	Приміщення	1/10 (амортизація ОЗ)	50 000

Продовження таблиці 3.16

1	2	3	4
2.2	Штами клітин для проведення напрацювання біологічних агентів	1/10 (амортизація ОЗ)	4 700
	<i>Затрати на сировину і матеріали:</i>		
	Середовища для культивування	500 кг	500
	Хімічні реактиви для процесів	750 кг	700
	Допоміжні матеріали, матеріали для пакування тощо	20 000 шт	200
	Готові компоненти, складові тест-систем	15 л	100 000
	Вода водопровідна	1000 м <sup>3</sup>	23
2.3	Електроенергія	50 000 КВт	2,50
2.4	Сума заробітної плати всіх працівників підприємства:	22 особи	121 200
	Єдиний соціальний внесок (нарахування на заробітну плату):	22 %	26 664
	<b>Всього:</b>	-	353 989,5
	<b>На 1 тест-систему</b>	-	55,3

Таблиця 3.18 Забезпеченість проекту основними засобами

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість ОЗ	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
1	2	3	4	5	6
Всі технологічні процеси виготовлення продукції мають відбуватися в приміщенні	Приміщення	700 000 грн	40 років	Продавець/орендодавець	Банківський кредит
Проведення основних стадій технологічного процесу: культивування м/о, лізис біомаси, очистка готових біопродуктів, тощо.	Лабораторне обладнання для проведення ферментації та очистки біопродуктів	300 000 грн	25 років	Можливі варіанти купівлі бувшого у використанні обладнання	Банківський кредит

## Продовження таблиці 3.18

1	2	3	4	5	6
Процеси розливу готових біокомпонентів тест-систем	Лінія автоматизованого розливу біокомпонентів	350 000 грн	20 років	Можливі варіанти купівлі бувшого у використанні обладнання	Банківський кредит
Всі технологічні процеси	Робоче обладнання лабораторій	50 000 грн	20 років	Європа, Україна	Банківський кредит

Таблиця 3.19 Забезпеченість проекту оборотними фондами

Група ОбФ	Назва	Норма витрат на рік,	Ціна, грн/од	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
1	2	3	4	5	6
Сировина та матеріали	Середовища для культивування	500 кг	1300	ТОВ «Фармактив», Україна, «Merck», Німеччина	Власні кошти
Сировина та матеріали	Хімічні реактиви для процесів	750 кг	1800	«Merck», Німеччина «Sigma-Aldrich», США, тощо	Власні кошти
	Допоміжні матеріали, матеріали для пакування тощо	20 000 шт	450	ТОВ «АЛЕКСФАРМА», Україна, тощо	Кредит
	Готові компоненти, складові тест-систем	15 л	100 000	ТОВ «БиоВитрум», Україна, тощо	Грант
Вода, енергоносії	Вода	1000 м <sup>3</sup>	23 <sup>3</sup>	ПрАТ АК Київводоканал	Власні кошти
	Електроенергія	50 000 кВт	1,68	ТОВ "Київська обласна енергопостачальна компанія"	Кредит
	Паливо	300 л	33	Україна	Власні кошти

Таблиця 3.20 – Забезпеченість проекту трудовими ресурсами [82]

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Кваліфікаційні вимоги	Плановий рівень заробітної плати (з ЄСВ) в грн
1	2	3	4	5
Робочі основні	Лаборант-біотехнолог (3211)	9	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст) з бажаним стажем роботи не менше одного року.	13 000
Робочі допоміжні	Технік-електрик (3113)	1	Професійно-технічна освіта	13 000
	Апаратник	3	Професійна технічна або вища освіта технічного спрямування. Забезпечення роботи обладнання, ведення документації	13 000
Спеціалісти	Інженер-технолог (2149.2)	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст), досвід роботи не менше 3 років.	15 000
	Провідний-технолог (3211)	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст), досвід роботи не менше 7 років.	20 000
	Мікробіолог (3211)	1	Повна вища освіта мікробіологічного, біотехнологічного напрямку підготовки (магістр, кандидат біологічних наук), досвід роботи не менше 5 років.	15000
Молодший персонал обслуговування	Лаборант-мікробіолог (8229)	3	Не повна або повна вища освіта біологічного або біотехнологічного напрямку підготовки (бакалавр, магістр).	8 000
	Лаборант (хімічні та мікробіологічні дослідження) (3111)	1	Не повна або повна вища освіта біологічного, хімічного або біотехнологічного напрямку підготовки (бакалавр, магістр).	8 000
	Комплектувальник	4	Професійна технічна або вища освіта за даним напрямком. Забезпечення комплектації готової продукції	8000

