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

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___»_____2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Технологія виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах. Дільниця біосинтезу»

Виконала:
студентка IV курсу, групи БТ-61
Оникієнко Наталія Юріївна _____

Керівник:
ас. каф. промислової біотехнології, к.т.н.
Карпенко Юрій Володимирович _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу:
доц. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н., доц.
Шибецький Владислав Юрійович _____

Рецензент:
доц. каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н., доц.
Щурська Катерина Олександрівна _____

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

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	А4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	А4	ДП 6115. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	118	
3	А1	ДП 6115. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	А1	ДП 6115. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	А1	ДП 6115. 03.000 ТК	Ферментер	1	

				ДП 6115 00.000.00		
	ПІБ	Підп.	Дата			
Розробн.	ОникієнкоН.Ю.			Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Керівн.	Карпенко Ю.В.				1	118
Консульт.	Шибецький В.Ю.				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-61	
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК
«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Оникієнко Наталії Юріївні

1. Тема проєкту: «Технологія виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах. Дільниця біосинтезу», керівник проєкту: Карпенко Юрій Володимирович, к.т.н, затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с.

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: процес, що розробляється - виробництво інсуліну рекомбінантного у картриджах; продуцент людського інсуліну - штам *Escherichia coli* JM 109/pHINS11; апарат для промислового біосинтезу інсуліну - ферментер з механічним перемішуючим пристроєм та барботером об'ємом 0,15 $м^3$; об'єм внесеного посівного матеріалу - 10 л; спосіб культивування - глибинне, періодичне, в асептичних умовах; параметри культивування: температура 36,5 ± 0,5 °С, pH 6,9 ± 0,2, перемішування і аерація (1,5 л/л/хв), індуктор біосинтезу - 1-ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид; кількість клітин з тільцями включень у напівпродукту - 90-95%.

4. Зміст пояснювальної записки: вибрати та охарактеризувати продуцент для виробництва рекомбінантного білка; розглянути біохімічні основи виробництва людського інсуліну та охарактеризувати компонентний склад готового препарату; проаналізувати методи отримання промислових продуцентів, навести схему отримання продуценту, що використовується у проекті; навести опис технологічного процесу, скласти матеріальний баланс, технологічну і апаратурну схеми виробництва; обґрунтувати вибрану конструкцію ферментеру, провести технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки; вибрати загальнозаводське обладнання для технологічного процесу.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): технологічна схема - 1 арк. А1, апаратурна схема - 1 арк. А1, креслення загального виду ферментера з перемішуючим пристроєм та барботером - 1 арк. А1.

6. Консультанти розділів проєкту

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

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	07.04.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	07.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	07.04.20	
4.	Технологічна частина	22.04.20	
5.	Складання апаратурної схеми	24.04.20	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	10.05.20	
7.	Оформлення пояснювальної записки	01.06.19	

Студент Наталія ОНИКІЄНКО

Керівник Юрій КАРПЕНКО

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах. Дільниця біосинтезу»

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект : 118 с., 12 рис., 5 табл., 62 посилання, 3 креслення.

Робота присвячена розробці технології виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах з розрахунком обладнання для дільниці біосинтезу.

Запропоновано в якості продуцента людського рекомбінантного інсуліну використовувати штам бактерії *E. coli* JM109/pHINS11, отриманий із застосуванням комбінації кон'югації, трансдукції, трансформації та використання генної інженерії.

Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту, обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу, тривалість культивування, наведено опис технологічного процесу виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах.

Розраховане та вибране ефективне обладнання для біосинтезу гібридного білка з метою подальшого отримання з нього інсуліну людини. Наведено технологічний, конструктивний та гідравлічний розрахунки ферментера. Вибрано загальнозаводське обладнання, наведені вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.

В роботі обґрунтовані та подані технологічна та апаратурна схеми виробництва.

ESCHERICHIA COLI, ІНСУЛІН, РЕКОМБІНАНТНИЙ ІНСУЛІН ЛЮДИНИ, ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ, БІОСИНТЕЗ ІНСУЛІНУ, ПРОМИСЛОВІ ПРОДУЦЕНТИ ІНСУЛІНУ, ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ІНСУЛІНУ, ІНСУЛІН У КАРТРИДЖАХ, ГІБРИДНИЙ БІЛОК, ОЧИСТКА ІНСУЛІНУ.

ABSTRACT

Diploma project: 118 pp., 12 fig., 5 tab., 62 references, 3 drawings.

The work is dedicated to the development of technology of recombinant insulin production in cartridges with equipment calculations for biosynthesis department.

E. coli strain JM109/pHINS11 has been proposed to use as a host for human recombinant insulin production. The strain can be obtained using a combination of conjugation, transduction, transformation, and genetic engineering.

Taking into account physiological and biochemical features of the producer, composition of the medium for biosynthesis and duration of the cultivation were chosen; the description of the technological process of recombinant insulin production in cartridges was presented.

Effective equipment for biosynthesis of hybrid protein for further human insulin production has been calculated and selected. Technological, constructive, and hydraulic calculations of the bioreactor are provided. The factory equipment was selected, requirements for labor and environment protection were given.

Technological and apparatus schemes of insulin production are substantiated and presented in the work.

ESCHERICHIA COLI, INSULIN, RECOMBINANT HUMAN INSULIN, DIABETES, INSULIN BIOSYNTHESIS, INDUSTRIAL INSULIN PRODUCERS, INSULIN PRODUCTION TECHNOLOGY, INSULIN IN CARTRIDGES, HYBRID PROTEIN, INSULIN PURIFICATION.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....10
ВСТУП.....12
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....14
1.1. Основні промислові продуценти.....14
1.1.1. Експресійна система *E. coli* для виробництва інсуліну.....15
1.1.2. Експресійна система дріжджів для виробництва інсуліну..16
1.1.3. Трансгенні рослини як хазяїн для виробництва інсуліну....17
1.2. Систематичне положення.....17
1.3. Морфолого-цитологічні ознаки.....18
1.4. Культуральні ознаки.....19
1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки.....20
1.5.1. Метаболізм та умови росту продуцента.....20
1.5.2. Хімічний склад клітини та фактори стійкості.....23
1.6. Поширення в природі.....24
Висновки до розділу 1.....25
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....27
2.1. Характеристика кінцевого продукту.....27
2.2. Схема хімічних перетворень.....29
2.2.1. Синтез інсуліну в організмі людини.....29
2.2.2. Синтез рекомбінантного інсуліну.....30
2.3. Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....31
2.4. Методи очистки цільового продукту.....32
2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....34
2.5.1. Фізіологічні ефекти інсуліну.....34

2.5.2. Метаболізм інсуліну та його вплив на метаболізм глюкози.....35
2.5.3. Молекулярний механізм дії інсуліну.....37
Висновки до розділу 2.....38
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....39
3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту.....39
3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту.....39
3.1.2. Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.....40
3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....43
3.2.1. Використання природного та штучного добору.....43
3.2.2. Використання індукованого мутагенезу.....44
3.2.3. Використання гібридизації.....45
3.2.4. Регуляція метаболізму у мікробній клітині.....47
3.2.5. Використання методів генної інженерії.....49
3.2.6. Використання комбінації вищенаведених методів.....50
3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....50
3.3.1. Блок-схема отримання продуцента *E. coli* JM109/pHINS11.....50
3.3.2. Опис отримання продуцента *E. coli* JM109/pHINS11.....52
Висновки до розділу 3.....56
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....57
4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва.....57
4.2. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....58
4.3. Опис технологічного процесу.....65
4.4. Матеріальний баланс.....78
4.5. Контроль виробництва.....81
4.6. Технологічна схема виробництва.....87
Висновки до розділу 4.....87

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....88
5.1. Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....88
5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....92
5.3. Вибір загальнозаводського обладнання.....104
5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....106
5.4.1. Охорона праці.....106
5.4.2. Охорона навколишнього середовища.....109
Висновки до розділу 5.....111
ВИСНОВКИ.....112
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....113

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

Перелік скорочень

CRE - cAMP response element (елемент, що реагує на цАМФ);

CREB - cAMP response element binding (протеїн, що зв'язує CRE);

IEF-1 - інсулін-підсилюючий фактор-1;

IPF-1 - інсулін-промоторний фактор-1;

IU (МО) - International Unit (міжнародна одиниця);

OD - optical density (оптична густина);

PC - прогормонна конвертаза;

USP - United States Pharmacopea (Фармакопея США);

ДР - допоміжні роботи;

ДФУ - Державна Фармакопея України;

ЗВ - знешкодження відходів та викидів;

ЗФ ВЕРХ - зворотно-фазова високоефективна рідинна хроматографія;

Км - контроль мікробіологічний;

КМ-сефароза - карбоксиметил сефароза;

Кт - контроль технологічний;

Кх - контроль хімічний;

ПВ - переробка відходів;

ПМ - посівний матеріал;

ПМВ - пакування та маркування продукту;

ПС - поживне середовище;

СП-сефароза - сульфопропіл сефароза;

ТВ - тільця включення;

ТП - основний технологічний процес;

Перелік умовних позначень

D - висота ферментера;

d_e - еквівалентний діаметр;

$d_м$ - діаметр мішалки;

Fr - критерій Фруда;

g - прискорення вільного падіння;

$H_р$ - висота рівня рідини у ферментері;

К - коефіцієнт теплопередачі;

K_N - коефіцієнт потужності;

L - висота ферментера разом з еліптичними днищем та кришкою;

l - висота циліндричної частини ферментера;

n - частота обертання мішалки;

Pr - критерій Прандтля;

Nu - критерій Нусельта;

Q - продуктивність ферментера;

$\mathrm{Re}_{відц}$ - критерій Рейнольдса відцентровий;

Sh - критерій Шервуда;

$V_н$ - номінальний об'єм ферментера;

$V_р$ - робочий об'єм ферментера;

α - коефіцієнт тепловіддачі;

$\beta_р$ - поверхневий коефіцієнт масопереносу;

$\lambda_{ст}$ - коефіцієнт теплопровідності матеріалу корпусу ферментера;

$\rho_г$ - густина повітря;

$\rho_р$ - густина культуральної рідини;

$\sigma_р$ - коефіцієнт поверхневого натягу культуральної рідини;

$\tau_р$ - час роботи ферментера;

φ - газовміст.

ВСТУП

Інсулін - це гормон білкової природи, що синтезується підшлунковою залозою і відіграє ключову роль у регуляції вуглеводного та жирового обміну в організмі. Нестача інсуліну в крові внаслідок набутих чи спадкових факторів викликає захворювання на цукровий діабет. Це системне захворювання, яке при відсутності лікування призводить до смерті [1].

Для лікування цукрового діабету використовується інсулінотерапія - систематичне введення в організм людини препаратів інсуліну. До початку 1980-х років пацієнтів, хворих на діабет, лікували тваринними інсулінами [2]. Розвиток біотехнології створив можливість використовувати технології рекомбінантних ДНК для розробки препаратів людського інсуліну.

Виробництво рекомбінантного інсуліну потребує відповідного організму-хазяїна з ефективними механізмами експресії. Рекомбінантний людський інсулін на сьогоднішній день продукується переважно з використанням *Escherichia coli* або *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Протягом останніх двох десятиліть створюються аналоги людського інсуліну шляхом зміни структури нативного білка з метою поліпшення терапевтичних властивостей препарату [2].

За статистичними даними 2019 року, 463 млн дорослих (від 20 до 79 років) у світі є хворими на цукровий діабет. Прогнозується зростання числа хворих до 2045 року приблизно до 700 млн. Серед дітей та підлітків більше 1,1 млн осіб є хворими на цукровий діабет першого типу, а 374 млн людей мають підвищений ризик розвитку діабету другого типу. В 2019 році діабет став причиною 4,2 млн смертей у світі [4]. В Україні цукровий діабет займає четверте місце серед хвороб ендокринної системи у дітей та є найчастішою причиною інвалідизації хворих внаслідок розвитку тяжких хронічних ускладнень [5].

Швидке збільшення кількості хворих на діабет у всьому світі та вивчення альтернативних методів введення інсуліну, таких як інгаляція або пероральне введення, які потребують більш високих дозувань, сприятимуть посиленню попиту на рекомбінантний інсулін найближчим часом [3], тому підвищення ефективності технологій виробництва рекомбінантного людського інсуліну та його аналогів набуває все більшої актуальності на сьогоднішній день.

Метою даного дипломного проекту є розроблення технології виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах з розрахунком обладнання для дільниці біосинтезу.

Для досягнення мети проекту поставлено такі завдання:

- Вибір та характеристика продуценту для виробництва рекомбінантного білка, з якого можна виділити інсулін людини.

- Огляд біохімічних основ виробництва людського інсуліну та характеристика компонентного складу готового препарату.

- Аналіз методів отримання промислових продуцентів, наведення схеми отримання продуценту, що використовується у проекті.

- Наведення опису технологічного процесу, складання матеріального балансу, технологічної та апаратурної схем виробництва.

- Обґрунтування вибраної конструкції ферментеру, проведення технологічного, конструктивного та теплового розрахунків; вибір загальнозаводського обладнання для технологічного процесу.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1. Основні промислові продуценти

З початку 1920-х років пацієнтів, хворих на діабет, лікували інсуліном, який виділяли з бичачої або свинячої підшлункової залози. Винайдення Стенлі Коеном та Гербертом Бойєром техніки клонування ДНК сприяло зародженню генної інженерії, що дозволило переносити гени між різними біологічними видами. Їх відкриття призвело до розробки рекомбінантних білків для терапевтичного використання, таких як інсулін та гормон росту.

Гени, що кодують людський інсулін, були вперше клоновані та експресовані в *E. coli* у 1978 році. Першим ліцензованим препаратом, виготовленим за технологією рекомбінантної ДНК, був людський інсулін, розроблений Genentech та введений на ринок компанією Eli Lilly у 1982 році.

В даний час рекомбінантний людський інсулін в основному продукується або *E. coli*, або *S. cerevisiae*. Використовуючи систему експресії *E. coli*, попередники інсуліну (ПІ) утворюються як тільця включення, а повністю функціональні поліпептиди отримуються методами солюбілізації та рефолдингу. Система експресії на основі дріжджів дає змогу отримати розчинний ПІ, який секретується в супернатант культури. Крім *E. coli* та дріжджів, системи експресії рослин також тестуються для подальшого використання у широкомасштабному виробництві рекомбінантного інсуліну.

Різні терапевтичні білки людини, включаючи моноклональні антитіла, виробляються в клітинних лініях ссавців, таких як клітини яєчника китайського хом'яка (CHO). Рекомбінантні білки, експресовані в клітинах ссавців, мають правильний фолдинг і, як правило, дають можливість отримати функціонально активний білок. Однак вартість виробництва біофармацевтичних препаратів, що використовують систему експресії

ссавців, дуже висока через складність підтримки стабільності культури та високу вартість культуральних середовищ [3].

1.1.1. Експресійна система E. coli для виробництва інсуліну

Серед прокаріотів *E. coli* надається перевага при виробництві рекомбінантних білків, через ряд позитивних факторів, включаючи високу швидкість росту, простоту поживного середовища, простоту в обробці, високий вихід та економічну ефективність. Однак є деякі недоліки використання експресійної системи *E. coli*, такі як втрата властивостей плазміди, небажані індуктори для експресії генів, внутрішньоклітинне накопичення синтезованих гетерологічних (не властивих даному організму) білків як тілець включення, що ускладнює очистку, неправильний рефолдинг, відсутність посттрансляційних модифікацій (у тому числі неможливість утворювати дисульфідні зв'язки), опосередковане білком метаболічне навантаження та стрес, забруднення ендотоксином, погана секреція, протеолітичне розщеплення білка [6].

Різні посттрансляційні модифікації, такі як глікозилювання, фосфорилювання та утворення дисульфідних зв'язків, які мають дуже важливе значення для біологічної активності, не притаманні *E. coli* [3]. N-зв'язане глікозилювання є найпоширенішою посттрансляційною модифікацією білків еукаріотів. Було виявлено, що бактерія *Campylobacter jejuni* має здатність глікозилювати білки, і було також показано, що її шлях N-глікозилювання може бути переданий *E. coli* як один з методів вирішення даної проблеми [7].

Використання кодону гетерологічного білка відіграє головну роль у визначенні рівня експресії рекомбінантного білка. Якщо використання кодону гетерологічного білка значно відрізняється від середньостатистичного значення використання кодона *E. coli*, це може призвести до дуже низької експресії. Експресію гетерологічних білків у *E. coli* можна покращити, замінивши кодони, які рідко зустрічаються у високоекспресованих генах *E. coli* більш сприятливими основними кодонами за рахунок використання генетично сконструйованих

комерційних штамів (наприклад, BL21 (DE3) CodonPlus-RIL та ін.). Використання штамів з дефіцитом протеази, які несуть мутації, що виключають утворення протеаз, також може покращити вихід рекомбінантного білка за рахунок зменшення протеолітичної деградації.

У *E. coli* складні та великі терапевтичні білки можуть секретуватися в периплазмі, оскільки вона забезпечує окислювальне середовище та допомагає формувати дисульфідні зв'язки, що полегшує правильний фолдинг білків. Периплазма має переваги перед цитоплазмою у вигляді меншої концентрації білка та протеолітичної активності, покращує титр продукції та підвищує розчинність рекомбінантного білка.

Гетерологічні білки, як правило, накопичуються у *E. coli* як тільця включення, які складаються з нерозчинних неправильно сформованих агрегатів білків [3]. Використання молекулярних шаперонів (GroEL, DnaK та ін.) може збільшити розчинність білка і сприяти правильному фолдингу білка. Частина шаперонів перешкоджає агрегації білка, а частина сприяє рефолдингу та солюбілізації неправильно утворених білків [8].

1.1.2. Експресійна система дріжджів для виробництва інсуліну

Дріжджі є переважним хазяїном для експресії різних гетерологічних білків, які потребують посттрансляційних модифікацій для своєї біологічної активності. Клітина дріжджів має здатність здійснювати численні посттрансляційні модифікації, такі як фосфорилювання, O-зв'язане глікозилювання, N-зв'язане глікозилювання, ацетилювання та ацилювання. Рекомбінантні білки експресуються в розчинній формі в дріжджах і належним чином проходять фолдинг. Виробництво біофармацевтичних препаратів за допомогою системи експресії дріжджів також є економічно вигідним і піддається масштабуванню за допомогою великих біореакторів. Однак однією з головних проблем для отримання терапевтичного глікопротеїну для людського застосування є те, що дріжджове N-глікозилювання має високоманозний тип, який робить

терапевтичний глікопротеїн менш ефективним у людини. Вдосконалюються різні методи гуманізації шляхів N-глікозилювання дріжджів.

Терапевтичні білки виробляються в дріжджах зазвичай з використанням *S. cerevisiae*. Альтернативним продуцентом може слугувати *Pichia pastoris*, що має перевагу у вигляді здатності досягати високої щільності клітин, кращої експресії генів та меншого глікозилювання білків.

1.1.3. Трансгенні рослини як хазяїн для виробництва інсуліну

Трансгенні рослини можливо використовувати для отримання рекомбінантних білків, так як вони мають переваги у вигляді економічної ефективності, високої якості процесингу білків, відсутності людських патогенів, простоти виробництва та наявності еукаріотичної системи для посттрансляційних модифікацій [3].

Прикладом може бути продукування рекомбінантного людського інсуліну в насінні рослини *Arabidopsis thaliana*. За допомогою цієї технології в трансгенних рослинах експресується рекомбінантний людський попередник інсуліну, що накопичується в трансгенному насінні і потім ферментативно обробляється *in vitro* [9].

Враховуючи ряд переваг, таких як вивченість продуценту, широко розповсюджене та довгострокове використання в промисловості, наявність технологічного забезпечення та економічна ефективність, для даного дипломного проекту промисловим продуцентом рекомбінантного інсуліну обрано мікроорганізм *E. coli*.

1.2. Систематичне положення

Згідно з визначником бактерій Берджі, систематичне положення мікроорганізму-продуценту *E. coli* визначається як таке:

Царство - Бактерії.

Категорія - I. Грам-негативні еубактерії, що мають клітинну стінку.

Група - 5. Факультативно анаеробні грам-негативні палички.

Підгрупа - 1. Родина *Enterobacteriaceae*.

Рід - *Escherichia*.

1.3. Морфолого-цитологічні ознаки

Бактерії *E. coli* за формою є прямими паличками [10] розміром 0,3-1х1-6 мкм [11]. Бактерії розташовані поодинично чи в парах, спор не утворюють. Для багатьох штамів характерні капсули чи мікрокапсули. Грам-негативні. Основною запасаючою речовиною є глікоген [12]. Бактерії можуть бути рухомими за рахунок перитрихіальних джгутиків або нерухомими [10].

Джгутики. У *E. coli* як бактерії з перитрихіальними джгутиками виявлені два види рухової поведінки: прямолінійний рух і перекидання, тобто періодичні і випадкові зміни напрямку руху. Якщо бактерія переміщується в сторону оптимальної концентрації збудника, її прямолінійний рух, орієнтований по відношенню до хімічної речовини, стає більш тривалим, а частота перекидань нижчою, що дозволяє їй переміщуватися в потрібному напрямку.

Війки (фімбрії, пілі). У *E. coli* описані війки загального типу і статеві. Війки загального типу надають бактеріям властивість гідрофобності, забезпечують їх прикріплення до клітин рослин, грибів і неорганічних частинок, беруть участь в транспорті метаболітів. Через війки в клітину можуть проникати віруси. Статеві війки, або F-пілі, беруть участь в статевому процесі бактерій. F-пілі необхідні клітині-донору для забезпечення контакту між нею і реципієнтом і в якості кон’югаційного тунелю, по якому відбувається передача ДНК. Війки не можна вважати обов'язковою клітинною структурою, так як і без них бактерії ростуть і розмножуються [11].

Ядерний апарат. Генетична інформація *E. coli* міститься в одній молекулі ДНК, що має форму ковалентно замкненого кільця (бактеріальна хромосома). Згідно з існуючими уявленнями, суперспіралізовані петлі відповідають неактивним в даний час ділянкам ДНК і знаходяться в центрі нуклеоїда. На його

периферії розташовуються деспіралізовані ділянки, на яких відбувається синтез мРНК, при цьому, оскільки у бактерій процеси транскрипції і трансляції йдуть одночасно, одна і та ж молекула мРНК може бути одночасно зв’язана з ДНК і рибосомами (рис. 1.1.).

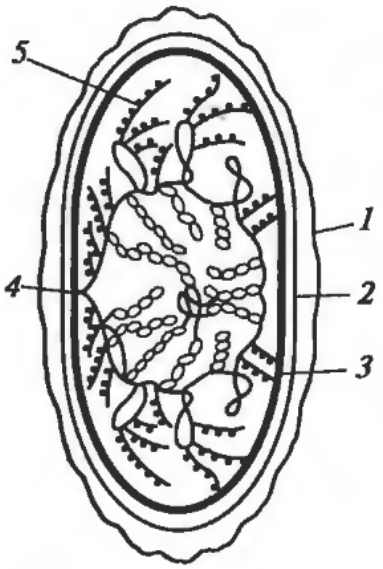

Рис. 1.1. Модель організації нуклеоїда *E. coli*: 1 - зовнішня мембрана клітинної стінки; 2 - пептидоглікановий шар; 3 - ЦПМ; 4 - точка прикріплення бактеріальної хромосоми до ЦПМ; 5 - рибосоми, що зв’язані з мРНК [11].

В цитоплазмі *E. coli* може міститися автономна позахромосомна ДНК у вигляді плазмід, однак вони не є життєво необхідними і можуть бути відсутні [11].

1.4. Культуральні ознаки

E. coli добре росте на звичайних щільних і рідких поживних середовищах. На щільних середовищах *E. coli* утворює опуклі колонії середньої величини, вологі, блискучі, прозорі і непрозорі в прохідному світлі, круглі з рівним краєм (гладкі форми) або більш плоскі, сухі, зі злегка хвилястим краєм (шорсткі форми). Можливе утворення дрібних прозорих колоній, що нагадують колонії шигел і сальмонел, а також слизових великих колоній. У рідких середовищах клітини *E. coli* ростуть дифузно або утворюють осад чи плівку на поверхні, кільце на

стінці пробірки. На селективно-диференціальних середовищах типу Ендо лактозопозитивні штами утворюють колонії, що нагадують колонії інших ентеробактерій, які ферментують лактозу: темно-червоного кольору з металевим блиском або без нього. Культури, які слабо або уповільнено ферментують лактозу утворюють рожеві або слабозафарбовані в колір середовища колонії чи безбарвні з інтенсивно забарвленим центром. *E. coli*, що не ферментують лактозу, утворюють безбарвні колонії на середовищі типу Ендо, колонії з жовтуватим відтінком на середовищі Плоскірєва [13].

1.5. Фізіолого-біохімічні ознаки

1.5.1. Метаболізм та умови росту продуцента

E. coli є хемоорганогетеротрофом - мікроорганізмом, що використовує органічні речовини як джерело вуглецю та енергії.

Мікроорганізми родини *Enterobacteriaceae* об'єднують в одну фізіологічну групу на підставі того, що характерним, хоча і не головним продуктом бродіння у них є мурашина кислота. Поряд з мурашиної кислотою дані бактерії виділяють і інші кислоти, такий тип метаболізму називають мурашинокислим бродінням або бродінням змішаного типу.

Як факультативні аероби, дані мікроорганізми мають гемопротеїни (цитохроми і каталази) і здатні отримувати енергію як в процесі дихання (в аеробних умовах), так і в процесі бродіння (в анаеробних умовах) [12].

Основна кількість цукрів (70%) катаболізується у *E. coli* по гліколітичному шляху. Катаболізм інших цукрів здійснюється в окислювальному пентозофосфатному циклі. Ряд субстратів (глюконова, мананова, гексуронова кислоти) метаболізуються шляхом Ентнера-Дудорова [11].

E. coli невибагливі до поживних середовищ (ПС) - вони ростуть на простих синтетичних середовищах, що містять мінеральні солі, вуглеводи і амоній. *E. coli* добре росте на ПС, що містять глюкозу або лактозу і пептони [12].

Більшість штамів *E. coli* може збродживати також L-арабінозу, D-ксилозу, мальтозу, D-манітол, D-манозу, L-рамнозу і трегалозу [10]. Багатоатомні спирти дані бактерії збродживають варіабельно [13].

Для того, щоб створити умови, при яких ріст інших бактерій зводився б до мінімуму, використовують лактозу, так як на середовищах з лактозою можуть рости тільки ті бактерії, які здатні її розщеплювати за допомогою β-галактозидази. Цей фермент синтезують бактерії групи кишкової палички і молочнокислі бактерії, тоді як багато грунтових і водних бактерій його позбавлені.

Щоб диференціювати *E. coli* від деяких молочнокислих бактерій, які теж мають здатність розщеплювати лактозу з утворенням газу, необхідно культуру висіяти на агар з еозином і метиленовим синім. Колонії *E. coli* будуть темно-синього кольору з металевим відливом, *Enterobacter* утворює рожеві слизові колонії без металевого блиску. Для більш точної диференціації цих двох мікроорганізмів використовують метод, заснований на якісних відмінностях, враховуючи наступні показники: 1) утворення індолу з триптофану; 2) кількість кислоти, яка утворюється з цукру (проба з метиловим червоним, у *E. coli* позитивна); 3) утворення ацетоїна при збродживанні глюкози (реакція Фогес-Проскауера, у *E. coli* позитивна) і 4) ріст на середовищі з цитратом як джерелом вуглецю (реакція у *E. coli* негативна) [12].

Найбільш поширеним ПС для росту та підтримання культури *E. coli* є LB (Luria-Bertani broth). Дане ПС забезпечує можливість швидкого росту культури. До даного ПС входять наступні компоненти: 10 г триптону, 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl і 1 л дистильованої води; регулювання pH до 7,0 відбувається за допомогою 1 N NaOH. Можлива варіація складу ПС LB [14]. Також широко використовується ПС M9 Minimal (мінімальне ПС для культивування та підтримки штамів *E. coli*), Terrific Broth (багате на поживні речовини ПС для більш щільного росту культури) та інші [15].

Особливості бродіння, здійснюваного E. coli. Для цієї бактерії характерні наступні особливості бродіння: 1) розщеплення пірувату з утворенням ацетил-

CoA і форміату; 2) розкладання форміату на CO_2 і молекулярний водень; 3) відновлення ацетил-CoA до етанолу; 4) відсутність здатності утворювати з пірувату ацетоїн і 2,3-бутандиол.

Перетворення пірувату в ацетил-CoA і форміат відбувається тільки в анаеробних умовах; його каталізує піруват: форміат-ліаза. Цей фермент надзвичайно чутливий до кисню, утримується флаводоксином у відновленому стані і для своєї активації потребує S-аденозил-L-метіонін. Мурашину кислоту більшість штамів *E. coli* розщеплюють до CO_2 і молекулярного водню. Етанол, що утворюється ентеробактеріями, є продуктом відновлення ацетил-CoA. Лактат утворюється в результаті відновлення пірувата. Сукцинат є продуктом «фумаратного дихання», при якому відбувається фосфорилювання, поєднане з транспортом електронів.

Ріст та розмноження. E. coli є типовим мезофілом, з нижньою межею росту 10 °C, верхньою - 49 °C; оптимальна температура - 37 °C при рості на багатому середовищі [12].

Для колонізації шлунково-кишкового тракту людини *E. coli* повинна бути здатна рости в межах pH від 4,5 до pH 9. В цьому діапазоні pH *E. coli* зберігає ферментативну активність, а також стабільність білка та нуклеїнової кислоти, підтримуючи цитоплазматичний pH в діапазоні від 7,2 до 7,8 [16].

Для *E. coli* характерне явище диауксії - явище двохфазного росту (дві лаг-фази), яке спостерігається на середовищах, що містять суміш поживних речовин, наприклад, з суміші глюкози і сорбітола *E. coli* поглинає в першу чергу глюкозу. В експоненціальній фазі росту *E. coli* ділиться приблизно кожні 20 хв. Після проходження стаціонарної фази, початок фази відмирання можливий, коли в середовищі накопичуються кислоти [12].

Крім нестатевого розмноження бінарним поділом у *E. coli* спостерігається розмноження за рахунок кон'югації за допомогою F-пілі, як описано вище (1.3).

1.5.2. Хімічний склад клітини та фактори стійкості

Хімічний склад клітини *E. coli* наведено в табл. 1.1.

Таблиця 1.1. Хімічний склад клітини *E. coli*, вирощеної в умовах аерації на синтетичному середовищі з глюкозою при 37 °С; час генерації - 40 хв (за Neidhardt, 1987) [11].

Компонент	*Заг. к-ть, % від сухих речовин клітини*	*Молекулярна маса, Да*	*К-ть молекул в клітині*
1	2	3	4
Білок	55,0	$4{,}7\text{-}10^4$	2 350 000
РНК	20,5		
23S рРНК		$1{,}0\text{-}10^6$	18 700
16S рРНК		$5{,}0\text{-}10^5$	18 700
5S рРНК		$3{,}9\text{-}10^4$	18 700
тРНК		$2{,}5\text{-}10^4$	198 000
мРНК		$1{,}0\text{-}10^6$	1380
ДНК	3,1	$2{,}5\text{-}10^9$	2
Ліпіди	9,1	705	22 000 000
Ліпополісахариди	3,4	4070	1430000
Пептидоглікан	2,5	(904)n	1
Глікоген	2,5	$1{,}0\text{-}10^6$	4 300
Поліаміни	0,4		
путресцин		88	5 600000
спермідин		145	1 100000
Метаболіти, кофактори, іони	3,5		

За морфологічними, ферментативними і культуральними властивостями патогенні і непатогенні різновиди *E. coli* не відрізняються один від одного [14].

Патогенні *E. coli* поділені на п’ять класів: ентеротоксигенні (ETEC), ентероінвазивні (EIEC), ентерогеморагічні (EHEC), ентеропатогенні (EPEC) та ентероагрегативні (EAEC). Кожен клас належить до серологічної підгрупи і виявляє чіткі особливості в патогенезі.

При інфекції *E. coli,* найбільше патогенетичне значення має система захисту бактерій, пов'язана з наявністю у *E. coli* таких факторів: К-антигенів і коліцинів; факторів колонізації, пов'язаних з пілі, детермінованих факторами CFA/I, CFA/II, К88, К99, 987Р; наявністю у *E. coli* власних агресивних речовин - токсинів (стабільний токсин (ST) і лабільний токсин (LT)), гемолізинів; факторів резистентності, зумовлених R-плазмідою.

Фаголізис бактерій може бути використаний для епідеміологічної мітки (епідмаркера) *E. coli*. Існують набори фагів, за допомогою яких проводять фаготипування *E. coli*.

В *E. coli* описано багато груп антигенів, проте для серологічної ідентифікації найбільш важливе значення мають О-, К- і Н-антигени. Специфічний полісахаридний компонент комплексу антигену О варіює за складом моносахаридів і структурою, чим пояснюється велике різноманіття серологічних різновидів *E. coli* по даному антигену. К-антиген об'єднує різні за своїми властивостями поверхневі соматичні або оболонкові і справжні капсульні антигени. Серологічна ідентифікація за антигеном Н (джгутиковий антиген) ускладнена через слабку рухомість виділених штамів [14].

1.6. Поширення в природі

E. coli відноситься до числа умовно патогенних бактерій, тобто є постійним компонентом мікрофлори в нижньому відділі кишечника гомойотермних тварин, але при ослабленні захисних функцій організму може проникати в інші органи і викликати сильні запальні процеси [10, 11]. Дана бактерія може деякий час зберігати життєздатність і поза кишечником людини [12].

E. coli - найчастіша причина гострих інфекцій сечовивідних шляхів, а також сепсису сечовивідних шляхів. *E. coli* викликає менінгіт та сепсис у новонароджених, а також абсцеси в ряді систем органів. Кишкова паличка також може викликати гострий ентерит у людей, а також у тварин, і є загальною причиною дизентерії і геморагічного коліту.

Стійкість кишкової палички у природних умовах опосередковується її здатністю формувати біоплівку. *E. coli* є корисним маркером забруднення фекалій, важливим маркером у гігієні їжі та води [17].

Виявлення *E. coli* є основною метою аналізу питної води. Присутність у питній воді *E. coli* сама по собі не є небезпечною. Однак, в кишечнику може знаходитися ряд патогенних бактерій, разом з *E. coli* ці бактерії виділяються з калом хворих та бацилоносіїв і можуть потрапляти в питну воду. Щоб не застосовувати окремих спеціальних методів для виявлення кожного виду патогенних бактерій, користуються загальним індикатором забруднення, яким служить *E. coli*. Виявлення цього виду в пробі води показує, що вода забруднена кишковими бактеріями, серед яких можуть знаходитися також і патогенні форми [12].

Висновки до розділу 1:

Розглянуті основні промислові продуценти рекомбінантного інсуліну - *E. coli*, дріжджі, клітини ссавців, трансгенні рослини. Детальна вивченість *E. coli*, простота ПС та умов культивування і висока ефективність системи експресії генів роблять даний мікроорганізм одним з найпоширеніших об'єктів для використання у біотехнології. Виходячи з цього, *E. coli* вибрано промисловим продуцентом для даного дипломного проекту.

Охарактеризовано морфолого-цитологічні, культуральні, фізіолого-біохімічні ознаки *E. coli* та поширення даного мікроорганізму в природі. Відзначено, що *E. coli* є грам-негативною паличкою, яка може мати джгутики і пілі, добре росте на простих щільних і рідких середовищах (зокрема LB), є хемоорганогетеротрофом, факультативним аеробом.

З метою опису створення високопродуктивного промислового штаму *E. coli* для виробництва рекомбінантного людського інсуліну, до наступних розділів поставлено такі задачі:

- розглянути біохімічні основи виробництва інсуліну;

- охарактеризувати методи генетичного конструювання *in vivo* та *in vitro*, що використовуються для створення високопродуктивних промислових штамів.

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1. Характеристика кінцевого продукту

Людський інсулін - це гормон білкової природи. Даний гормон продукується β-клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози і відіграє ключову роль у регуляції вуглеводного та жирового обміну в організмі.

Людський інсулін складається з 51 амінокислоти і має молекулярну масу 5808 Да. Даний білок сформований з двох поліпептидних ланцюгів (А і В, що складаються з 21 і 30 амінокислотних залишків відповідно), які з'єднані дисульфідними містками. Ще один дисульфідний зв'язок міститься всередині ланцюга А [3]. Ген людського інсуліну, який складається з трьох екзонів та двох інтронів, знаходиться на хромосомі 11p15.5. У той час як перший екзон не є кодуючою областю, другий екзон кодує сигнальний пептид, ланцюг В і частину сполучного пептиду (С-пептиду). Решта С-пептиду і ланцюга А кодуються в третьому екзоні [18].

Молекулярна формула людського інсуліну:

$C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$

Структурна формула людського інсуліну зображена на рис. 2.1.

Нестача інсуліну в крові внаслідок набутих чи спадкових факторів викликає захворювання на цукровий діабет. Це системне захворювання, яке при відсутності лікування призводить до смерті [1]. Для лікування цукрового діабету використовується інсулінотерапія - введення в організм людини препаратів інсуліну.