## Продовження таблиці 3.20

1	2	3	4	5
Бухгалтерський апарат	Головний бухгалтер (1231)	1	Вища економічна освіта (магістр, спеціаліст) з досвідом роботи від 5 років.	16 000
	Бухгалтер (3433)	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст).	13 000
Керівники	Керівник наукового, відділу	1	Повна вища освіта біологічного, хімічного або біотехнологічного напрямку підготовки (кандидат або доктор відповідних наук) з досвідом роботи від 7 років.	25 000
	Директор з продажу та маркетингової політики	1	Повна вища освіта відповідного напрямку підготовки (магістр, спеціаліст).	20 000

Таблиця 3.21 Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Умовне позначення, формула розрахунку
1	2	3
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	Шт	В 12 000
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Осіб	$Ч_{сп} = Ч_{яв} \times К_{пер}$ 28 особи
3. у тому числі:		
- основних	Осіб	- 21
- допоміжних		- 4
- інженерно-технічного персоналу		- 3
4. Середньорічний виробіток робітника (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Од./особу	$ППс.p. = В/Ч_{сп}$ $ППс.p. = 428,5$
5. Капіталовкладення у проект (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту):		$К = ОФ + ОБК$ $К = 5700400$ грн.
- всього	Грн. Грн./од.	3150 Грн./од
- на одиницю продукції		
6. Повна собівартість (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту):		$С = А + ОБК$ $С = 4358829$ грн.
- всього	Грн. Грн./од.	1841,4 Грн./од.
- на одиницю продукції		

## Продовження таблиці 3.21

1	2	3
7. Відносний прибуток (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Грн./од.	$\Pi = \text{Ц} - \text{С}$ $\Pi = 1309$
8. Рентабельність (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	%	$R = (\Pi / \text{С}) \times 100$ $R = 68,2$
9. Період повернення капіталовкладень (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Років	$T_{\text{пов}} = \text{К} / \Pi$ $T = 2,5$
10. Фондовіддача виробничих фондів (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Грн./грн.	$\Phi\text{В} = (\text{Ц} \times \text{В}) / \text{ОФ}$ $\Phi\text{В} = 4,11$
11. Фондоємкість (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Грн./грн.	$\Phi\text{С} = 1 / \Phi\text{В}$ $\Phi\text{С} = 0,24$
12. Продуктивність праці (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	Грн./підрозділ	$\text{ПП} = \text{В} / (\text{Ч}_{\text{сп}} \times \text{T})$ $\text{ПП} = 310000 \text{ грн}$
13. Коефіцієнт економічної ефективності (окремо на процес розробки і на процес реалізації проекту)	-	$E = \Pi / \text{К} = 0,67$

## 3.6. Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту

Таблиця 3.22 – Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

Стадія реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат, грн
1	2	3	4	5
Етап 1 Розробка ідеї стартапу	Дослідження ринку, наукової літератури, тощо	комп'ютер, інтернет, канцелярія	1 місяць	10000
	Розробка стартап-проекту	Робота розробників, комп'ютер, інтернет, канцелярія	1 місяць	50 000
	Закупка сировини та матеріалів	Робота керівництва	2 місяці	500000
	Проведення комунікацій	Робота персоналу, спеціаліст в данній галузі	1 місяці	1000000
	Ремонт приміщень і встановлення апаратів	Робота ремонтних бригад	2 місяці	