На даний час в медичній практиці використовують людські інсуліни трьох типів:

- інсуліни короткої дії - являють собою короткодіючий розчинний при нейтральному значенні pH кристалічний цинк-інсулін, ефект якого розвивається протягом 15 хвилин після підшкірного введення і триває 5-7 годин;

- інсуліни середньої тривалості дії - препарати містять протамін, що являє собою білок, багатий аргініном. Для утворення комплексу потрібно співвідношення протаміну і інсуліну 1:10. Після підшкірного введення протеолітичні ферменти руйнують протамін, дозволяючи інсуліну всмоктуватися;

- інсуліни тривалої дії з повільним проявом ефекту.

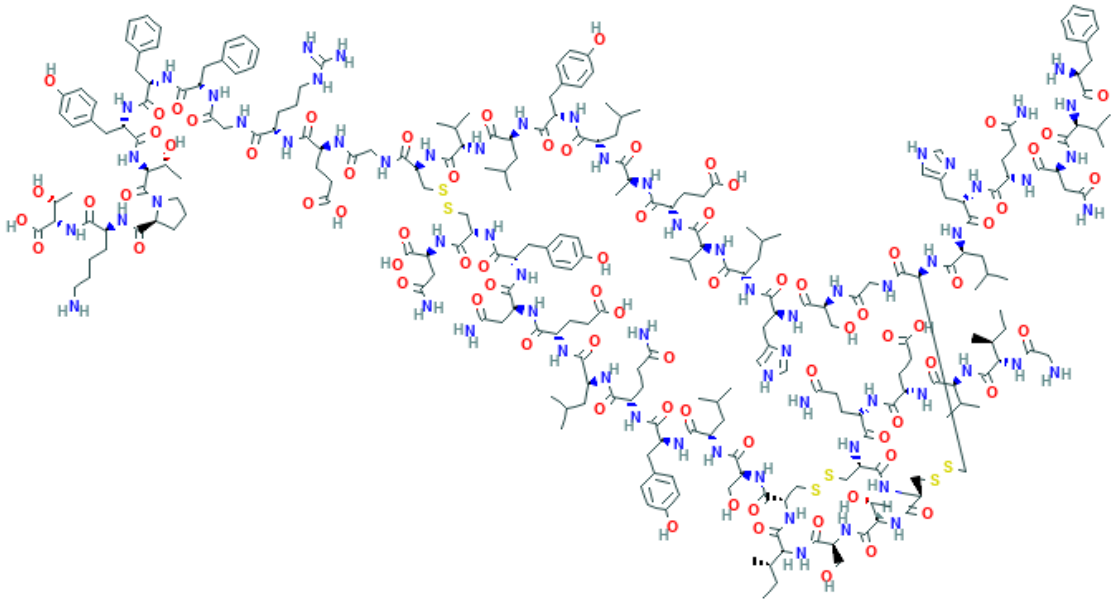

Рисунок 2.1. 2D структура людського інсуліну [19].

Лікування хворих на цукровий діабет I типу включає використання комбінації препаратів інсуліну швидкої (короткої) і тривалої (пролонгованої) дії. Короткодіючий інсулін повинен швидко досягати піку активності відповідно до підйому рівня глюкози, пов'язаного з прийомом їжі, і припиняти свою дію після падіння рівня глюкози. Інсулін пролонгованої дії повинен протягом тривалого часу забезпечувати певний базовий рівень глюкози в проміжках між прийомами їжі [1].

Інсулінотерапія з використанням людського інсуліну має ряд недоліків, які вдалося подолати після отримання його генно-інженерних аналогів зі зміненою

послідовністю амінокислот. Нативний людський інсулін в комерційних препаратах зазвичай існує в олігомерній формі, як цинк-вмісний гексамер через дуже високу концентрацію, але в крові біологічно активний інсулін має бути в мономерній формі. Час, що витрачається на розпад олігомерного комплексу, уповільнює всмоктування інсуліну, тому для розробки швидкодіючого аналога інсуліну модифіковано залишки амінокислот, бічні ланцюги яких беруть участь у формуванні олігомеру. Для уникнення багаторазового введення та покращення стабільності дії базального інсуліну створено також аналоги інсуліну тривалої дії, вивільнення в кров яких відбувається поступово за рахунок поступової ресолюбілізації осадженого в підшкірній клітковині інсуліну [3].

2.2. Схема хімічних перетворень

2.2.1. *Синтез інсуліну в організмі людини*

Синтез інсуліну починається з утворення препроінсуліну - одноланцюгового поліпептиду-попередника - у β-клітинах підшлункової залози. Препроінсулін містить сигнальний пептид із 24-х амінокислотних залишків, який спрямовує поліпептид, що утворюється, до ендоплазматичного ретикулюму (ЕР) [3]. Після переміщення в ЕР, сигнальний пептид розщеплюється для генерування проінсуліну. В ЕР проходить фолдинг проінсуліну (рис. 2.2). На даний момент пептид С все ще присутній, пов’язуючи ланцюги В і А. Специфічне сполучення трьох дисульфідних містків (А6А11, А7В7 та А20В19), необхідних для стабільності та біоактивності інсуліну, відбувається після фолдингу проінсуліну в ЕР. Оскільки проінсулін слабо зв’язується з рецептором інсуліну, його біологічна активність надзвичайно низька (5%). Пептид С видаляється специфічними прогормонними конвертазами (РС1 та РС2) під час його переміщення через апарат Гольджі та потрапляння в незрілі секреторні гранули. Видалення пептиду С необхідне для правильного фолдингу інсуліну та отримання біоактивного гормона. Прогормонна конвертаза 1 (РС1) розщеплює проінсулін між залишками 32 і 33 (арг, арг), тоді як місце розщеплення для прогормонної конвертази 2 (РС2)

знаходиться між залишками 65 і 66 (ліз, арг). Потім С-термінальні залишки арг-арг В-ланцюга вилучаються карбоксипептидазою Е. Новостворений таким чином інсулін зв'язується з Zn^{2+} і утворює гексамери в межах спеціалізованих секреторних гранул. Zn^{2+} забезпечує захист інсуліну від денатурації та неправильного фолдингу, стабілізуючи молекулярну структуру. Гексамери дисоціюють на біологічно активні мономери після секреції у ворітну вену [18].

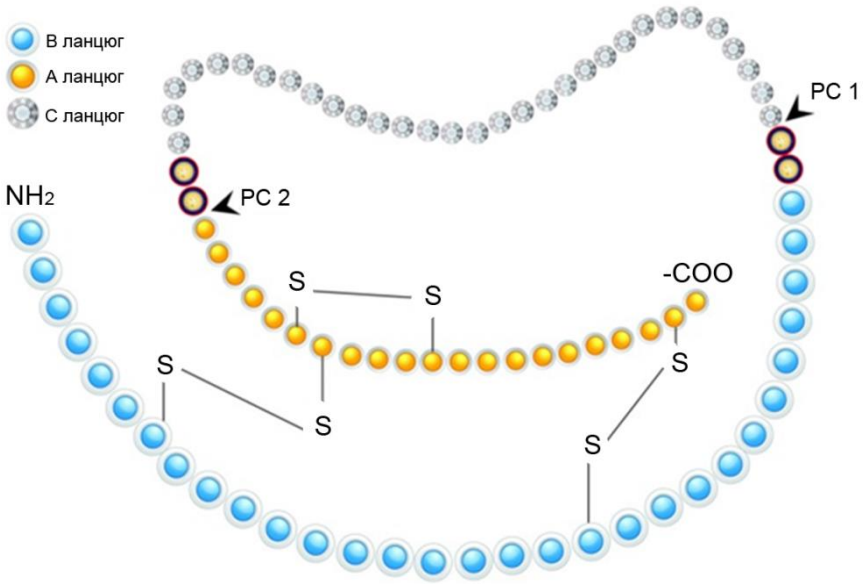

Рисунок 2.2. Схематичне зображення проінсуліну людини. На рисунку показані місця розщеплення прогормонними конвертазами PC 1 та PC 2 [18].

Синтезований з проінсуліну інсулін може існувати в кількох формах, що розрізняються за біологічними, імунологічними та фізико-хімічними властивостями. Розрізняють дві форми інсуліну: 1) вільну, що вступає у взаємодію з антитілами, отриманими до кристалічного інсуліну, і стимулюючу засвоєння глюкози м'язовою та жировою тканинами; 2) зв'язану, що не реагує з антитілами і активну тільки щодо жирової тканини [20].

2.2.2. *Синтез рекомбінантного інсуліну*

Існує два методи отримання рекомбінантного інсуліну за домомогою

генетично змінених мікроорганізмів:

- *дволанцюговий метод*;

- *проінсуліновий метод*.

Дволанцюговий метод є історично першим. Рекомбінантний людський інсулін був вперше вироблений в *E. coli* за допомогою цього методу, при якому ланцюги інсуліну А і В кодуються окремо. Після експресії незалежно обидва ланцюги очищаються та спільно інкубуються в оптимальних реакційних умовах, які сприяють утворенню біологічно активного інсуліну шляхом виникнення дисульфідного зв'язку.

Проінсуліновий метод передбачає синтез людського проінсуліну в *E. coli* в складі гібридного білка. Цей підхід є більш ефективним та зручним для широкомасштабного виробництва та є більш використовуваним на даний момент [3]. З отриманого біосинтетичним шляхом проміжного продукту реконструюють інсулін людини (ензиматичними шляхом) за наступною схемою, що є схожою на процес біосинтезу інсуліну в острівцях Лангерганса:

- культивування штаму з вбудованим геном гібридного білка, що включає повну послідовність інсуліну людини;

- очищення і ренатурація гібридного білка;

- протеолітичне розщеплення гібридного білка з отриманням інсуліну;

- очищення інсуліну.

В промисловості для розщеплення гібридного білка використовують ферменти трипсин і карбоксипептидазу В. Гідроліз проводять шляхом обробки ферментами послідовно або одночасно [1].

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

Компонентний склад рекомбінантного людського інсуліну повинен відповідати існуючим нормативним документам. Згідно з Європейською

фармакопеєю та фармакопеєю США, які є Міжнародними фармакопеями, можна визначити наступний склад даного препарату.

Компонентний склад: не менше 95,0 % людського інсуліну $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ та А21-дезамідолюдський інсулін.

Ефективність людського інсуліну, розрахована на суху речовину, повинна становити не менше 27,5 USP одиниць людського інсуліну у кожному мг (за домовленістю, для маркування препаратів інсуліну, одна USP (IU/міжнародна одиниця) одиниця людського інсуліну еквівалентна 0,0347 мг чистого людського інсуліну).

Вміст інших білків клітини-хазяїна людського інсуліну не має перевищувати 10 мг/л (ppm).

Загальна кількість бактерій не має перевищувати 300 КУО/г.

Препарат має містити не більше 10 USP (IU) одиниць *ендотоксину* у кожному мг, якщо препарат призначений для використання у виробництві парентеральних лікарських форм без подальшої процедури для видалення бактеріальних ендотоксинів.

Втрати при висушуванні мають становити не більше 10,0 % від маси.

Вміст А-21 дезамідоінсуліну та інших сполук, пов'язаних з інсуліном, не має перевищувати 2,0 % у кожній загальній кількості інсуліну та супутніх сполук.

Встановлене *обмеження білків з високою молекулярною масою* - не більше 1,0 %.

Вміст цинку має становити не більше 1,0 % від сухих речовин [21, 22].

2.4. Методи очистки цільового продукту

Для очищення рекомбінантного людського інсуліну використовують різні види хроматографічної очистки: афінні, іонообмінні, гельфільтраційні і ВЕРХ (високоефективна рідинна хроматографія), що дозволяє отримати інсулін з високим ступенем чистоти [1].

Афінна хроматографія. Дана хроматографія базується на високоспецифічних біологічних взаємодіях між двома молекулами, такими як взаємодія між ферментом і субстратом, рецептором і лігандом, або антитілом і антигеном. Ці взаємодії, які, як правило, оборотні, використовуються для очищення шляхом розміщення однієї з взаємодіючих молекул, що називається афінним лігандом, на твердій матриці для створення нерухомої фази, при чому цільова молекула знаходиться в рухомій фазі. Успішна очистка вимагає розуміння природи взаємодій між цільовою молекулою та лігандом. Афінна хроматографія може забезпечити значну економію часу та високий ступінь очищення [23].

Використання афінної хроматографії значно знижує в препараті людського інсуліну вміст баластних білків з молекулярною масою більшою, ніж у інсуліну. До цих білків відноситься проінсулін і частково розщеплені проінсуліни, які здатні індукувати утворення антиінсулінових антитіл [1].

Іонообмінна хроматографія. В основі іонообмінної хроматографії лежить динамічний обмін іонів в рідкій фазі на іони, зв'язані з нерухомою фазою (іонообмінником/іонітом). Розділення суміші іонів в елюенті ґрунтується на різній здатності цих іонів до обміну з іонами іоніту.

Дана хроматографія має переваги у вигляді великої ємності та роздільної здатності, легких умов розділення, універсальності застосування [24].

ВЕРХ. Високоефективна рідинна хроматографія, при застосуванні якої рідку фазу подають під тиском, може використовуватися в якості препаративного або аналітичного методу. Препаративний метод призначений для очищення унікальної хімічної сполуки від суміші сполук. У цьому випадку маса матеріалу, завантаженого в хроматографічну колонку, більша, ніж маса, завантажена в аналітичному варіанті. Коли елюент виходить з колонки, хроматографічні фракції збирають у пробірки. Різні речовини в суміші можуть бути розділені на окремі фракції і тим самим очищені. При аналітичному методі елюент не збирається. У цьому випадку рідина контролюється детектором, який вбудований в пристрій ВЕРХ, або направляється в інший пристрій, наприклад, мас-спектрометр. Метою

аналітичної ВЕРХ є характеристика структурних та фізичних властивостей хімічних сполук.

ВЕРХ може бути нормально-фазовою або зворотно-фазовою. У нормально-фазовій ВЕРХ хімічні структури, зв'язані з твердим носієм у колонці, є більш полярними, ніж розчинник. У зворотно-фазовій ВЕРХ розчинник є більш полярним, ніж хімічні структури, зв'язані з твердим носієм [25].

Зворотно-фазовій ВЕРХ надається перевага у великомасштабному виробництві інсуліну, оскільки метод позбавлений ряду недоліків, властивих іншим видам хроматографії (наприклад, в іонно-обмінній хроматографії більша тривалість очищення за рахунок низьких значень тиску; висока собівартість методу за рахунок низької ємності сорбентів і їх високої вартості) [1].

Гель-фільтрація. Гель-фільтраційна хроматографія - це метод, який дозволяє розділяти молекули відповідно до їх розміру та форми. Неіонні полімери вибірково втримують ті молекули суміші, які здатні проникати в пори гелю.

Даний вид хроматографії використовується для очистки інсуліну від високо- і низькомолекулярних домішок [1].

2.5. Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

2.5.1. Фізіологічні ефекти інсуліну

Досліджено, що людський інсулін може мати такі фізіологічні ефекти:

- посилення транспорту глюкози через мембрану;
- вплив на утилізацію глюкози (посилення гліколізу);
- вплив на утворення глюкози (тривалий вплив інсуліну на вміст глюкози в плазмі крові пов'язаний з пригніченням глюконеогенезу);
- вплив на метаболізм глюкози (зниження вмісту глюкози в крові);
- вплив на метаболізм ліпідів (стимуляція ліпогенеза);
- вплив на метаболізм білків (має анаболічну дію на білковий обмін, оскільки стимулює синтез білків і зменшує їх розпад);

- вплив на розмноження клітин (стимулює проліферацію ряду клітин в культурі) [26].

2.5.2. Метаболізм інсуліну та його вплив на метаболізм глюкози

Інсулін не має білка-переносника в плазмі крові, тому в нормі період його напіввиведення не більший 3-5 хв. Метаболічні перетворення інсуліну відбуваються в основному в печінці, нирках і плаценті. Близько 50% цього гормону зникає з плазми за один пасаж через печінку. В метаболізмі інсуліну беруть участь дві ферментні системи. Перша являє собою інсулін-специфічну протеїназу, що виявляється в багатьох тканинах, але в найбільшій концентрації знаходиться в печінці, нирках і плаценті. Встановлено, що її активність залежить від сульфгідрильних груп і проявляється при фізіологічних значеннях pH. Друга система - глутатіон-інсулін-трансгідрогеназа. Цей фермент відновлює дисульфідні містки, після чого відокремлені один від одного А- і В-ланцюги швидко розщеплюються [26].

Певний рівень інсуліну необхідний для підтримки еуглікемії не тільки після їжі, але і для базового обміну між прийомами їжі. Вивільнення 0,5-1,0 одиниці інсуліну на годину достатньо для підтримки основного метаболізму та обмеження вироблення печінкової глюкози між прийомами їжі. У здорових людей базальний інсулін постійно вивільняється на низьких рівнях у відповідь на викид глюкози в печінці, він постійно присутній в організмі протягом дня, незалежно від прийомів їжі. Прандіальний (болюсний) інсулін періодично секретується у відповідь на підвищений рівень глюкози після їжі, він відноситься до додаткових кількостей інсуліну, які підшлункова залоза природно виробила б у відповідь на глюкозу, що поглинається з їжею. Кількість синтезованого болюсного інсуліну залежить від розміру та вмісту їжі. Таким чином, щоразу, коли концентрація глюкози в крові підвищується вище 100 мг/дл (5,6 ммоль/л), інсулін вивільняється з β-клітин підшлункової залози. У здорових людей ендогенна секреція інсуліну зазвичай досягає максимуму протягом години після їжі (постпрандіальна глікемія). Потім

рівень інсуліну та глюкози повертається до базового рівня протягом двох годин. Індукція секреції інсуліну глюкозою є двофазною. Перша фаза секреції інсуліну, яка проходить у людини протягом 5 хв після стимуляції, в першу чергу є результатом вивільнення інсуліновмісних везикул, що містяться в цитоплазмі. Ця перша фаза відповідає за пригнічення викиду глюкози в печінці та індукцію вивільнення інсуліну другої фази - новосинтезованого інсуліну. Друга фаза (платофаза), навпаки, вимагає подальшого процесингу новосинтезованого інсуліну. Друга фаза триває від 1 до 2 годин до встановлення нормоглікемії. У пацієнтів з діабетом другого типу спостерігається дефект постпрандіального вивільнення інсуліну, у пацієнтів з діабетом першого типу - повна відсутність інсуліну.

Молекулярний механізм секреції інсуліну зображено на рис. 2.3.

Коли глюкоза потрапляє в β-клітини підшлункової залози через глюкозний транспортер-2 (GLUT-2), вона фосфорилюється до глюкозо-6-фосфату глюкокіназою. Фосфорильована глюкоза надходить у гліколітичний шлях, а електрони транспортуються через електрон-транспортний ланцюг в мітохондріях, в результаті чого утворюється АТФ.

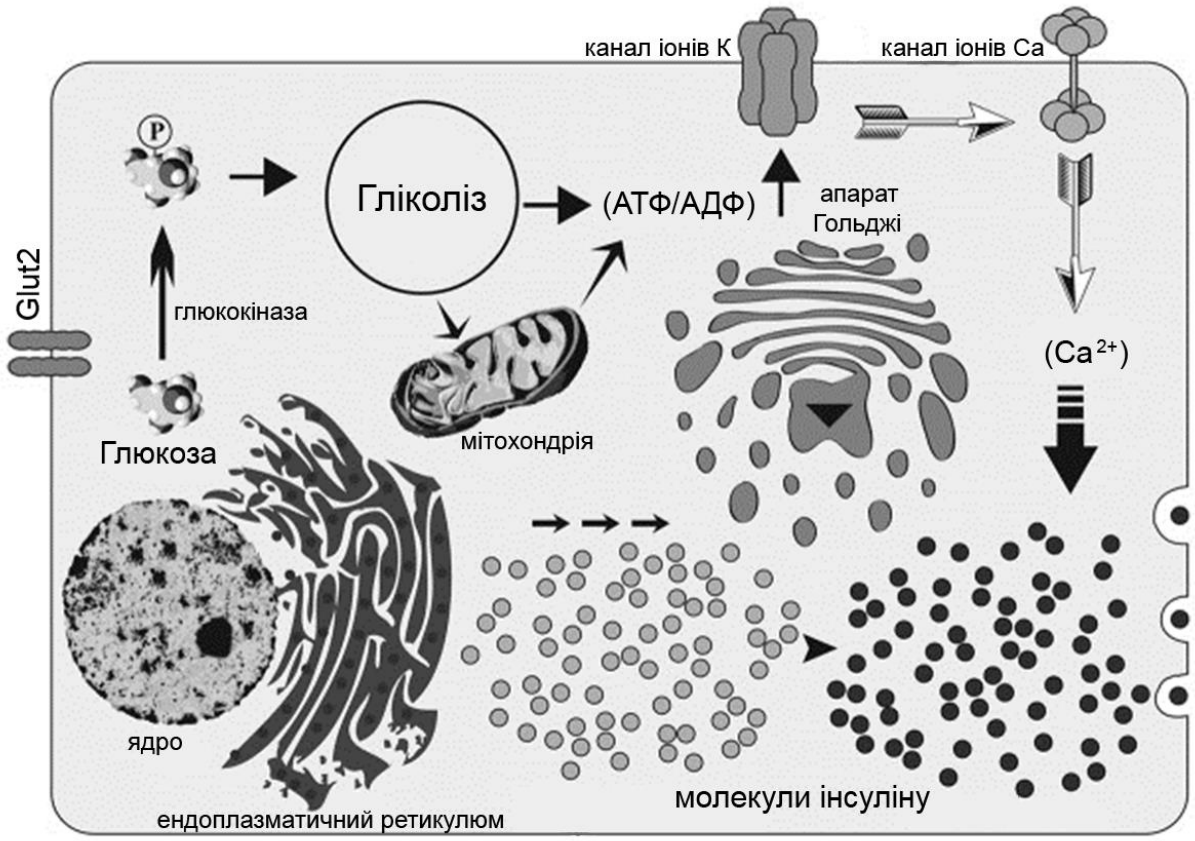

Рисунок 2.3. Механізм секреції інсуліну, індукований глюкозою [18].

Підвищене співвідношення АТФ/АДФ та закриття чутливих до АТФ каналів іонів К призводять до мембранної деполяризації. Зміна мембранного потенціалу відкриває канали іонів Са, викликаючи приплив Са2+ у β-клітини підшлункової залози. Підвищена концентрація Ca^{2+} цитозолю сприяє злиттю інсуліновмісних везикул з плазматичною мембраною, що забезпечує вивільнення інсуліну [18].

2.5.3. Молекулярний механізм дії інсуліну

Інсулін ініціює свою дію шляхом зв'язування з глікопротеїновим рецептором на поверхні клітини. Цей рецептор складається з α-субодиниці, яка зв'язує гормон, і β-субодиниці, яка є стимульованою інсуліном тирозин-специфічною протеїнкіназою. Вважається, що активація цієї кінази створює сигнал, який призводить до дії інсуліну на обмін глюкози, ліпідів та білків. Ефекти стимулювання росту інсуліном виникають завдяки активації рецепторів

для сімейства інсулін-подібних факторів росту. У патологічних станах, що призводять до стійкості тканин до дії інсуліну, виникають як генетичні, так і набуті аномалії в кількості інсулінових рецепторів, активності кінази та різних пострецепторних стадіях дії інсуліну [27].

Висновки до розділу 2:

В розділі 2 охарактеризовано інсулін людини, наведено опис його біосинтезу, механізм впливу на біохімічні процеси. Було описано визначальну роль даного гормону білкової природи в регуляції вуглеводного та жирового обміну в організмі та роль нестачі інсуліну у виникненні цукрового діабету. Було наведено класифікацію препаратів інсуліну за тривалістю дії, а також описано компонентний склад препаратів, що відповідає існуючим нормативним документам. Було описано методи очистки цільового продукту та зроблено висновок про найбільшу ефективність хроматографічних методів очистки інсуліну, зокрема використання ВЕРХ.

З метою опису технології виробництва рекомбінантного людського інсуліну з використанням *E. coli* як промислового продуцента, необхідно:

- охарактеризувати методи генетичного конструювання *in vivo* та *in vitro*, що використовуються для створення високопродуктивних промислових штамів;

- врахувати біохімічні властивості людського інсуліну при розробці технологічної частини проекту, так як вони є вирішальними для вибору умов отримання та очистки цільового продукту.

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1. Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1. Наявність генетичних карт продуценту

Штам *E. coli* JM109/pHINS11, який вибрано продуцентом в даному проекті, походить від штаму *E. coli* K-12.

Геном *E. coli* складається з 4639211 п.н. кільцевої дволанцюгової ДНК. На рис 3.1. зображено генетичну карту хромосоми *E. coli* K-12 [28].

На рисунку показані шкали пар нуклеотидів та хвилини; перша пара нуклеотидів позначена у некодуючій області між генами lasT та thrL. На гени, що кодують білки, припадає 87,8% генома; 0,8% кодують стабільні РНК; 0,7% складаються з некодуючих повторів; 11% - регуляторні гени.

Початок та кінець реплікації показані у вигляді блакитних ліній зі стрілками, що позначають реплікони 1 та 2. Розподіл генів зображено на двох зовнішніх кільцях: помаранчеві прямокутники - це гени, розташовані на представленому ланцюгу, а жовті - гени на протилежному ланцюгу. Червоні стрілки показують розташування та напрямок транскрипції генів рРНК, а гени тРНК показані зеленими стрілками. Наступне коло ілюструє положення REP-послідовностей (повторювані екстрагенні паліндроми) навколо геному як радіальні позначки. Центральний оранжевий круг - це гістограма зворотного CAI (Codon Adaptation Index - техніка, що використовується для аналізу відмінностей у частоті виникнення синонімічних кодонів у кодуючій ДНК) (1 - CAI), в якій довгі жовті промені представляють скупчення низьких (<0,25) CAI. Точки початку та кінця реплікації ділять геном на половини - реплікони.

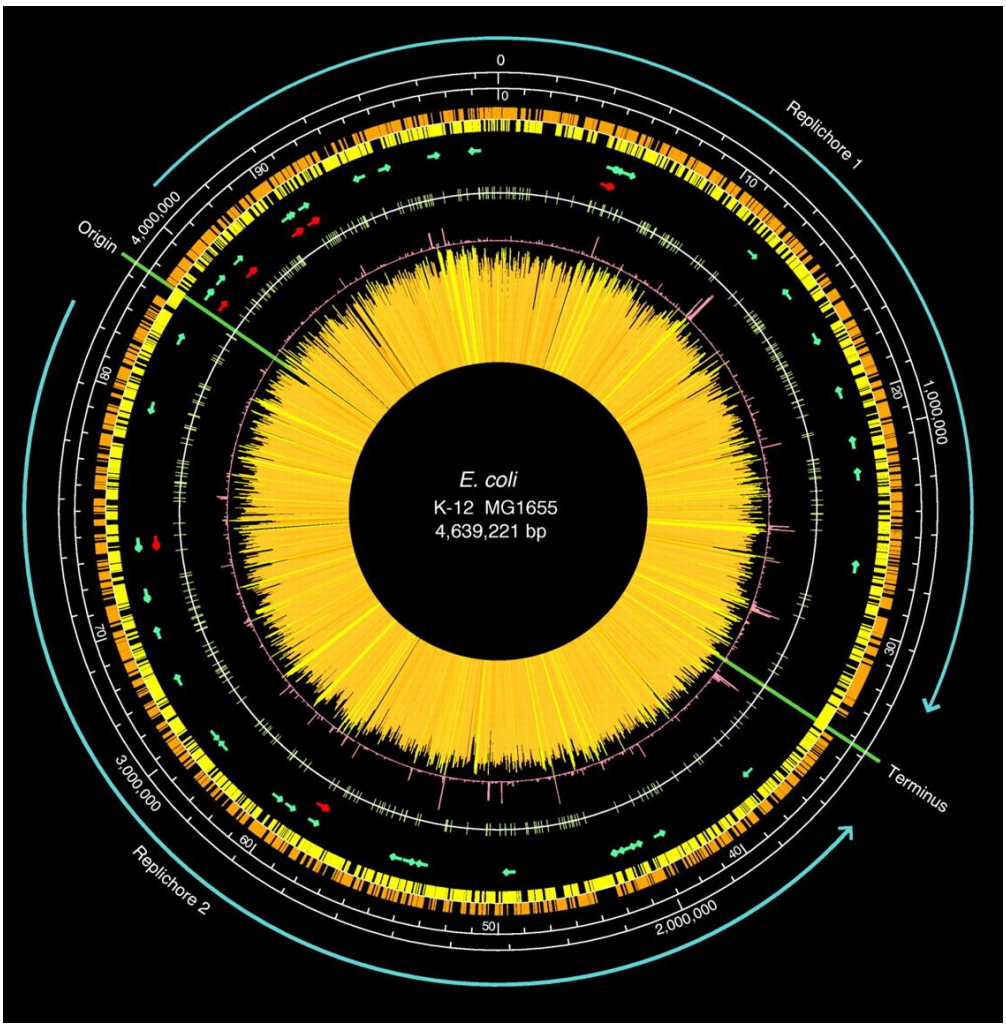

Рисунок 3.1. Генетична карта хромосоми *E. coli K-12* [28].

У реплікона 1, який реплікується за годинниковою стрілкою, представлений ланцюг є провідним; у реплікона 2 комплементарний ланцюг є провідним. Багато особливостей *E. coli* пов'язані з напрямком реплікації. Всі сім оперонів рРНК та 53 з 86 генів тРНК експресуються у напрямку реплікації [28].

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

Ген людського інсуліну INS (рис. 3.2.) містить 3 екзони. Перший екзон не кодує даний гормон, екзон 2 кодує сигнальний пептид, ланцюг В та частину С-пептиду, екзон 3 кодує залишок С-пептиду та ланцюг А.

Ідентифіковано також два транскрипти, названі INSIGF, довга і коротка ізоформи, що містять екзони як гена INS, так і гена IGF2 (ген інсулін-подібного фактору росту).

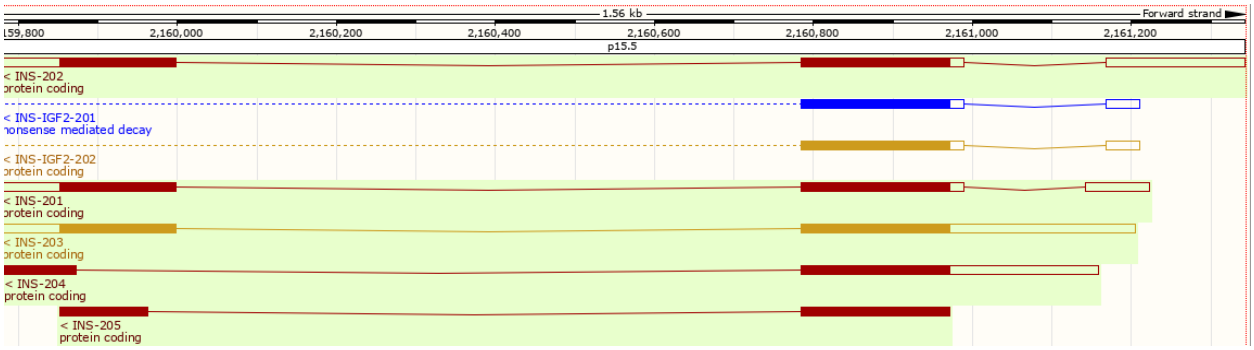

Рисунок 3.2. Будова гену інсуліну. Прямокутниками позначено екзони, лініями - інтрони. Жовті (Ensembl/Havana) та червоні (Ensembl) ділянки кодують білок, сині - не є кодуючими. Даний набір генів характерний для людини та миші [29].

Експресія інсуліну обмежена β-клітинами острівців Лангерганса у дорослих. Інсулін-промоторний фактор IPF-1 експресується у всій підшлунковій залозі в ранньому ембріогенезі, але пізніше його експресія обмежується клітинами β- та δ-острівців, де він діє як активатор транскрипції генів інсуліну та соматостатину відповідно.

Специфічна для β-клітин експресія гену інсуліну опосередкована взаємодію мотивів 5'-кінцевої послідовності промотору з низкою специфічних факторів транскрипції [30]. Цис-активні елементи контролю та транс-активні фактори визначають рівень регуляції генів. До них відносяться: елемент зв'язування у відповідь на цАМФ (CREB - cAMP response element binding), A-ділянки, що взаємодіють з білками гомеодомену (домен білків, що зв’язує ДНК, широко поширений серед факторів транскрипції), E-ділянки, які зв'язують білки bHLH (basic helix-loop-helix - основна структура спіраль-петля-спіраль,

яка міститься у багатьох білків, що належать до факторів транскрипції), та інші елементи (рис. 3.2.).

Одним з основних факторів транскрипції гена інсуліну є гетеродимерний комплекс IEF-1 (інсулін-підсилюючий фактор-1), який належить до сімейства факторів транскрипції bHLH. На першому етапі IEF-1 зв'язується з обома Е-ділянками гена інсуліну і транс-активує його промотор. В другому етапі бере участь білок IPF-1 (який належить до сімейства, що містить гомеодомени), він взаємодіє з обома А-ділянками міні-енхансера інсуліну. Два інші фактори транскрипції cdx-2/3 та lmx-1, також здатні зв'язувати та транс-активувати міні-енхансер [31].

Глюкоза модулює транскрипцію гена інсуліну, при цьому багато елементів промотору беруть участь у реакції на глюкозу. IPF-1 та IEF-1 беруть участь як у експресії генів β-клітин, так і в регулюванні глюкозою гена інсуліну. цАМФ також регулює транскрипцію генів інсуліну через CRE-елемент гену у відповідь на різні гормональні подразники [30].

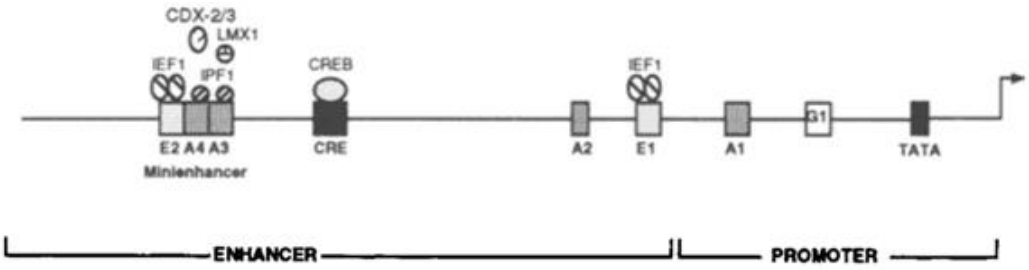

Рисунок 3.3. Цис-активні елементи ДНК і транс-активні фактори, що впливають на регуляцію транскрипції генів інсуліну. На рисунку зображені: IEF-1(фактор підсилення інсуліну-1), IPF-1(інсулін-промоторний фактор-1); фактори транскрипції cdx-2/3 та lmx-1, CRE (елемент, що реагує на цАМФ), CREB (протеїн, що зв'язує CRE) [31].

Гормон глюкагон здатен репресувати транскрипційну експресію гена інсуліну. Він секретується α-клітинами підшлункової залози під час голодування і є необхідним для підтримки рівня глюкози в крові за рахунок

стимуляції печінкового викиду глюкози. Надмірне вироблення та секреція глюкагону зазвичай супроводжує діабет. Отримана в результаті гіперглюкагонемія стимулює вироблення печінкової глюкози, тим самим сприяючи гіперглікемії. Вважається, що знижена секреція інсуліну при діабеті і, як наслідок, неспроможність подавити секрецію глюкагону викликають гіперсекрецію глюкагону. Показано, що глюкагон специфічно індукує експресію раннього репресора цАМФ (ICER - inducible cAMP early repressor) в β-клітинах підшлункової залози, в результаті чого відбувається репресія транскрипційної експресії гена інсуліну [32].

3.2. Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1. Використання природного та штучного добору

Застосування природного добору для створення високопродуктивного промислового штаму *E. coli* має великий недолік - довготривалість процесу, так як спонтанні мутації виникають з низькою частотою. Наприклад, щоб виявити колонію Lac^- (нездатність збродживати лактозу) серед колоній культури *E. coli* дикого типу (Lac^+ - здатність збродживати лактозу), необхідно перевірити 100 000 клонів [33]. При застосуванні штучного добору завдання спрощується - можна висіяти велику кількість клітин на середовище, де ріст вихідного штаму неможливий. Штучний добір проводять без застосування мутагенних факторів (якщо культура генетично різнорідна) або із застосуванням мутагенних факторів (якщо культура генетично однорідна). Таким чином можливо отримувати мутанти *E. coli*, що засвоюють нові субстрати, стійкі до фагів, антибіотиків та інших інгібіторів метаболізму, а також до фізичних агентів (температури, pH та ін.).

3.2.2. Використання індукованого мутагенезу

E. coli є одним з найпоширеніших мікроорганізмів для створення високопродуктивних промислових штамів з використанням індукованого мутагенезу. Це пояснюється простими для реалізації умовами культивування та нескладними ПС для даного організму та його вивченістю. Завдяки дії мутагенних чинників у *E. coli* може з'явитися здатність до надсинтезу певної речовини, або здатність до синтезу речовини, якої даний організм не синтезував раніше, внаслідок змін в метаболізмі клітини.