Продовження таблиці 3.22

1	2	3	4	5
Етап 1 Розробка ідеї стартапу	Тестування та введення в експлуатацію апаратури	Робота персоналу	2 місяці	1000000
	Нарощування біомаси	Робота персоналу, лабораторне обладнання, поживні середовища, реактиви	2 місяці	
	Підписання контрактів та договорів	Робота керівництва	1 місяці	
Етап 2 Впровадження у виробництво	Очищення біопродуктів з біомаси	Робота персоналу, лабораторне обладнання, хімічні реактиви	1 місяці	1250000
	Сорбція першої партії тест-систем	Робота керівництва і персоналу, лабораторне обладнання, хімічні реактиви, пакувальна лінія	1 місяці	
	Продаж перших партій тест-систем	Робота керівництва	2 місяці	
	Робота над вдосконаленням технологічних процесів та їх відпрацювання	Працівники, обладнання	2 місяці	
	Отримання відповідних дозволів, реєстрація тест-системи	Робота керівництва	2 місяці	
Етап 3 Масова реалізація	Пошук компаній, приватних лабораторій, дослідницьких центрів куди буде збуватись продукт	Працівники у сфері реклами та продажу, робота керівництва	1 місяць	250000
	Рекламна кампанія, таргетинг			

Таблиця 3.23– Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Елементи						
	Розробник	Науково-виробничі керівники	Маркетинговий директор	Спеціалісти	Бухгалтерський апарат	Робочі допоміжні	Робочі основні
1	2	3	4	5	6	7	8
Дослідження ринку, наукової літератури, тощо	+	+	-	-	-	-	-
Розробка стартап-проекту	+	-	-	-	-	-	-
Закупка сировини та матеріалів	+	+	+	+	-	-	-
Проведення комунікацій	+	+	-	+	+	-	-
Ремонт приміщень і встановлення апаратів	-	-	-	-	-	+	-
Тестування та введення в експлуатацію апаратури	-	-	-	-	-	+	-
Нарощування біомаси	-	-	-	+	-	+	+
Підписання контрактів та договорів	-	-	-	+	-	+	-
Очищення біопродуктів з біомаси	-	+	-	+	-	-	+
Сорбція першої партії тест-систем	-	+	-	+	-	-	+
Продаж продаж перших партій тест-систем	-	-	+	-	+	-	-
Робота над вдосконаленням технологічних процесів та їх відпрацювання	-	+	-	+	-	+	+
Отримання відповідних дозволів, реєстрація тест-системи	+	+	+	+	-	-	-

## 3.7. Ризики стартап-проекту та методи управління ними

Таблиця 3.24 Ризики інноваційної розробки

Назва процесу / стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
1	2	3	4
Розробка ідеї стартапу	Дослідження ринку, наукової літератури, тощо	Велика кількість однотиповго матеріалу, складнощі дослідження через пандемію	-
	Розробка стартап-проекту	-	Тривалий процес, відсутність натхнення

Продовження таблиці 3.24

1	2	3	4
Реалізація ідеї	Підписання контрактів та договорів	Закриття підприємств	-
	Закупка матеріалів	Ріст цін	Отримання бракованих партій
	Проведення комунікацій	Ріст цін	Відсутність ефективного менеджменту
	Ремонт приміщень і встановлення апаратів	Ріст цін	Дефіцит коштів і дорогий кредит
	Тестування та введення в експлуатацію апаратури	Збільшення вартості запасних частин	Вихід обладнання з ладу
	Нарощування біомаси	Зростання цін на енергоносії та сировину	Вихід з ладу обладнання, контамінація культури
Впровадження у виробництво	Очищення біопродуктів з біомаси	-	Неефективна, неуважна робота співробітників
	Сорбція першої партії тест-систем	Збільшення вартості сировинних матеріалів	Неефективна робота співробітників
	Продаж продаж перших партій тест-систем	Зниження росту зацікавленості у продукті	Поява конкурентного продукту з аналогічними якістьми
	Робота над вдосконаленням ліній клітин, що використовуються для напрацювання біопродуктів	Зниження росту зацікавленості у продукті	Неефективна мотивація співробітників Брак інтелектуального ресурсу для проведення даного типу робіт
Впровадження у виробництво	Отримання відповідних дозволів, реєстрація тест-системи	Проблеми, пов'язані з роботою бюрократичного апарату, штучне затягування процесів	Неефективна мотивація співробітників
Масове виробництво	Збільшення виробничих потужностей за рахунок збільшення отримання біопродуктів	Зниження росту зацікавленості у продукті	Неефективна мотивація співробітників

Таблиця 3.25 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
<b>Зовнішні ризики</b>			
<b>Економічні</b>	Більша кількість потенційних конкурентів	Висока	Середня
	Зростання цін або відсутність у наявності сировини та матеріалів	Середня	Середній
	Відсутність зацікавленості у продукті	Низька	Середній
	Відсутність прибутку	Середня	Висока
<b>Науково-технічний прогрес</b>	Поява конкурентних підприємств що використовують нові ефективніші методики виробництва	Низька	Середній
	Розвиток альтернативних методів	Середня	Середній
	Вплив на оточуюче середовище	Низький	Низький
	Негативні публікації	Висока	Низький
<b>Демографічні</b>	Еміграційні процеси	Середня	Низький
<b>Політичні</b>	Збільшення працевітності підприємства	Низька	Низький
	Лобіювання інтересів конкурентів	Низька	Низький
	Блокування тендерних закупівель	Середня	Середній
<b>Внутрішні ризики</b>			
<b>Виробничі</b>	Дефіцит коштів на закупку сировини та матеріалів	Висока	Високий
	Недотримання технології виробництва	Середній	Високий
	Підвищення заробітної плати	Високий	середній
<b>Персонал</b>	Невмотивованість персоналу	Середня	Середній
	Саботаж	Низький	Високий
<b>Організація виробництва</b>	Неефективний менеджмент, поганий маркетинг	Низький	Високий

Таблиця 3.26 Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат		За ймовірністю настання ризиків		
Критерій ризику	Числове значення	Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
		1	2	3
Високий рівень впливу	3	2* (1 x 3) (жовта зона)	2* (2 x 3) (червона зона)	1* (3 x 3) (червона зона)
Середній рівень впливу	2	2* (1 x 2) (зелена зона)	4* (2 x 2) (жовта зона)	2* (3 x 2) (червона зона)
Низький рівень впливу	1	3* (1 x 1) (зелена зона)	1* (2 x 1) (зелена зона)	1* (3 x 1) (жовта зона)

Таблиця 3.27 – План заходів з управління ризиками

<b>Назва ризику</b>	<b>Назва методу управління ризиком</b>	<b>Відповідальні виконавці</b>	<b>Період виконання / застосування методу</b>	<b>Очікувані результати від впровадження методів управління</b>
Зростання цін на сировину та матеріали	Пошук нових постачальників сировини та матеріалів для виробництва	Керівництво підприємства	2 місяці	Зниження вартості продукції за допомогою зменшення цін на сировину та матеріали
Стрімкий розвиток конкурентних підприємств за рахунок використання новіших методик	Постійна наукова праця в напрямку покращення вже існуючих методик та впровадження нових	Наукові працівники, керівництво	Весь час	Збільшення конкурентоспроможності підприємства за рахунок розвитку
Блокування тендерних закупівель	Формування позитивної репутації про підприємство на Українському ринку та вихід на іноземні ринки	Маркетинговий відділ, керівництво	Весь час	Збільшення об'ємів продажів за рахунок формування міжнародних відносин з потенційними клієнтами закордоном
Дефіцит коштів і не вигідні умови кредитування	Пошук інвесторів, отримання кредитів в різних банках, вихід на грантодавчі організації	Керівництво	2 місяці	Подолання дефіциту коштів

## ВИСНОВКИ

1. Об'єктом дослідження в роботі було обрано рекомбінантний протеїн *GST-RBD*, у якості продуцента був обраний штам *E. coli* Rosetta (DE3) з плазмідною: *pET28a-GST-RBD*.