Отримання мутантів *E. coli* можливе шляхом обробки мутагенами вегетативних клітин, так як спор даний організм не утворює. Вибір мутагена (фізичні, хімічні, білогічні) залежить від мутацій, які необхідно отримати (делеція, заміна, зсув рамки зчитування) для продукування конкретної речовини, вибір дози залежить від виживаності (0,1-1% - оптимальний коефіцієнт виживаності). Надсинтез вже властивої *E. coli* чи синтез нової речовини виникає через зміни в метаболізмі клітини під дією мутагенних чинників (підвищення швидкості поглинання та утилізації субстрату клітиною, блокування побічних реакцій синтезу, блокування деградації продукту, блокування подальшого внутрішньоклітинного перетворення продукту, підвищення рівня синтезу ферментів або їх активності за рахунок порушення негативної регуляції, підсилення позитивних форм регуляції синтезу, забезпечення ефективної екскреції продукту).

Відбір продуктивних мутантів є ступінчастим - оброблену мутагеном культуру висівають на тверді поживні середовища, щоб отримати окремі колонії. Кожен клон перевіряють на продуктивність. Виділивши більш продуктивний варіант, процедуру мутагенезу і відбору повторюють. Основними недоліками ступінчастого відбору є трудоємність та накопичення шкідливих мутацій.

Індукований мутагенез відіграє важливу роль в отриманні промислових продуцентів антибіотиків, ферментів, а також в створенні бібліотек мутацій

E. coli, що можуть бути використані для отримання промислових продуцентів у майбутньому [33, 34].

3.2.3. Використання гібридизації

Використання методів гібридизації необхідне при створенні промислових штамів для об'єднання різних ознак штамів або отримання гібрида з більш високим вираженням корисної ознаки, ніж у обох батьківських форм. У *E. coli*, як і у всіх прокаріотів, до рекомбінації генетичного матеріалу ведуть кон'югація, трансформація, трансдукція та злиття протопластів.

В технології, яка описана в даному проекті, в процесі створення високопродуктивного промислового штаму *E. coli* JM109/pHINS11 для отримання рекомбінантного людського інсуліну проінсуліновим методом використовуються кон'югація, трансформація та трансдукція.

Кон'югація. У *E. coli* К-12 перенесення хромосомних генів було виявлено історично першим і є пов'язаним з F-фактором. Процес включення F-фактора в хромосому *E. coli* залежить від продукту гена recA і здійснюється в результаті реципрокної рекомбінації по ділянках гомології між плазмідою і хромосомою, які утворені IS2, IS3 і гамма-дельта (Tn 1000) послідовностями. При цьому утворюються донорні клітини типу *Hfr* (High frequency of recombination), здатні з високою частотою передавати хромосомні гени в F^--клітини реципієнта.

При конструюванні промислових штамів кон'югація застосовується для мобілізації некон'югативних плазмід, створення гібридних плазмід, об'єднання різних плазмід в одній клітині [33].

У технології, яка описана в даному проекті, кон'югація між штамами JM101 та SK1592, JM106 та JM101, JM108 та JM101 (похідними *E. coli* К-12) необхідна для отримання штаму *E. coli* JM109, який потім буде трансформовано рекомбінантною плазмідою pHINS11, що забезпечить синтез гібридного білка для подальшого отримання з нього інсуліну.

Трансформація. Використання трансформації (хромосомної та плазмідної) є одним з найпоширеніших методів, що застосовуються для конструювання штамів. Трансформовані екзогенною ДНК можуть бути тільки компетентні клітини.

У *E. coli* відсутня природна компетентність для трансформації. Найбільш поширеним для індукції компетентності у *E. coli* є хімічний метод з використанням іонів кальцію: клітини витримують в присутності 50 мМ Ca^{2+} при 0 °С з подальшим короткочасним тепловим впливом при 37 або 42 °С. У цих умовах виникає загальний стан компетентності і з'являється можливість здійснення трансфекції, хромосомної та плазмідної трансформації. Ефективність трансформації підвищується при спільній дії іонів Ca^{2+} і Mg^{2+}, Ca^{2+} і Mn^{+}, Ca^{2+} і Rb^{+}, а також при додаванні диметилсульфоксида [33].

У технології, яка описана в даному проекті, трансформація *E. coli* JM109 рекомбінантною плазмідою pHINS11 з вбудованим геном проінсуліну людини необхідна для забезпечення синтезу гібридного білка для подальшого отримання з нього інсуліну.

Трансдукція. Фаги є важливим інструментом для конструювання штамів продуцентів за допомогою трансдукції та методів генетичної інженерії. Майже кожен вид бактерій є хазяїном одного або декількох вірулентних або помірних фагів. Прикладом вірулентного (завжди спричиняє лізис заражених ним бактерій) фага *E. coli* є фаг Т4. Прикладом помірного (знаходиться у вигляді профага або інтегрований в хромосому) фага *E. coli* може бути фаг λ або P1 [33].

У технології, яка описана в даному проекті, в процесі створення промислового продуцента інсуліну *E. coli* JM109/pHINS11 для трансдукції штаму JM105 було використано фаг P1Cm1 clr 100, для трансдукції штаму JM106 - фаг P1*vir*.

Злиття протопластів. Даний метод є перспективним для об'єднання генів різних організмів, однак існує думка, що використовувати ці методи для

створення штамів з бажаними властивостями у грамнегативних бактерій, таких як *E. coli*, складно, оскільки зовнішня мембрана ускладнює злиття протопластів. Проте, відоме успішне використання даного методу в *E. coli*, наприклад, для отримання прототрофних штамів злиттям двох ауксотрофних, з достатньо високою частотою злиття [35].

3.2.4. Регуляція метаболізму у мікробній клітині

Регуляція метаболізму у мікробній клітині є одним з методів генетичного конструювання *in vivo*. Даний метод може бути використаний для отримання промислових штамів *E. coli*.

Регуляція активності ферментів. Прикладом такої регуляції у *E. coli* може бути ретроінгібування на шляху синтезу триптофану. Виявлено, що накопичення індолгліцерофосфата (попередника триптофану) у мутанта *E. coli* з порушеним біосинтезом триптофану різко гальмується, якщо триптофан додати в середовище. Це відбувається незважаючи на те, що в клітинах є всі ферменти, необхідні для синтезу даного попередника триптофану. Триптофан інгібує каталітичну функцію антранілатсинтетази, утворення антранілата припиняється, якщо в реакційну суміш додати триптофан. Дане високоспецифічне інгібування активності першого фермента заключного етапу шляху біосинтезу триптофану (ретроінгібування) забезпечує сувору і гнучку регуляцію новоутворення цієї амінокислоти в залежності від швидкості включення її в білок і присутності в ростовому середовищі.

Індукція ферментів. Клітини *E. coli*, що ростуть на середовищі з глюкозою, містять тільки слідові кількості ферментів метаболізму лактози і інших субстратів, які вони здатні засвоювати. Однак якщо ті ж клітини перенести в середовище, що містить в якості єдиного джерела вуглецю лактозу, то вже через 1-2 хв можна зафіксувати підвищення активності β-галактозидази. Цей фермент гідролізує лактозу на D-галактозу і D-глюкозу. Протягом

наступних 20-180 хв (залежно від умов) активність β-галактозидази збільшується в 1000 разів у порівнянні з вихідним рівнем [33].

Амінокислотний контроль метаболізму. У *E. coli* механізм суворого амінокислотного контролю синтезу РНК (механізм, який координує процеси синтезу білка і нуклеїнових кислот) залежить від функції гена relA. У штамів дикого типу, Rel^+ (з суворим амінокислотним контролем синтезу РНК), позбавлення клітин необхідної їм амінокислоти швидко зупиняє не тільки синтез білка, але і подальше утворення РНК. Вирішальне значення в цьому має відсутність у клітинах повного комплекту аміноацил-тРНК. Синтез РНК зупиняється, наприклад, при тепловій інактивації мутантних температурочутливих аміноацил-тРНК-синтетаз. У мутантів Rel^- (штамів з ослабленим амінокислотним контролем синтезу РНК) в аналогічних умовах утворення РНК триває ще деякий час після зупинки синтезу білка. Специфічне пригнічення синтезу рибосомних білків є результатом зниження транскрипції відповідних генів, що обумовлено накопиченням гуанозинтетрафосфата. Стимулююча дія гуанозинтетрафосфата на експресію амінокислотних оперонів виявляється в позитивному впливі дикого алеля гена relA на надсинтез амінокислот, зокрема треоніну, у *E. coli*. З іншого боку, пуринові нуклеотиди та їх похідні, синтез яких пригнічується гуанозин-тетрафосфатом, більш ефективно продукуються мутантами $RelA^-$.

Регуляція засвоєння азотовмісних сполук. У *E. coli* глутамін ініціює інактивацію глутамінсинтетази, яка здійснюється в результаті ковалентної модифікації - аденілювання ферменту. Регулюється не тільки активність, але і синтез глутамінсинтетази - *E. coli* та інші ентеробактерії реагують на голодування за джерелом азоту збільшенням внутрішньоклітинної концентрації глутамінсинтетази і ряду ферментів, які беруть участь в деградації азотовмісних сполук [33].

Регуляція протеолізу. Продукт гена recA *E. coli*, Rec A-білок, є високоспецифічною протеїназою. Він володіє одночасно декількома

ферментативними активностями. Він зв'язується з одно- і дволанцюговими ДНК і забезпечує взаємодію їх молекул, необхідну для процесів рекомбінації, є АТФазою, а також проявляє протеолітичну активність, дуже специфічну до білків-субстратів. Разом з продуктом гена lexA Rec A-білок відіграє провідну роль в SOS-репарації клітини (механізм синтезу ДНК, толерантних до пошкоджень). Rec A-протеїназа здатна інактивувати також репресор фага λ.

Регуляція переносу речовин через мембрани. Даний вид регуляції може здійснюватися на рівні біосинтезу компонентів транспортної системи або на рівні функціонування транспортної системи.

У *E. coli* відомі два класи субстратів, на засвоєння яких впливає рівень фосфорилювання фактора $III^{Глк}$. До першого належать мальтоза, лактоза, гліцерин, засвоєння яких залежить від цАМФ, що активує транскрипцію оперонів, контролюючих синтез компонентів відповідних транспортних систем. Надходження цих сполук в клітину пригнічується нефосфорильованим фактором $III^{Глк}$. У другий клас входять ксилоза, рамноза, органічні кислоти (цитрат, сукцинат і ін.), для засвоєння яких потрібен цАМФ. Системи їх транспорту не чутливі до пригнічення нефосфорильованим фактором $III^{Глк}$. Велика кількість метаболітів виводиться через пори в мембрані. У *E. coli* вони утворені поринами, продуктами генів ompF і ompC. Експресія цих генів залежить від осмолярності середовища [33].

3.2.5. Використання методів генної інженерії

Застосування генно-інженерних методів дозволяє підвищити синтез цільового продукту промисловим штамом. Це може бути досягнуто збільшенням кількості копій гену в клітині за допомогою багатокопійних плазмід; використанням сильних промоторів *E. coli* (lac, trp), фагів (наприклад, λ), забезпеченням ефективної транскрипції та трансляції, інгібуванням синтезу нуклеаз.

E. coli надається перевага як хазяїну для клонування генів через високу ефективність введення молекул ДНК у клітини. Крім того, штами *E. coli* обирають при продукуванні рекомбінантних білків завдяки швидкому росту та здатності експресувати білки на високому рівні [36].

У технології, яка описана в даному проекті, методи генної інженерії застосовуються для створення рекомбінантної плазміди pHINS11, що несе послідовність ДНК проінсуліну людини.

3.2.6. Використання комбінації вищенаведених методів

Найбільший ефект при отриманні високопродуктивних промислових продуцентів дає застосування не кожного з вищенаведених методів окремо, а в поєднанні з іншими методами, наприклад, використання генної інженерії та гібридизації з наступною селекцією продуцента.

У технології, яка описана в даному проекті, застосовується комбінація різних методів створення промислових продуцентів - кон'югації, трансдукції, трансформації, використання генної інженерії - для отримання продуцента *E. coli* JM109/pHINS11, що забезпечить високий вихід гібридного білка для отримання з нього людського інсуліну.

3.3. Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

3.3.1. Блок-схема отримання продуцента E. coli JM109/pHINS11

Блок-схема отримання промислового продуцента *E. coli* JM109/pHINS11, що використовується в технології, описаній в дипломному проекті, подана на рис. 3.4.

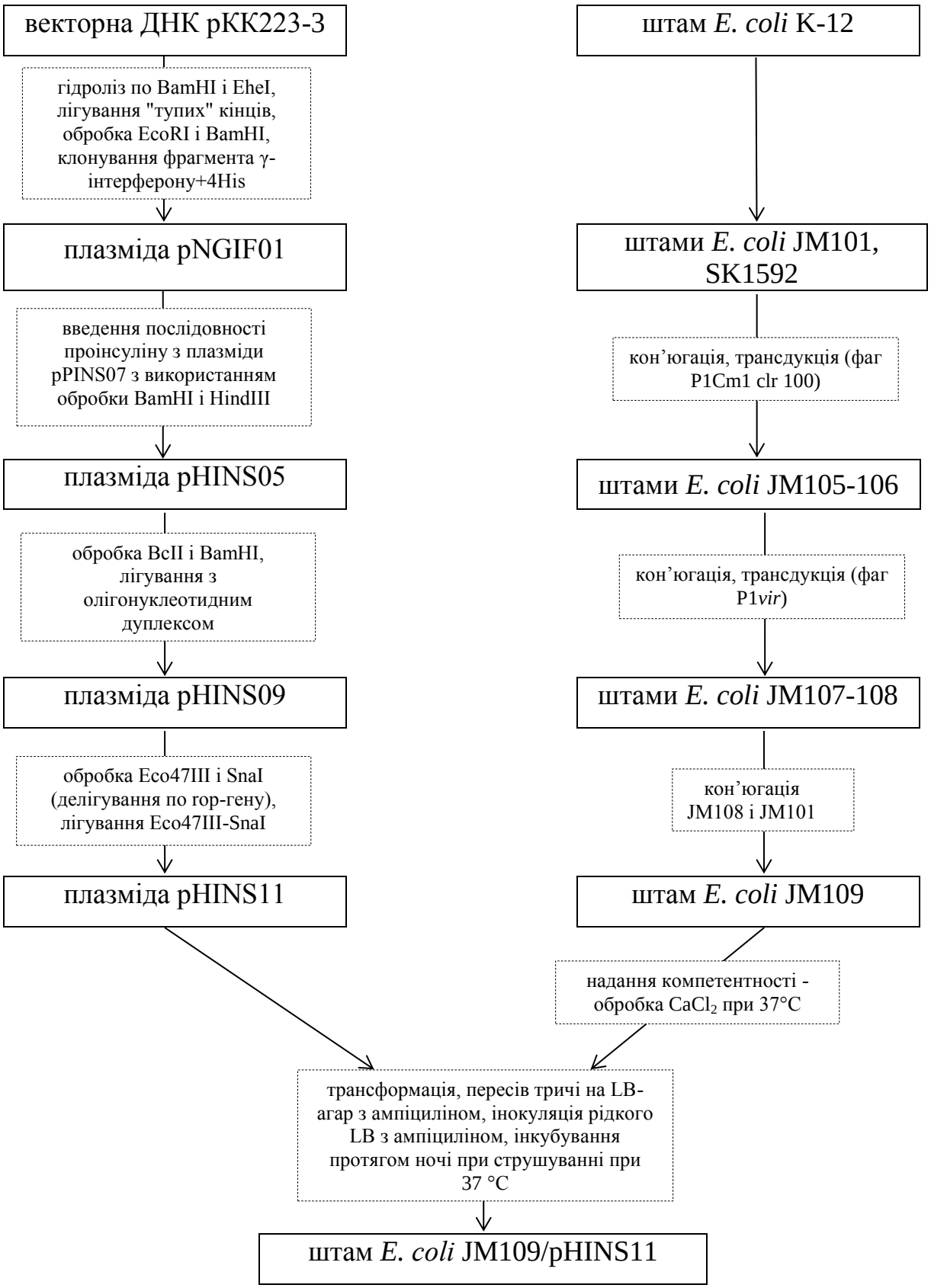

Рисунок 3.4. Блок-схема отримання промислового продуцента *E. coli* JM109/pHINS11.

3.3.2. Опис отримання продуцента E. coli JM109/pHINS11

Отримання штаму E. coli JM109. Штами JM101 та SK1592, що є похідними *E. coli* K-12, було кон'юговано між собою, в результаті чого був утворений штам JM105. Далі за допомогою трансдукції JM105 з використанням фага P1Cm1 clr 100 був утворений штам JM106 з хромосомною делецією гена lacZ. JM106 (F^-) було кон'юговано з JM101 (F '), в результаті чого створено штам JM107 з хромосомною делецією гена lacZ. За допомогою трансдукції JM106 з використанням фага P1*vir* був створений штам JM108 з мутацією *rec*A1. Була проведена кон'югація JM108 з JM101, в результаті чого створено штам JM109.

Штам *E. coli* JM109 здатний до швидкого росту і ефективної трансформації різноманітними методами. JM109 є recA$^-$ (мутація *rec*A1) і в нього немає рестрикційної системи *E. coli* K-12, тому відсутня небажана рекомбінація з хромосомною ДНК хазяїна та рестрикція клонованої ДНК. Мутація ендонуклеази А (*end*A1) призводить до поліпшення виходу та якості виділеної плазмідної ДНК. JM109 не має активності β-галактозидази через делеції обох, хромосомної та епісомальної (F '), копій гена lacZ [37].

Конструювання плазміди pHINS11. Рекомбінантну плазміду pHINS11 сконструйовано на основі плазміди pHINS05. Вихідною плазмідою для pHINS05 є плазміда pNGIF01. Ця плазміда конструюється на основі векторної ДНК pKK223-3, у якої вилучений фрагмент BamHI-EheI, за допомогою добудови "липких" кінців після часткового гідролізу по BamHI і повного гідролізу по EheI і подальшого лігування отриманих "тупих" кінців. Отримана таким чином плазміда pKK223-3-del використовується в якості вектора для клонування фрагмента ДНК, що кодує N-кінцеву послідовність γ-інтерферону людини з додатковими 4His (фрагмент синтезується за допомогою полімеразної ланцюгової реакції). Перед клонуванням продукт ампліфікації обробляється рестриктазами EcoRI і BamHI для генерації "липких" кінців. Отримана плазмідна ДНК pNGIF01 містить між сайтами EcoRI і BamHI даний фрагмент.

Далі плазміда pNGIF01 використовується для конструювання плазміди, що кодує гібридний білок, в якому N-кінцева послідовність γ-інтерферону з додатковими 4His з'єднана з послідовністю проінсуліну людини. Для цього нуклеотидна послідовність, що кодує проінсулін людини, обмежена сайтами рестрикції BamHI і HindIII, отримується з плазміди pPINS07 і клонується в векторі, отриманому гідролізом плазміди pNGIF01 тими ж рестртиктазами. Проводиться лігування суміші. Таким чином отримується плазміда pHINS05 [38].