2. Проведено аналіз літератури, щодо мікробного продуцента, обґрунтовано вибір об'єкта дослідження та наведено його характеристики. Розглянуто генетичні механізми синтезу цільового продукту та можливих проблем пов'язаних з його напрацюванням.

3. Рекомбінантний білок *GST-RBD*, отриманий в процесі культивування продуцента *E. coli* Rosetta (DE3)/*pET28a-GST-RBD*, здатний накопичуватися у клітинах бактерії у двох формах: розчинній та у вигляді тілець включень.

4. Встановлено вплив складу поживних середовищ, температури культивування та концентрації ІПТГ на вихід та імунохімічні властивості білку. Показано, що оптимальними умовами для отримання розчинної фракції є наступні: поживне середовище ТВ, температура культивування – 37 °С, концентрація ІПТГ – 0,1 мМ, проведення індукції за оптичної густини – 0,3 о.о та час культивування після індукції – 4 години.

5. Після проведення двохступеневого хроматографічного очищення із використанням іммобілізованої метало-афінної (сорбент IDA-toyopearl) та афінної хроматографій (глутатіон-сефароза) дозволило підвищити специфічність ІФА, не призводячи до зменшення його чутливості. Питомий вихід очищеного препарату становив ~70% (72,46%) від усієї кількості рекомбінантного білку, синтезованого у клітинах продуцента.

6. Розроблено стартап-проект, сутність ідеї якого полягає у застосуванні отриманого з розчинної фракції клітин бактерій *E.coli* Rosetta (DE3)/*pET28a-GST-RBD* високоактивного препарату рекомбінантного білка – аналога рецепторзв'язуючого домена спайкового S глікопротеїна коронавіруса SARS-CoV-2, у складі імуносорбенту при розробці вітчизняних імуноферментних тест-систем для діагностики коронавірусної інфекції COVID-19.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it) (2020).
2. Gorbalenya, A. E., et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2.
3. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19)-Situation report-45. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200305-sitrep-45-covid-19.pdf?sfvrsn=ed2ba78b\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200305-sitrep-45-covid-19.pdf?sfvrsn=ed2ba78b_2) (2020).
4. Zhu, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733 (2020).
5. Що варто знати про тести імуноферментного аналізу (іфа-тести) на covid-19 url:<https://phc.org.ua/news/scho-var-to-znati-pro-testi-imunof fermentnogo-analizu-ifa-testi-na-covid-19> (дата звернення 11.12.20)
6. Jamshaid H, Zahid F, Ud Din I et al. Diagnostic and Treatment Strategies for COVID-19. *AAPS PharmSciTech.* 2020. 21: 222.
7. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano.* 2020;14:3822–35. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>.
8. Vashist SK. In vitro diagnostic assays for COVID-19: recent advances and emerging trends. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020.
9. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. ACS Publications; 2020.
10. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.
11. BioMedomics. COVID-19 IgM/IgG Rapid Test. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://www.biomedomics.com/products/infectious-disease/covid-19-rt/> (2020). (4 09.2020).
12. Diazyme. Diazyme DZ-Lite SARS CoV-2 IgM and IgG CLIA Kits. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://www.diazyme.com/dz-lite-sars-cov-2> (4 09.2020).
13. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann Intern Med.* 2020;172:577–82.
14. Dai L, F Gao G. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology.* 2021; 21:73–82.
15. Wang, N., Shang, J., Jiang, S. & Du, L. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. *Front. Microbiol.* 28 Feb 2021 [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00298/full>