Для вдосконалення властивостей гібридного білка, який кодується плазмідою pHINS05, в склад її лінкерної послідовності вводяться додаткові амінокислотні залишки, що сприяють правильному фолдингу білка з проінсуліном людини, а також його більш ефективному ферментативному розщепленню. З цією ціллю плазміда pHINS05 гідролізується рестриктазами BcII і BamHI [39]. Для цього 5 мкг плазмідної ДНК pHINS05 в 20 мкл буфера і 10 од. рестриктаз BcII і BamHI інкубують 1 годину при температурі 37 °С. З отриманого гідролізату виділяють BcII-BamHI фрагмент ДНК за допомогою електрофорезу в 0,8% гелі агарози. Далі ДНК депротеїнізують фенолом, сумішшю фенолу з хлороформом (1:1), хлороформом, і осаджують етиловим спиртом [1]. Отриманий BcII-BamHI фрагмент, що містить ген гібридного білка і векторну плазміду pHINS05, лігується з олігонуклеотидним дуплексом, отриманим в результаті віджигу синтетичних олігонуклеотидів oligo-link24A і oligo-link24B. Проводиться лігування суміші і трансформація нею компетентних клітин *E. coli* JM109. Результатом є отримання плазміди pHINS09.

Для збільшення копійності pHINS09 (для отримання плазміди pHINS11 (рис. 3.2.)) її необхідно делігувати по rop-гену (негативному регулятору копійності) за рахунок повного гідролізу Eco47III і SnaI і наступного лігування отриманого Eco47III-SnaI [39]. Для цього до 5 мкг плазмідної ДНК pHINS09 в 20 мкл буфера додають 10 од. рестриктази Eco47III і SnaI, що генерують «тупі»

кінці, і суміш інкубують протягом 1 години при 37 °С. Далі ДНК депротеїнізують фенолом, сумішшю фенолу з хлороформом (1:1), хлороформом, осаджують етиловим спиртом, розчиняють в 20 мкл води. Отриману таким чином ДНК лігують в 30 мкл буфера для лігування в присутності 5 од. ДНК лігази фага Т4 протягом 16 годин при 8 °С. Лігованою сумішшю (10 мкл) трансформують компетентні клітини *E. coli* JM109 і висівають на LB-агар, що містить 100 мкг/мл ампіциліну [1].

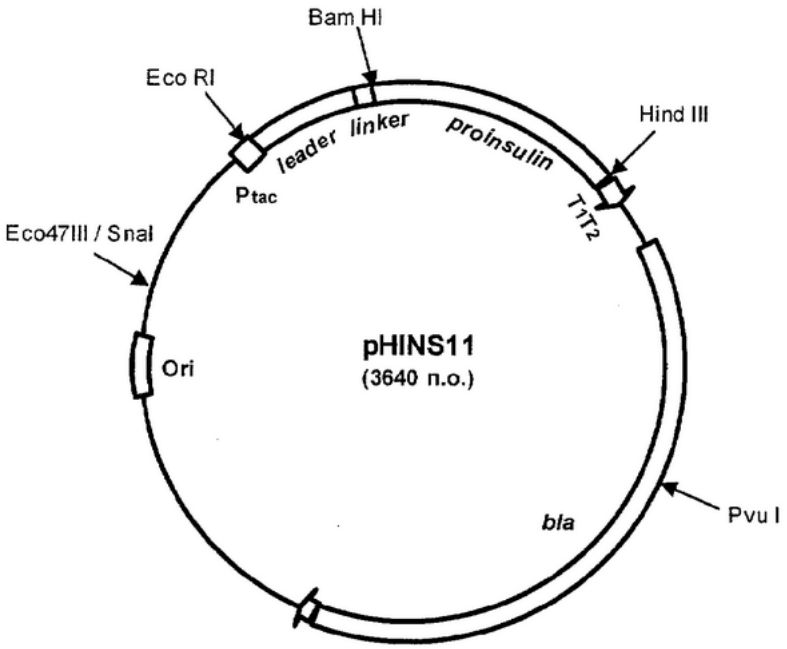

Рисунок 3.5. Схема рекомбінантної плазміди pHINS11. P_{tac} - промотор транскрипції, T_1T_2 - rrnB термінатори транскрипції рибосомного оперона *E. coli*, ori - ділянка ініціації реплікації, *bla* - ген β-лактамази (генетичний маркер, що визначає стійкість до ампіциліну). Кодуючі послідовності у гені гібридного білка: *leader* - N-кінцевого фрагмента гамма-інтерферону людини, *linker* - пептидного лінкера HisProGlySerHisHisHisHisGlySerArg, *proinsulin* - проінсуліну людини. Eco47III/SnaI - місце лігування по "тупим" кінцям, що утворюються рестриктазами Eco47III і SnaI [39].

Відбирають бактеріальні клони, що несуть плазмідну ДНК розміром 3,6 т.п.н. Виділені плазміди піддають рестрикційному аналізу і секвенують за

методом Сенджера. Таким чином отримується рекомбінантна плазміда pHINS11 [1].

Перевагою плазміди pHINS11 є те, що вона забезпечує більш високий вихід інсуліну за рахунок підвищення виходу правильно згорнутого гібридного білка [39].

Трансформація E. coli JM109 плазмідою pHINS11. Плазмідою pHINS11 трансформують компетентні клітини (оброблені $CaCl_2$) штаму *E. coli* JM109 і висівають на LB-агар, що містить 100 мкг/мл ампіциліну. Окремо локалізовану колонію тричі пересівають на чашки з LB-агаром, що містить 100 мкг/мл ампіциліну. Отриманою моноклоновою культурою інокулюють 5 мл рідкого середовища LB з ампіциліном і інкубують протягом ночі при інтенсивному струшуванні при 37 °С. Отриманий штам-продуцент *E. coli* JM109/pHINS11 зберігають в 20% гліцерині при - 40 °С [1].

Штам-продуцент *E. coli* JM109/pHINS11 характеризується наступними ознаками:

- клітини дрібні, розміром 1×3,5 мкм, рухливі, з добре помітними тільцями включення після індукції синтезу гібридного білка;

- при рості на агаризованому середовищі LB колонії круглі, гладкі, напівпрозорі, блискучі, сірі з рівним краєм та діаметром 1-3 мм.

- клітини мають стійкість до ампіциліну (до 500 мг/мл), обумовлену наявністю в плазміді гена bla.

- при підтримці клітин протягом декількох місяців на агаризованому середовищі LB, що містить ампіцилін, не спостерігається втрати або перебудови плазміди, що впливають на експресію гібридного білка.

- гібридний білок (масою приблизно 15,4 кДа) після індукованої експресії накопичується у вигляді тілець включення і його вміст становить не менше 30% від загального білка клітини [39].

Висновки до розділу 3:

Було описано геном *E. coli*, наведено генетичну карту продуцента, розглянуто будову гену інсуліну, що знаходиться на 11-ій хромосомі та містить три екзони, два з яких кодують даний гормон. Було описано механізм експресії гену, індуктори та репресори процесу синтезу. Було відзначено, що вивченість геному *E. coli*, а також механізму експресії гену, відповідального за синтез інсуліну людини, створює можливість конструювання високопродуктивних промислових штамів для синтезу рекомбінантного людського інсуліну з використанням системи експресії генів *E. coli*. Було розглянуто методи генетичного конструювання *in vivo* та *in vitro* для отримання високопродуктивних промислових штамів, такі як використання індукованого мутагенезу, методи гібридизації, регуляція метаболізму в клітині, використання методів генної інженерії. Було відзначено, що найбільшої продуктивності можна досягти завдяки поєднанню різних методів.

Було наведено схему створення промислового продуцента інсуліну *E. coli* JM109/pHINS11, що використовується в технології, описаній в даному проекті. Було розглянуто процес створення даного штаму, в якому застосовується комбінація кон'югації, трансдукції, трансформації та використання генної інженерії, що забезпечить високий вихід гібридного білка для подальшого отримання з нього людського інсуліну.

З метою опису технології виробництва рекомбінантного людського інсуліну з використанням *E. coli* JM109/pHINS11, необхідно:

- скласти технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну з використанням *E. coli* JM109/pHINS11 як промислового продуцента, навести опис технологічного процесу за стадіями, матеріальний баланс та перелік контрольних точок;

- навести характеристику кінцевої продукції виробництва.

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1. Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: рекомбінантний людський інсулін короткої дії у картриджах по 3 мл (100 МО/мл).

Діючий нормативно-технічний документ на продукцію: монографії ДФУ 2.0 Т.2 “Інсулін розчинний для ін’єкцій”, “Інсуліну лікарські засоби для ін’єкцій”.

Реєстраційні номери діючих виробництв:

ХУМОДАР® Р 100Р - розчин для ін'єкцій, 100 МО/мл по 3 мл у картриджі, по 3 або по 5 картриджів у пачці з картону; виробник - ПрАТ "По виробництву інсулінів "Індар", Україна; номер реєстраційного посвідчення: UA/1232/01/01; термін дії посвідчення: необмежений, з 08.05.2019. АКТРАПІД® НМ ПЕНФІЛ® - розчин для ін'єкцій, 100 МО/мл по 3 мл у картриджі; по 5 катриджів у картонній коробці; виробник - А/Т Ново Нордіск, Данія; номер реєстраційного посвідчення: UA/12611/01/01; термін дії посвідчення: необмежений, з 08.11.2017; та інші з кодом АТХ А10АВ01.

Призначення продукції:

Антидіабетичний препарат. Цукрознижувальний ефект полягає в сприянні поглинанню глюкози тканинами після зв’язування інсуліну з рецепторами м’язових і жирових клітин, а також в одночасному пригніченні виділення глюкози з печінки.

Зовнішній вигляд та фізико-хімічні характеристики продукції:

Розчин для ін’єкцій. Безбарвна, прозора рідина, що не містить сторонніх часток, при зберіганні можуть виявлятися сліди дуже тонкого осаду.

Склад:

- діюча речовина: інсулін людський (рДНК); 1 мл розчину для ін'єкцій містить 100 МО інсуліну людського біосинтетичного (рекомбінантна ДНК, одержана з *E. coli*) [40, 41];

- допоміжні речовини: цинку хлорид (7 мкг/мл), гліцерин (16 мг/мл), метакрезол (3 мг/мл), вода для ін'єкцій; натрію гідроксид та кислота хлористоводнева можуть бути додані для регулювання pH до 7,4 [40, 41, 42].

Термін придатності: 2,5 року.

Умови зберігання:

Зберігати у холодильнику при температурі 2 °С - 8 °С. Не заморожувати. Зберігати картриджі у вторинній упаковці для захисту від впливу світла. Після першого відкриття не зберігати в холодильнику, зберігати при температурі не вище 30 °С. Не застосовувати препарат після закінчення терміну придатності, вказаного на упаковці. Зберігати у недоступному для дітей місці.

Упаковка: скляний картридж ємністю 3 мл; по 5 картриджів у картонній коробці.

Маркування: на упаковці вказується назва препарату, склад, кількість діючої речовини в МО, кількість картриджів в упаковці, реєстраційний номер, дата виготовлення, термін придатності, серія, умови зберігання, виробник та адреса виробництва. На кожному картриджі зазначається назва препарату, діюча речовина та її кількість в МО, дата виготовлення, термін придатності, серія, виробник.

Категорія відпуску: за рецептом [40, 41].

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

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів наведена у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1. Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів.

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки, та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
1.1. Ампіциліну натрієва сіль	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 47	Прозорість (каламутність не перевищує еталон), кольоровість (≤ 0,15), pH (8-10), питоме оптичне обертання (+258° - +287°), супровідні домішки (рідинна хроматографія), N,N-диметиланілін (≤ 0,002%), 2-етилгексанова кислота (≤ 0,8%), метиленхлорид (≤ 0,2%), важкі метали (≤ 0,002%), вода (≤ 2%), бактеріальні ендотоксини (< 0,15 МО/мг)	–
1.2. Ацетат цинку	Zinc Acetate, United States Pharmacopeia (USP) Reference Standard, Sigma-Aldrich	pH 5% р-ну = 6,0-7,0; Максимальний вміст домішок: N 0.005%, SO4 0.002%, NO3 0.005%, As 0,00005%, Ca 0,005%, Cd 0,001%, Cu 0,001%, Fe 0,0005%, K 0,01%, Mg 0,005%, Mn 0,001%, Na 0,01%, Pb 0,001%	–
1.3. Ацетон	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 74	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), кислотність або лужність (оранжевий), відносна густина (0,790-0,793), речовини, що відновлюють (не повністю знебарвлення), супровідні домішки (газова хроматографія), речовини, нерозчинні у воді (прозорий), сухий залишок (≤ 1 мг), вода (≤ 3 г/л)	–
1.4. Вода для ін'єкцій	СТ-Н МОЗУ 42-3.7: 2013	Загальний органічний вуглець (≤ 0,5 мг/л), питома електропровідність (≤ 25 мкСм/см), нітрати (≤ 0,00002%), алюміній (≤ 0,000001%), важкі метали (≤ 0,00001%), бактеріальні ендотоксини (< 0,25 МО/мл), хлориди (≤ 0,00005%), амонію солі (≤ 0,00002%), кальцій і магній (слабко-синє забарвлення), сухий залишок (≤ 4 мг), механічні включення і стерильність - витримує випробування	–
1.5. Вода очищена	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 129	Питома електропровідність (таблиця), нітрати (≤ 0,00002%), алюміній (≤ 0,000001%), важкі метали (≤ 0,00001%), бактеріальні ендотоксини (< 0,25 МО/мл), хлориди (немає змін у розчині), сульфати (немає змін у розчині), амонію солі (≤ 0,00002%), кальцій і магній (чисте синє забарвлення), сухий залишок (≤ 1 мг),	–

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
		мікробіологічна чистота (≤ 100 аеробних життєздатних м/о в 1 мл)	
1.6. Гідроксид натрію	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 475	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), карбонати (≤ 2%), хлориди (≤ 0,005%), сульфати (≤ 0,005%), залізо (≤ 0,001%), важкі метали (≤ 0,002%)	–
1.7. Гідролізат казеїна соляно-кислотний	"ХІМТЕСТ УКРАЇНА+" https://chemtest.com.ua	Дрібнодисперсний порошок світло-жовтого кольору, розчинний у воді; pH	–
1.8. Гідрофосфат калію	di-Potassium hydrogen phosphate EMPROVE® ESSENTIAL, Ph Eur,USP	Insoluble substances ≤ 0.2 %; pH 8.5 - 9.6; Carbonate - passes test; Chloride ≤ 0.02 % Fluoride ≤ 0.001 % Sulfate ≤ 0.1 % Heavy metals (as Pb) ≤ 0.0010 % Al ≤ 0.0003 %; As (Arsenic) ≤ 0.0002 % Fe (Iron) ≤ 0.0010 % Na (Sodium) ≤ 0.1 % Na (sodium) - passes test Potassium dihydrogen phosphate ≤ 2.5 % Residual solvents excluded by manufacturing process Reducing substance - passes test; Loss on drying (130 °C) ≤ 1.0 %; Total aerobic microbial count ≤ 500 CFU/g; Bacterial endotoxins < 1.1	–
1.9. Гліцерин	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 162	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), кислотність або лужність (безбарвний, рожевий при дод. 0,2 мл 0,1 М гідроксиду натрію), показник заломлення (1,470-1,475), альдегіди та ефіри (зміна забарвлення), домішки (газова хроматографія), цукри (блакитний), галогенопохідні (≤ 0,0035%), хлориди (≤ 0,001%), важкі метали (≤ 0,0005%), вода (≤ 2%), сульфатна зола (≤ 0,01%)	–
1.10. Глюкоза моногідрат	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 173	Прозорість (прозорий), кольоровість (колір не інтенсивніший за еталон), кислотність або лужність (рожевий), питоме оптичне обертання (+52,5°- +53,3°), сторонні цукри (немає змін розчину), сульфіти (≤ 0,0015%), хлориди (0,0125%), сульфати (≤ 0,02%), арсен (≤ 0,0001%), кальцій (≤ 0,02%), свинець у цукрах (≤ 0,00005%), вода (7-9,5%), сульфатна зола (≤ 0,1%)	–

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
1.11. Дигідро-фосфат калію	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 329	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), pH (4,2-4,5), речовини, що відновлюють (слабко-рожевий розчин), хлориди (≤ 0,02%), сульфати (≤ 0,03%), арсен (≤ 0,0002%), залізо (≤ 0,001%), натрій (≤ 0,1%), важкі метали (≤ 0,001%), втрата в масі при висушуванні (≤ 2%)	–
1.12. Дитіотреітол	DTT 1,4-Dithiothreitol, GE Healthcare	Assay: ≥97%; form: crystalline powder; mol. wt: 154.3	–
1.13. Екстракт пекарських дріжджів	Yeast Extract, Millipore	Form: powder Impurities ≥10% total, nitrogen (N) ≥4.5%, Loss ≤8% loss on drying, pH 6.5-7.5	–
1.14. ІПТГ	IPTG, Sigma-Aldrich	Biological source: synthetic; assay: ≥99% form: powder; impurities: ≤0.1% Dioxane	–
1.15. Карбокси-пептидаза В	Carboxypeptidase B, Roche	Contaminants expressed as percentage of carboxypeptidase B activity: Carboxypeptidase A ≤2% Trypsin ≤0.005 U/mg	–
1.16. Кислота хлористоводнева	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 680	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), вільний хлор (≤ 0,0004%), сульфати (≤ 0,002%), важкі метали (≤ 0,0002%), сухий залишок (≤ 10 мг)	–
1.17. Метакрезол	m-Cresol, Sigma-Aldrich	Assay - 99%	–
1.18. Сульфат магнію	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 422	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), кислотність або лужність (зміна забарвлення), хлориди (≤ 0,03%), арсен (≤ 0,0002%), залізо (≤ 0,002%), важкі метали (≤ 0,001%), втрата в масі при висушуванні (48-52%)	–
1.19. Трипсин	Trypsin, European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard. Sigma-Aldrich	Loss on drying ≤ 5.0%. Residue on ignition ≤ 2.5%. Limit of chymotrypsin ≤ 5%	–
1.20. Фенол	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 654	Прозорість (прозорий), кольоровість (колір не інтенсивніший за еталон), кислотність (жовтий), температура твердіння (≥ 39,5 °С), сухий залишок (≤ 0,05%)	–
1.21. Хлорид калію	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 331	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), кислотність або лужність (зміна забарвлення), броміди (≤ 0,1%), йодиди (не має з'явл. синє забарвлення), сульфати (≤ 0,03%), важкі метали (≤ 0,001%), залізо (≤ 0,002%), магній і	–

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
		лужноземельні метали (≤ 0,02%), натрій (≤ 0,1%), алюміній (≤ 0,0001%), втрата в масі при висушуванні (≤ 1%)	
1.22. Хлорид натрію	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 490	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), кислотність або лужність (зміна забарвлення), броміди (≤ 0,01%), йодиди і фероціаніди (не має з'явл. синє забарвлення), нітрити (OD ≤ 0,01), фосфати (≤ 0,0025%), сульфати (≤ 0,02%), арсен (≤ 0,0001%), важкі метали (≤ 0,0005%), залізо (≤ 0,0002%), магній і лужноземельні метали (≤ 0,01%), калій (≤ 0,05%), алюміній (≤ 0,00002%), втрата в масі при висушуванні (≤ 0,5%), бактеріальні ендотоксини (< 5 МО/г)	–
1.23. Хлорид цинку	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 714	pH (4,6-5,5), оксихлориди (зникнення помутніння), сульфати (≤ 0,02%), алюміній, кальцій, важкі метали, залізо, магній - білий осад, амонію солі (≤ 0,04%)	–
1.24. Хлоридна кислота	Hydrochloric acid, meets analytical specification of Ph. Eur., Sigma-Aldrich	Assay: 36.5-38%, ign. residue ≤0.002% (as SO_4); color - light yellow; anion traces: bromide: in accordance; iodide: in accordance; sulfate: ≤2 mg/kg; sulfite: ≤5 mg/kg; cation traces: As: ≤0.5 mg/kg, Fe: ≤1 mg/kg	–
2. Допоміжна сировина:			
2.1. Ацетат амонію	Ammonium acetate, Sigma-Aldrich	Grade: reagent grade; assay ≥98%; form: solid	–
2.2. Ацетат натрію	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 470	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), pH (7,5-9,0), хлориди (≤ 0,02%), сульфати (≤ 0,02%), алюміній (≤ 0,00002%), арсен (≤ 0,0002%), кальцій і магній (≤ 0,005%), важкі метали (≤ 0,001%), залізо (≤ 0,001%), втрата в масі при висушуванні (39-40,5%)	–
2.3. Вода питна	ДСТУ 7525:2014	Число бактерій в 1 $см^3$ - ≤ 20; число бактерій групи кишкових паличок в 1 $дм^3$, число термостабільних кишкових паличок 100 $см^3$, число патогенних мікроорганізмів в 1 $дм^3$, води число коліфагів в 1 $дм^3$, спори сульфіторедук. клостридій, синьогнійна паличка - відсутність	–

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
2.4. Гідроксид натрію	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 475	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), карбонати (≤ 2%), хлориди (≤ 0,005%), сульфати (≤ 0,005%), залізо (≤ 0,001%), важкі метали (≤ 0,002%)	–
2.5. Гліцин	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 169	Прозорість (прозорий), кольоровість (колір не інтенсивніший за еталон), pH (5,9-6,4), хлориди (≤ 0,0075%), важкі метали (≤ 0,001%), втрата в масі при висушуванні (≤ 0,5%), сульфатна зола (≤ 0,1%), залишкові кількості органічних розчинників та ендотоксини - відповідає вимогам	–
2.6. ЕДТА	1233009 USP Edetate disodium	pH (4,0-6,0), втрата маси при висушуванні (≤ 11,4%), Кальцій, Нікель, Хром - відповідає нормі	–
2.7. КМ-сефароза (карбоксиметил сефароза)	CM Sepharose® Fast Flow (GE17-0719-01), GE Healthcare	Particle size: 45-165 μm (wet bead); pore size: 4,000,000 exclusion limit (av. mol. wt.); capacity: 90-130 μeq/mL(gel basis)	–
2.8. Лимонна кислота (моногідрат)	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 399	Прозорість (прозорий), кольоровість (колір не інтенсивніший за еталон), речовини, що легко обвуглюються (колір не інтенсивніший за еталон), кислота щавлева (≤ 0,036%), сульфати (≤ 0,015%), алюміній (≤ 0,00002%), важкі метали (0,001%), вода (7,5-9,1%), сульфатна зола (≤ 0,1%), бактеріальні ендотоксини (< 0,5 МО/мг)	–
2.9. Олеїнова кислота	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 516	Кольоровість (колір не інтенсивніший за еталон), кислотне число (195-204), йодне число (89-105), перекисне число (≤ 10), жирнокислотний склад (газова хроматографія), загальна зола (≤ 0,1%)	–
2.10. Оцтова кислота	1005706 USP Glacial acetic acid	Нелеткі залишки (≤ 0,005%), хлориди (відсутність опалесценції), сульфати та інші домішки - відповідає нормі	–
2.11. Перекис водню 30%	Hydrogen peroxide 30%, EMPROVE® ESSENTIAL, Ph Eur,USP	Acidity (according to Ph Eur): passes test Acidity (according to USP): passes test Chloride (Cl): ≤ 0.005 % Phosphate: ≤ 0.05 % Heavy metals (as Pb): ≤ 0.0005 % As (Arsenic): ≤ 0.0003 % Cu (Copper): ≤ 0.002 % Pb (Lead): ≤ 0.001 % Pd: ≤ 0.0001 % Pt (Platinum): ≤ 0.0001 % Zn (Zinc): ≤ 0.002 % Organic stabilizers: ≤ 0.045 %	–

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
2.12. Сечовина	Монографія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 585	Прозорість (прозорий), кольоровість (безбарвний), лужність (оранжевий), біурет (≤ 0,1%), амонію солі (≤ 0,05%), важкі метали (≤ 0,001%), втрата в масі при висушувані (≤ 1%), сульфатна зола (≤ 0,1%)	–
2.13. Синтетичний миючий засіб	GRASS "Orion"	Засіб миючий нейтральний, 5кг	–
2.14. СП-сефароза (сульфопропіл сефароза)	SP Sepharose® Fast Flow, GE Healthcare	Form: aqueous ethanol suspension; matrix active group: -CH_2-SO_3-; particle size: 45-165 μm (wet); pore size: ~4,000,000 Da exclusion limit; capacity: 180-250 μeq/mL, gel	–
2.15. Трис-основний	Tris(hydroxymethyl) aminomethane, Sigma-Aldrich, 252859	Useful pH range: 7 - 9	–
2.16. Трис-хлоридна кислота	Tris-HCl, Invitrogen™, Catalog number: 15567027	pH - 7.5	–
3. Матеріали:			–
3.1. Картонні коробки	Pro100box store@pro100box.com	Розмір однієї коробки: 10х9х3 см	для картриджів
3.2. Картонні коробки	Pro100box store@pro100box.com	Розмір однієї коробки: 150х100х100 см	групова тара
3.3. Картриджі на 3 мл	EZ-Fill, www.ez-fill.com	Об’єм одного картриджа: 3 мл	–
3.4. Папір	ZOOM, Фінляндія	А4, 80 г/м^2, клас С	для інструкцій
3.5. Фарба для маркування картриджів	PaliGlass FX 1070 base C, Palina Coatings	Густина: 1,04-1,19 кг/л	–
3.6. Фільтр 0,22 мкм	MF-Millipore™ Membrane Filter, 0.22 μm pore size, Catalogue Number: GSWP04700	Refractive Index: 1.51 Pore Size: 0.22 μm Air Flow Rate: 2 L/min x cm² Porosity: 75% Water Flow Rate: 18 mL/min x cm²	–
3.7. Фільтр 0,45 мкм	MF-Millipore™ Membrane Filter, 0.45 μm pore size, Catalogue Number:	Refractive Index: 1.51 Pore Size: 0.45 μm Air Flow Rate: 4 L/min x cm² Porosity: 79%	–

Продовження таблиці 4.1.

1	2	3	4
	HAWP04700	Water Flow Rate: 60 mL/min x cm²	
4. Напівпродукти:			
4.1. Культуральна рідина	Регламент виробництва	Наявність ТВ у 90-95% клітин	–

4.3. Опис технологічного процесу

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Медичне обстеження персоналу

Працівники фармацевтичних підприємств мають проходити медичне обстеження відповідно до чинних нормативно-правових актів.

Відповідно до ст. 169 Кодексу законів про працю України та ст. 17 Закону України «Про охорону праці» роботодавець зобов’язаний за свої кошти організувати проведення попереднього (при прийнятті на роботу) і періодичних (протягом трудової діяльності) медичних оглядів працівників, зайнятих на важких роботах, роботах зі шкідливими чи небезпечними умовами праці або таких, де є потреба у професійному доборі, а також щорічного обов’язкового медичного огляду осіб віком до 21 року.

Відповідно до ст. 21 Закону України «Про захист населення від інфекційних хвороб» працівники окремих професій, виробництв та організацій, діяльність яких пов’язана з обслуговуванням населення, зобов’язані проходити профілактичні медичні огляди з метою уникнення поширення інфекційних хвороб. Результати профілактичних медичних оглядів занотовуються в особову медичну книжку.

ДР 1.1.2. Навчання персоналу

Згідно з СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016, весь персонал повинен знати принципи належної виробничої практики, що стосуються його діяльності, а також пройти первинне і подальше навчання відповідно до його обов'язків, включаючи інструктаж з виконання гігієнічних вимог.

Виробник повинен забезпечити навчання всього персоналу, обов'язки якого передбачають перебування у виробничих зонах та зонах зберігання або в контрольних лабораторіях (включаючи технічний і обслуговуючий персонал, а також співробітників, які здійснюють прибирання), та іншого персоналу, діяльність якого може вплинути на якість продукції. Кожен прийнятий на роботу співробітник повинен пройти навчання відповідно до закріплених за ним обов'язків. Потрібно також проводити подальше навчання, періодично оцінюючи його практичну ефективність. Мають бути навчальні програми, затверджені відповідно або керівником виробництва, або керівником відділу контролю якості. Необхідно зберігати протоколи навчання.

Персонал, який працює в зонах, де контамінація становить небезпеку, наприклад, у чистих зонах або в зонах, де обробляють сильнодіючі, токсичні, інфікуючі або сенсибілізуючі речовини, повинен пройти спеціальне навчання [43].

ДР. 1.1.3. Підготовка персоналу до роботи

Мають бути складені детальні програми з гігієни праці, адаптовані до різних потреб у межах підприємства. Вони мають містити методики, що стосуються здоров'я, дотримання гігієнічних правил і одягу персоналу. Кожен співробітник, обов'язки якого передбачають перебування в зонах виробництва і контролю, повинен розуміти ці методики і суворо їх дотримуватись.

Кожна особа, яка входить у виробничі зони, повинна носити захисний одяг. Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу і класу робочої зони. Одяг слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації [43].

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

ДР 1.2.1. Приготування миючих розчинів

Приготування миючих розчинів здійснюється за рахунок розчинення та гомогенізації синтетичного миючого засобу зі складу у воді питній в реакторі з механічним перемішуючим пристроєм при його швидкості обертання 1 $с^{-1}$. Розведення миючого засобу у воді питній відбувається до його концентрації 2-5%.

Здійснюється технологічний контроль. Миючий розчин використовується для щоденного, генерального прибирання, миття обладнання і комунікацій.

ДР 1.2.2. Приготування дезінфікуючих розчинів

Приготування розчину перекису водню здійснюється за рахунок розчинення та гомогенізації 30%-го перекису водню зі складу у воді питній в реакторі з механічним перемішуючим пристроєм при його швидкості обертання 1 $с^{-1}$. Розведення відбувається до концентрації перекису 1-2% для щоденного прибирання і 5-6% для генерального прибирання. Здійснюється технологічний контроль.

Приготування розчину каустичної соди здійснюється за рахунок розчинення та гомогенізації 40%-го розчину зі складу у воді питній в реакторі з механічним перемішуючим пристроєм при його швидкості обертання 1 $с^{-1}$. Розведення відбувається до концентрації 1-2% для щоденного прибирання і 5-6% для генерального прибирання. Здійснюється технологічний контроль.

Дезінфікуючі розчини використовуються для щоденного, генерального прибирання, миття обладнання і комунікацій.

ДР 1.3. Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.3.1. Щоденне прибирання

Щоденне прибирання здійснюється перед кожною зміною, воно включає миття підлоги, протирання робочих поверхонь, зон штуцерів і отворів та ін. Використовуються миючі та дезінфікуючі розчини для щоденного прибирання, відпрацьовані розчини відправляються на знешкодження.

Здійснюється мікробіологічний контроль після прибирання (аналіз змиву з поверхонь, аналіз кількості КУО в повітрі). Кількість КУО/$м^3$ повітря повинна відповідати класу чистоти приміщення: $A < 1$, $B < 10$, $C < 100$, $D < 200$. При невідповідності збільшується концентрація дезінфікуючого розчину.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання здійснюється раз на тиждень, воно включає миття стін, стелі, меблів та ін. Використовуються миючі та дезінфікуючі розчини для

генерального прибирання, відпрацьовані розчини відправляються на знешкодження.

Здійснюється мікробіологічний контроль після прибирання (аналіз змиву з поверхонь, аналіз кількості КУО в повітрі). Кількість КУО/м^3 повітря повинна відповідати класу чистоти приміщення: A < 1, B < 10, C < 100, D < 200. При невідповідності збільшується концентрація дезінфікуючого розчину.

ДР 1.4. Підготовка обладнання і комунікацій

ДР 1.4.1. Миття обладнання і комунікацій

Для миття обладнання і комунікацій використовуються миючі та дезінфікуючі розчини, приготовані на попередніх стадіях, та вода питна для ополіскування. Відпрацьовані розчини відправляються на знешкодження. Миття проводять 1-1,5 год, ополіскування продовжують до встановлення значення pH 6,5-7,5. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ДР 1.4.2. Перевірка обладнання на герметичність

Перевірка герметичності обладнання проводиться наступним чином: закриваються всі вентилі, в обладнання нагнітається повітря під тиском 0,2 МПа, протягом 30 хв відстежуються покази манометра, якщо вони залишаються сталими - обладнання пройшло перевірку на герметичність. Здійснюється технологічний контроль. Відпрацьоване повітря відправляється на знешкодження.

ДР 1.4.3. Стерилізація обладнання і комунікацій

Стерилізація обладнання і комунікацій проводиться гострою насиченою водяною парою, що подається під тиском 0,2-0,25 МПа (температура 120-128 °С) 1 год, при чому коефіцієнт стерилізації знаходиться в межах 90-560. Здійснюється технологічний контроль.

ДР 2. Підготовка очищеного повітря

ДР 2.1. Забір повітря з атмосфери

Забір повітря відбувається за допомогою повітрозабірника, отвір труби якого знаходиться на висоті 10-20 м над рівнем землі в місці з мінімальною

запиленістю повітря. В повітропроводі встановлена решітка для видалення великих об’єктів - листя, гілок та ін. Здійснюється технологічний контроль.

ДР 2.2. Механічна очистка повітря

Для механічної очистки повітря використовуються фільтри попередньої очистки, що забезпечують видалення механічних часток розміром 5 мкм і більше (пил, краплі вологи, частково мікроорганізми). Ефективність очистки становить 50-60%. Здійснюється технологічний контроль. Фільтруючі елементи відправляються на регенерацію.

ДР 2.3. Стиснення повітря

Стиснення необхідне для забезпечення необхідного об’єму подачі повітря з відповідним тиском на наступні стадії технологічного процесу. Адіабатичне стиснення до тиску 0,2 МПа відбувається в компресорі, при цьому повітря нагрівається до 120 °С. Здійснюється технологічний контроль.

ДР 2.4. Стабілізація параметрів повітря

Повітря охолоджується до 37-40 °С. Для недопущення утворення конденсату (що може призвести до проходження мікроорганізмів) відбувається видалення вологи у ресивері до значення 40-60%. Здійснюється технологічний контроль. Конденсат відправляється на знешкодження.

ДР 2.5. Очистка повітря на головному фільтрі

Головний фільтр забезпечує видалення механічних часток розміром 1,5 мкм і більше. Ефективність очистки становить 98-99%. Здійснюється технологічний контроль. Фільтруючі елементи відправляються на регенерацію.

ДР 2.6. Очистка повітря на індивідуальному фільтрі

Індивідуальний фільтр (фільтр тонкої очистки) забезпечує видалення механічних часток розміром 0,3 мкм і більше. Ефективність очистки становить 99,9999%. Повітря з індивідуального фільтра надходить безпосередньо в біореактор. Здійснюється технологічний контроль. Фільтруючі елементи відправляються на регенерацію.

ДР 3. Підготовка стерильних поживних середовищ

ДР 3.1. Підготовка стерильних розчинів термолабільних компонентів

ДР 3.1.1. Приготування розчинів термолабільних компонентів

Приготування розчинів термолабільних компонентів здійснюється у реакторі з перемішуючим пристроєм при його швидкості обертання 1 с $^{-1}$. До реактора вносяться (кг): гідролізат казеїна соляно-кислотний - 2,836, екстракт пекарських дріжджів - 1,323, глюкоза - до 4,726, ампіциліну натрієва сіль - 0,005, вода очищена - 47,26 л [39]. Відбувається гомогенізація за рахунок перемішування, pH повинно становити 6,7-7,1. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ДР 3.1.2. Стерилізація розчинів термолабільних компонентів

Стерилізація відбувається шляхом автоклавування при температурі 112-115 °С і тиску 0,05 МПа впродовж 30 хв. Здійснюється технологічний контроль. Охолоджені до 37-40 °С розчини використовуються на стадіях вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування. Відпрацьовані тепло- та холодоагент відправляються на знешкодження [44].

ДР 3.2. Підготовка стерильних розчинів термостабільних компонентів

ДР 3.2.1. Приготування розчинів термостабільних компонентів

Приготування розчинів термостабільних компонентів здійснюється у реакторі з перемішуючим пристроєм при його швидкості обертання 1 с $^{-1}$. До реактора вносяться (кг): дигідрофосфат калію - 0,567, гідрофосфат калію - 0,284, сульфат магнію - 0,047, вода очищена - 47,26 л [39]. Відбувається гомогенізація за рахунок перемішування, pH повинно становити 6,7-7,1. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ДР 3.2.2. Стерилізація розчинів термостабільних компонентів

Стерилізація відбувається шляхом автоклавування при температурі 131 °С і тиску 0,15 МПа впродовж 40-60 хв. Здійснюється технологічний контроль. Охолоджені до 37-40 °С розчини використовуються на стадіях вирощування посівного матеріалу та виробничого культивування. Відпрацьовані тепло- та холодоагент відправляються на знешкодження [44].

ТП 4. Вирощування посівного матеріалу

ТП 4.1. Заповнення інокулятора поживним середовищем

Інокулятор заповнюється стерильними розчинами термолабільних і термостабільних компонентів поживного середовища. Коефіцієнт заповнення - 0,6, швидкість обертання перемішуючого пристрою - 1 с $^{-1}$. Здійснюється технологічний контроль.