16. Коршун Л. Н., Мойса Л. Н., Ганова Л. А., Вудмаска М. И., Ковтонюк Г. В., Киселёва Е. К., Спивак Н. Я. Влияние физиологического состояния клеток бактерий *Escherichia coli* на экспрессию растворимого белка – рекомбинантного аналога гликопротеина G вируса простого герпеса 2 типа // *Мікробіол. журн.*, 2011, Т. 73, № 5. С. 36 – 37.
17. Галкін О. Ю. Біотехнологічні способи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань / О. Ю. Галкін, В. П. Ширококов, А. А. Григоренко. – Київ: НТУУ "КПІ", 2015. – 204 с.
18. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи в 2 томах / Хоулт Дж., Криг Н., Смит П.. – Москва: Мир, 1997.
19. Морфология кишечной палочки и ее представителей [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: [https://studbooks.net/1368853/meditsina/morfologiya\\_kishechnoy\\_palochki\\_predstaviteley](https://studbooks.net/1368853/meditsina/morfologiya_kishechnoy_palochki_predstaviteley)
20. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія [Текст]: Підручник для студ. вищ. мед. навч. закладів IV р. акред. / Т. В. Андріанова, Т.В. Виноград Н.О. Бобир, В. Г. Войцеховський та ін.; За ред. В.П. Широкова. - 2-е вид. - Вінниця: Нова Книга, 2011. - 952 с.
21. М.В. Падкина, Е.В. Самбук. Генетически модифицированные микроорганизмы — продуценты биологически активных соединений. // *Экологическая генетика. ТОМ XIII. - №2. – 2015. С. 36 – 39.* Режим доступа: <https://journals.eco-vector.com/ecolgenet/article/viewFile/2479/2094>
22. Shiloach J., Fass R. Growing *E. coli* to high cell density--a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv.* 2005 Jul;23(5):345-57.
23. Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol.* 2007 Dec;189(23):8746-9.
24. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам эшерихий, выделенных в многопрофильном стационаре. // *Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – №4. – С. 84-86.* Режим доступа: <https://journals.eco-vector.com/jowd/article/viewFile/5826/4601>
25. Сидоренко С. В., Тишков В. И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / *Успехи биологической химии*, т. 44, 2004, С. 263—306. Режим доступа: <http://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/sidorenko.pdf>
26. Глик Б., Пастернак Дж., Молекулярная биотехнология Принципы и применение./ Б. Глик, Дж. Пастернак – М.: Мир, 2002. – 589 с.
27. Яремчук К. Экспрессия рекомбинантных белков: системы вектор-носитель / К. Яремчук. // *МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. – 2012. – №2*
28. Биосинтез белка и его регуляция. Пособие для школьников, абитуриентов, студентов/ Автор кандидат биологических наук, доцент А.Н. Леонтьева – Нижний Новгород, Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского 2005 г. Режим доступа: <http://window.edu.ru/resource/630/45630/files/unn057.pdf>
29. Биологический синтез белка: учебное пособие / Р.У. Высоцкая, А.А. Егорова; Федеральное агентство по образованию, ГОУВПО «КГПА». –

- Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2011. 20 с. Режим доступа: [http://elibrary.krc.karelia.ru/397/1/biosintez\\_belka.pdf](http://elibrary.krc.karelia.ru/397/1/biosintez_belka.pdf)
30. Neidhardt, F.C. et al. (1987) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology Vol. 1. American Society for Microbiology.
  31. Hatfield G. W., Roth D. A. Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly [CODA] and Translation Engineering. *Biotechnology Annual Review*, 2007, vol. 13, pp. 27-42.
  32. Ario de Marco. Recent contributions in the field of the recombinant expression of disulfide bonded proteins in bacteria / Ario de Marco. // *Microbial Cell Factories*. – 2012. – №11.
  33. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research / Rene Assenberg, Paul T Wan, Sabine Geisse, Lorenz M Mayr. Author links open the author workspace. // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2013. – №3. – С. 393–402.
  34. Germán L. Rosano. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges / Germán L. Rosano, Eduardo A. Ceccarelli. // *Front Microbiol*. – 2014. – №5.
  35. Makrides S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. // *Microbiol. Rev.* 1996. Vol. 60. P. 512–538.
  36. Сысуев Б. Б., Покровская Ю.С. Рекомбинантные микроорганизмы и клеточные культуры в технологии получения препаратов белков // *Фармацевтическая технология и нанотехнологии*. – №3. – С. 97 – 99. Б.Б. Сысуев, Ю.С. Покровская. Режим доступа: <https://pharmjournal.ru/assets/files/november2015/10.pdf>
  37. The genome sequence of *E. coli*: comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli* / Colin T Archer, Ji Hyun F Kim, Haeyoung Jeong та ин.]. // *BMC Genomics*. – 2011. – №12.
  38. Novagen pET expression manual [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <http://www.merckmillipore.com/INTL/en/search/pET+system+manual>
  39. Дабер Р. Структурный анализ lac-репрессора, связанного с аллостерическими эффекторами / Дабер Р., Стейрук С., Розенберг А., Льюис М. // *Журнал молекулярной биологии* -2007.- №370, С. 609-619.
  40. A comparison of inoculation methods to simplify recombinant protein expression screening in *Escherichia coli* / D. Busso [et al.] // *BioTechniques*. 2008. P. 101–106
  41. Novagen pET system manual [Электронный ресурс] – Режим доступа до ресурсу: <https://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>
  42. Tegel H Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3) / Tegel H, Tourle S, Ottosson J, Persson A.// *Protein Expr Purif.* 2010 Feb;69(2) P 159-67
  43. Laursen BS, Sørensen HP, Mortensen KK, Sperling-Petersen HU. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005; 69(1):101–23. <https://doi:10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005>

44. Sivashanmugam A. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. / Sivashanmugam A, Murray V, Cui C. // *Protein Sc.* – 2009. – №5.
45. Sahdev S., Khattar S. K., Saini K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 307 249–264
46. Berkholz R, Röhlig D, Guthke R, Data and knowledge based experimental design for fermentation process optimization. *Enzyme Microb Technol.* 2000; 27(10):784-88. [https://doi:10.1016/s0141-0229\(00\)00301-x](https://doi:10.1016/s0141-0229(00)00301-x)
47. Wanner B. L., Kodaira R., Neidhardt F. C. (1978). Regulation of lac operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *J. Bacteriol.* 136 947–954
48. Soares C. R., Gomide F. I., Ueda E. K., Bartolini P. (2003). Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the lambdaPL promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Eng.* 16 1131–1138
49. Slavchenko I. Yu., Shmidt V. A., Chernykh S. I., Kordyum V. A. Peculiarities of a target gene expression in the structure of the phage lambda-base vector and investigation of ways of its optimization. *Biopolym. Cell.* 2003; 19(1):81-8.
50. Esposito D, Chatterjee DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Cur Opin Biotechnol.* 2006; 17(4):353–8.
51. Qing G., Ma L. C., Khorchid A., Swapna G. V., Mal T. K., Takayama M. M., et al. (2004). Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22 877–882
52. Stano N. M., Patel S. S. T7 lysozyme represses T7 RNA polymerase transcription by destabilizing the open complex during initiation. *J. Biol. Chem.* (2004). 279 16136–16143
53. Strocchi M., Ferrer M., Timmis K. N., Golyshin P. N. (2006). Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics* 6 193–206
54. Basu A., Li X., Leong S. S. (2011). Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 241–251
55. Rabhi-Essaffi I, Sadok A, Khalaf N, Fathallah MD. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon as a GST-fusion protein in *E.coli*. *Protein Eng Des Sel.* 2007; 20(5):201-9. <https://doi:10.1093/protein/gzm012>
56. Tai, W., He, L., Zhang, X. et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol* 17, 613–620 (2020).
57. Shang, J., Ye, G., Shi, K. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* 581, 221–224 (2020)
58. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasley D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020; 181(2):281–92.e6.
59. Rabi FA, Al Zoubi MS, Kasasbeh GA, Salameh DM, Al-Nasser AD. SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. *Pathogens.* 2020;9:231.

60. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005;11:875–9. <https://doi.org/10.1038/nm1267>.
61. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. – 479 с
62. Sezonov G., Joseleau-Petit D, D'Ari R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189 8746–8749
63. Cardoso VM, Campani G, Santos MP, Silva GG, Pires MC, Gonçalves VM et al. Cost Analysis Based on Bioreactor Cultivation Conditions: Production of a Soluble Recombinant Protein Using *Escherichia coli* BL21(DE3). *Biotechnol Rep.* 2020; 26(1).
64. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology.* 2014; 5:172.
65. Zheng C, Zhao Z, Li Y, Wang L, Su Z. Effect of IPTG amount on apo- and holo- forms of glycerophosphate oxidase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 2011; 75(2):133–7. <https://doi:10.1016/j.pep.2010.08.009>
66. Гильчук П. В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме / Гильчук П. В. // Биополимеры и клетка. – 2004. – №3. – С. 182–191.
67. Рудаков О.Б. Востров И.А. Спутник хроматографиста. — Воронеж: Водолей, 2004. — 528 с.
68. Виктор Березкин. Что такое хроматография? / Виктор Березкин. – Москва: Наука, 2005. – 80 с.
69. Сычев С. Н. Высокоэффективная жидкостная хроматография на микроколоночных хроматографах серии Миличром / Сычев С. Н., Сычев К. С., Гаврилина В. А.. – Орел: ОрелГТУ, 2002. – 134 с.
70. Ivanska NV, Kyslykh OM, Maksymeniuk OV, Serheieva TA, Raievska He, Pylypenko VH. *Praktychnyi posibnyk z imunofermentnoho analizu*. Pid red. Huralia AL ta Spivaka Mla. Kyiv: NAN Ukrainy; 2005. 63 p. [http://www.diaproph.com.ua/pdf/metodichky/ua/1\\_imunofermt\\_analiz.pdf](http://www.diaproph.com.ua/pdf/metodichky/ua/1_imunofermt_analiz.pdf)
71. Pechurkin YAS. *Analiz kinetiki rosta i evolyucii mikrobnih populyacij (v upravlyaemyh usloviyah)*. 1th ed. Novosibirsk: Nauka, 1975. 216 p.
72. Robinson JA. Approaches and limits to modeling microbiological processes. Meguseu F, Gantar M (eds) *Perspective in microbial ecology*. 4th ed. Ljubljana: Slovene Soc Microbiol: 1986. 29 p.
73. Peleg M, Corradini MG, *Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011; 51(10):917–45.
74. Peleg M. Modeling microbial population with the original and modified version of the continuous and discrete logistic equations. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997; 37(5):471-90.
75. Basnak'yan IA. *Kul'tivirovanie mikroorganizmov s zadannymi svojstvami* M: Medicina, 1992. 192 p.

76. Iberla K Faktornyj analiz. In: Ivanovoj VM, editors. M: Statistika, 1980. 398 p. <https://biometrica.tomsk.ru/contents/iberla0.pdf>
77. Lapach SN, CHubenko AV, Babich PN. Osnovnye principy primeneniya statisticheskikh metodov v klinicheskikh ispytaniyah. K: MORION; 2002. – 160 p.
78. Rochet MJ, Flandrois JP. Bacterial strain characterization using mathematical modelling of growth. Zentralbl Bakteriол. 1989; 271(1):2-10.
79. Підлісна, О. А. Економічна частина магістерської дисертації: розроблення стартап-проекту. Навчальний посібник для студентів спеціальності 151 «Автоматизація та комп'ютерно-інтегровані технології» та спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія». О. А. Підлісна, Ю. В. Тюленєва. КПІ ім. Ігоря Сікорського. — Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. – 32 с.
80. Сервіс для визначення кодів видів економічної діяльності за КВЕД-2005 та КВЕД-2010 [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <http://kved.ukrstat.gov.ua/>.
81. Міжнародна класифікація товарів і послуг для реєстрації знаків (Ніщцька класифікація) [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://nice.uipv.org/>.
82. Класифікатор професій України [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://buhgalter.com.ua/dovidnik/klasifikator-profesiy/klasifikator-profesiy/>