ТП 4.2. Внесення до інокулятора посівної культури

До інокулятора вноситься посівна культура *E. coli* JM109/pHINS11 з лабораторії у кількості 1/10 від об'єму поживного середовища. Здійснюється технологічний контроль.

ТП 4.3. Нарощування біомаси продуцента

Посівний матеріал вирощують до оптичної густини (OD) 7-8 од (довжина хвилі - 540 нм, довжина оптичного шляху - 10 мм). Умови вирощування посівного матеріалу: pH 6,7-7,1; pO_2 25-55%, температура 36-37 °С, піногасіння - за сигналом датчика (піногасник - олеїнова кислота 0,05-3%). Аерація і режим роботи мішалки регулюються за рівнем pO_2 (режим аерації - 1,5 vvm (л/л/хв) для підтримки pO_2 на рівні 35%). Тривалість вирощування становить 4-6 год [39]. Здійснюється технологічний, хімічний, мікробіологічний контроль. Відпрацьоване повітря відправляється на знешкодження.

ТП 5. Виробниче культивування

ТП 5.1. Заповнення ферментера поживним середовищем

Ферментер об'ємом 150 л (з робочим об'ємом 100 л) заповнюється стерильними розчинами термолабільних і термостабільних компонентів поживного середовища, що в сумі становлять 90 л. Швидкість обертання перемішуючого пристрою - 1 с $^{-1}$. Здійснюється технологічний контроль.

ТП 5.2. Внесення до ферментера посівного матеріалу

До ферментера вноситься посівний матеріал у кількості 10 л. Здійснюється технологічний контроль.

ТП 5.3. Промисловий біосинтез гібридного білка

Основними параметрами промислового біосинтезу є: температура культивування 36-37 °С, pH 6,7-7,1, pO_2 25-55%, піногасіння - за сигналом датчика (піногасник - олеїнова кислота 0,05-3%). Аерація і режим роботи мішалки регулюються за рівнем pO_2 (режим аерації - 1,5 vvm (л/л/хв) для підтримки pO_2 на рівні 35%). Для індукції біосинтезу гібридного білка в середині логарифмічної фази росту культури вноситься індуктор 1-ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозид (ІПТГ). Введення ІПТГ відбувається при OD 7-9. Культивування продовжують до утворення внутрішньоклітинних включень гібридного білка (тілець включення) у 90-95% клітин (15-16 год). Експрес-контроль процесу накопичення тілець включення (ТВ) здійснюють за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Закінчення процесу культивування відбувається при утворенні ТВ у 90-95% клітин [39]. Здійснюється технологічний, хімічний, мікробіологічний контроль. Відпрацьоване повітря відправляється на знешкодження.

ТП 6. Виділення тілець включення

ТП 6.1. Концентрування культури на сепараторі

Ріст культури в ферментері зупиняють шляхом різкого зменшення інтенсивності перемішування, культуру охолоджують до 10-14 °С і концентрують на сепараторі в 8-10 разів. Здійснюється технологічний контроль.

ТП 6.2. Гомогенізація суспензії

В отриману суспензію додають трис-основний до концентрації 0,1 М, сечовину - до 1,5 М, ЕДТА - до 1 мМ. Після доведення pH до 6,8-7,0, суспензію тричі пропускають через гомогенізатор Гауліна при тиску 0,7-0,8 МПа і температурі 15-20 °С. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 6.3. Центрифугування гомогенату клітин

Гомогенат клітин пропускають через проточну центрифугу (g = 18000). Основна маса тілець включення (не менше 90%) осідає в роторі центрифуги [39]. Здійснюється технологічний контроль. Фугат відправляється на знешкодження.

ТП 7. Розчинення тілець включення і ренатурація білка

ТП 7.1. Приготування буферних розчинів

Готуються буферні розчини: буферний розчин 1 - містить трис-хлоридну кислоту (0,1 М), сечовину (8 М), pH 8,0; буферний розчин 2 - гліцин-NaOH, pH 9-11. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 7.2. Розчинення тілець включення

У реактор об'ємом 30 л, заповнений 18 л буферного розчину 1, pH = 8, завантажують 1,8 кг пасти тілець включення і вмикають перемішуючий пристрій (n = 1 $с^{-1}$). Після розчинення тілець включення в реактор додають дитіотреітол до кінцевої концентрації 10 мМ і продовжують перемішування протягом 10-12 год при 15 °С. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 7.3. Ренатурація та кислотне осадження білка

У реактор об'ємом 250 л заливають 160 л буфера 2, pH 9-11, і охолоджують його до температури 10-14 °С. Після охолодження буферного розчину в реактор подають розчин гібридного білка з відновленими дисульфідними зв'язками. Протягом 20-24 год інкубують розчин гібридного білка, перемішуючи (n = 1 $с^{-1}$) і підтримуючи температуру в реакторі 10-14 °С. Після ренатурації гібридного білка з утворенням правильно замкнутих дисульфідних зв'язків проводять кислотне осадження домішкових білків шляхом підкислення реакційного середовища в реакторі до pH 4,0-5,5 розчином хлоридної кислоти. Здійснюється технологічний та хімічний контроль. Осаджені білкові домішки відправляються на знешкодження.

ТП 7.4. Освітлення за допомогою мікрофільтрації

Через 4-5 год супернатант освітлюють на мікрофільтраційній установці. Вміст ренатурованого гібридного білка в освітленому супернатанті становить 85 г. Здійснюється технологічний контроль. Фільтруючі елементи відправляються на знешкодження. Осад відправляється на знешкодження.

ТП 8. Очистка гібридного білка

ТП 8.1. Приготування робочих розчинів

Готуються розчини: буферний розчин (Na-ацетатний буфер) - концентрацією 0,05 М, pH 4,0-5,5; розчини елюента - з градієнтом концентрацій

хлорида натрія 0,1-0,6 в Na-ацетатному буфері, що містить 1,5 М сечовину. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 8.2. Очистка ренатурованого білка на КМ-сефарозі

Правильно згорнутий гібридний білок сорбують з фільтрату на іонообмінну колонку об'ємом 5 л, заповнену КМ-сефарозою, попередньо врівноваженою буферним розчином, pH 4,0-5,5. Елюцію сорбованого білка з колонки проводять розчинами елюента. Здійснюється технологічний та хімічний контроль. Відпрацьовані розчини відправляються на знешкодження.

ТП 8.3. Об'єднання фракцій білка

Фракції, що містять гібридний білок з чистотою не менше 95% (63 г), об'єднують і використовують для подальшої роботи [39]. Здійснюється технологічний контроль методом ЗФ ВЕРХ. Залишкові фракції білка відправляються на знешкодження.

ТП 9. Гідроліз гібридного білка

ТП 9.1. Приготування робочих розчинів

Готуються розчини: розчин 1 - 1 М розчин трис-основного; розчин 2 - 10% розчин хлоридної кислоти; розчин 3 - зі співвідношенням трипсин: карбоксипептидаза В, рівному 1: 1,25. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 9.2. Гідроліз білка

Розщеплення гібридного білка трипсином і карбоксипептидазою В проводять в реакторі об'ємом 30 л з перемішуючим пристроєм. У реактор вносять 13 л розчину гібридного білка, розчин охолоджують до 4-7 °С і доводять його pH до 7,2-7,3 додаванням розчину 1. Потім в реактор вносять розчин 3 зі співвідношенням гібридний білок: трипсин: карбоксипептидаза В, рівному 2000: 1: 1,25. Реакцію гідролізу проводять протягом 10-12 годин, контролюючи методом ЗФ ВЕРХ накопичення інсуліну в гідролізаті. Реакцію розщеплення зупиняють, підкислюючи гідролізат до pH 3,2-3,6 розчином 2. У реактор додають

хлористий калій до концентрації 40 мМ. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 10. Очистка інсуліну на СП-сефарозі

ТП 10.1. Приготування робочих розчинів

Готуються розчини: буферний розчин - з концентрацією амоній ацетату 0,1 М, концентрацією сечовини 2 М, pH 3,6; розчини елюента - з градієнтом хлористого калію від 0 до 0,5 М у буферному розчині. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 10.2. Очистка інсуліну на СП-сефарозі

Отриманий розчин наносять на хроматографічну колонку об'ємом 5 л, заповнену СП-сефарозою, попередньо врівноважену буферним розчином (pH = 3,6). Промивання колонки проводять тим же буфером. Елюцію сорбованого інсуліну проводять розчинами елюента. Здійснюється технологічний та хімічний контроль. Відпрацьовані розчини відправляються на знешкодження.

ТП 10.3. Об'єднання фракцій інсуліну

Об'єднують фракції, що містять інсулін чистотою не менше 95% (13,2 г), контроль методом ЗФ ВЕРХ. Здійснюється технологічний контроль. Залишкові фракції відправляються на знешкодження.

ТП 11. Очистка інсуліну за допомогою ВЕРХ

ТП 11.1. Отримання високоочищеного інсуліну за допомогою ВЕРХ

У підготовлену колонку за допомогою насоса для подачі проби з ємності подають розчин інсуліну з попередньої стадії очистки в кількості 13,2 г. Вмикають запрограмований пристрій і ведуть розділення за програмою. Реєстрацію процесу розділення ведуть при 220 нм на проточному спектрофотометрі. Збір фракцій білка відбувається за допомогою колектора хроматографа або вручну. Здійснюється технологічний контроль.

ТП 11.2. Об'єднання фракцій інсуліну

Зібрані фракції основного піку інсуліну аналізуються на вміст домішок методом ЗФ ВЕРХ. Після очищення отримують високоочищений інсулін людини

(11,4 г) з вмістом основної речовини 98% [39]. Здійснюється технологічний контроль. Залишкові фракції відправляються на знешкодження.

ТП 12. Кристалізація та перекристалізація

ТП 12.1. Кристалізація інсуліну

Інсулін осаджують у вигляді кристалів розчином цинку ацетату при pH 6,2, n = 1 с $^{-1}$ з отриманням цинк-інсуліну. Здійснюється технологічний та хімічний контроль. Відпрацьований розчин відправляється на знешкодження.

ТП 12.2. Перекристалізація цинк-інсуліну

Цинк-інсулін розчиняють у воді, підкисленій кислотою лимонною до значення pH 2,8. Розчин змішують з ацетоном, додають цинку хлорид і фенол, охолоджують до температури 0 °С. Для повільної кристалізації інсуліну створюють умови з послідовною поступовою зміною pH розчину. Розчин підлужують до значення pH 8,5; залишають на 2-3 хв, потім створюють значення pH 6,8, перемішують 1 год; при значенні pH 6,5 перемішують 2 год; при значенні pH 6,2 і 6,0 перемішують 2 год і відстоюють 20 год; при значенні pH 5,8 перемішують 2 год і відстоюють 48 год при температурі 5 °С [45]. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 12.3. Відділення кристалів центрифугуванням

Кристали інсуліну, що випали, відокремлюють центрифугуванням протягом 30 хв, g = 18000, та промивають водою очищеною. Здійснюється технологічний контроль. Фугат відправляється на знешкодження.

ТП 13. Сушіння кристалів

Кристали інсуліну висушують ліофільно. Спочатку кристали заморожують при -40 °С, потім висушують в глибокому вакуумі (10 Па) при 25-30 °С до 30 год. Здійснюється технологічний контроль.

ТП 14. Приготування розчину інсуліну

В реактор з механічним перемішуючим пристроєм (n = 1 с $^{-1}$) при температурі 20-25 °С завантажують висушені кристали інсуліну (10,3 г) цинку хлорид (0,02 г), гліцерин (45,1 г), метакрезол (8,5 г) та воду для ін’єкцій (2,9134

л). Натрію гідроксид та кислота хлористоводнева можуть бути додані для регулювання pH до 7,4. Здійснюється технологічний та хімічний контроль.

ТП 15. Фільтрування розчину інсуліну

ТП 15.1. Механічна фільтрація

Механічна фільтрація застосовується для очищення розчину від часток розміром більше 80 мкм. Здійснюється технологічний контроль. Фільтрувальні елементи відправляються на знешкодження.

ТП 15.2. Стерилізуюча фільтрація

Стерилізуюча фільтрація застосовується для очищення розчину від часток розміром більше 0,22 мкм. Здійснюється технологічний та мікробіологічний контроль. Фільтрувальні елементи відправляються на знешкодження.

ТП 16. Заповнення картриджів

ТП 16.1. Наповнення картриджів розчином інсуліну

Скляні картриджі на 3 мл заповнюють розчином інсуліну. Здійснюється технологічний контроль.

ТП 16.2. Контроль герметичності картриджів

Герметичність картриджів перевіряється за допомогою їх занурення у забарвлений метиленовим синім (0,0005%) розчин - картриджі, всередину яких проникла забарвлена рідина, відбраковують. Здійснюється технологічний контроль. Некондиційна продукція відправляється на знешкодження.

ПМВ 17. Пакування та маркування продукту

ПМВ 17.1. Маркування картриджів

Маркування здійснюється штампуванням на картриджі напису з інформацією про продукт з використанням фарби зі складу. Здійснюється технологічний контроль.

ПМВ 17.2. Упаковка картриджів в картонні коробки

Картриджі упаковують в картонні коробки зі складу, по 5 картриджів в одній коробці. До кожної коробки вкладається інструкція. Здійснюється технологічний контроль.

ПВ 18. Переробка відходів

Змінні фільтрувальні елементи (патрони, мембрани, тканини) піддаються регенерації. Для регенерації використовується нагрівання (до 80 °С) та дезінфікуючі розчини (може бути використано розчин каустичної соди 20-30%).

ЗВ 19. Знешкодження відходів та викидів

Рідкі викиди нейтралізуються в збірниках для нейтралізації і зливаються в міську каналізацію; відпрацьоване повітря знешкоджується (з використанням рукавного фільтра, циклона, скрубера) і вивільняється в атмосферу; тверді відходи, в тому числі некондиційна продукція, по необхідності знешкоджуються і направляються на централізоване сміттєзвалище.

4.4. Матеріальний баланс

Матеріальний баланс складено на серію готової продукції - 168 картонних коробок, кожна з яких містить по 5 картриджів на 3 мл з розчином рекомбінантного інсуліну.

МО (міжнародна одиниця) людського інсуліну еквівалентна 0,0347 мг (0,0000347 г) чистого людського інсуліну. 1 мл розчину для ін’єкцій містить 100 МО інсуліну. 1 картридж на 3 мл містить 300 МО - 0,01041 г інсуліну.

Таблиця 4.2. Матеріальний баланс виробництва.

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	шт	л		кг	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ДР 3.1							
Гідролізат казеїна	2,836			Розчин поживного середовища			99,1
Екстракт пекарських дріжджів	1,323			Втрати (5%)			5,208
Глюкоза	4,726						
Ампіциліну натрієва сіль	0,005						

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8
Дигідрофосфат калію	0,567						
Гідрофосфат калію	0,284						
Сульфат магнію	0,047						
Вода очищена			94,52				
Всього:	104,308			**Всього:**	104,308		
Стадія ТП 4.3							
Поживне середовище			9,1	Посівний матеріал			10
Посівна культура			0,905	Втрати посівного матеріалу (5%)			0.005
Повітря аераційне (1,5 л/л/хв, 5 год)			4502,25	Відпрацьоване повітря			4502,25
Всього:	4512,255			**Всього:**	4512,255		
Стадія ТП 5.3							
Поживне середовище:				Культуральна рідина			94,1
Гідролізат казеїна	2,439			Відбір проб			0,9
Екстракт пекарських дріжджів	1,138			Втрати культуральної рідини (5%)			5
Глюкоза	4,064			Відпрацьоване повітря			135000
Ампіциліну натрієва сіль	0,004						
Дигідрофосфат калію	0,488						
Гідрофосфат калію	0,244						
Сульфат магнію	0,040						
Вода очищена			81,29				
Посівний матеріал			10				
Повітря аераційне (1,5 л/л/хв, 15 год)			135000				
Всього:	135100			**Всього:**	135100		
Стадії ТП 6.1-6.3							
Культуральна рідина			94,1	Осад ТВ	1,8		
				Фугат			92,3
Всього:	94,1			**Всього:**	94,1		
Стадії ТП 7.1-7.4							
Осад ТВ	1,8			Гібридний білок	0,085		
Буфер 1			18	Фільтрат та осад			179,715

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8
Буфер 2			160				
Всього:	179,8			**Всього:**	179,8		
Стадії ТП 8.1-8.3							
Гібридний білок	0,085			Очищений гібридний білок	0,063		
				Відходи та втрати	0,022		
Всього:	0,085			**Всього:**	0,085		
Стадії ТП 9, 10							
Очищений гібридний білок	0,063			Очищений інсулін	0,0132		
Трипсин	0,00003			Відходи та втрати	0,04987		
Карбоксипептидаза В	0,00004						
Всього:	0,06307			**Всього:**	0,06307		
Стадії ТП 11.1, 11.2							
Очищений інсулін	0,0132			Високоочищений інсулін	0,0114		
				Відходи та втрати	0,0018		
Всього:	0,0132			**Всього:**	0,0132		
Стадії ТП 12, 13							
Високоочищений інсулін	0,0114			Високоочищений інсулін	0,0103		
				Втрати (10%)	0,0011		
Всього:	0,0114			**Всього:**	0,0114		
Стадія ТП 14							
Високоочищений інсулін	0,0103			Розчин інсуліну			2,819
Хлорид цинку	0,00002			Втрати розчину (5%)			0,148
Гліцерин	0,0451			Всокоочищений інсулін	0,0098		
Метакрезол	0,0085			Втрати інсуліну (5%)	0,0005		
Вода для ін’єкцій			2,9134				
Всього:	2,9773			**Всього:**	2,9773		
Стадії ТП 15.1, 15.2							
Розчин інсуліну			2,819	Стерильний розчин інсуліну			2,678

Продовження таблиці 4.2.

1	2	3	4	5	6	7	8
Всокоочищений інсулін	0,0098			Втрати розчину (5%)			0,141
				Всокоочищений інсулін	0,0093		
				Втрати інсуліну (5%)	0,0005		
Всього:	2,8288			**Всього:**	2,8288		
Стадії ТП 16.1, 16.2							
Стерильний розчин інсуліну			2,678	Стерильний розчин інсуліну у картриджах		848	2,544
				Втрати розчину (5%)			0,134
Всокоочищений інсулін	0,0093			Всокоочищений інсулін	0,0088		
Скляні картриджі		848		Втрати інсуліну (5%)	0,0005		
Всього:	850,6873			**Всього:**	850,6873		
Стадії ПМВ 17.1, 17.2							
Стерильний розчин інсуліну у картриджах		848	2,544	Стерильний розчин інсуліну у картриджах		840	2,544
Інструкції		168		Інструкції всередині картонних коробок		168	
Картонні коробки		168		Картонні коробки з картриджами та інструкціями		168	
				Втрати картриджів		8	
Всього:	1186,544			**Всього:**	1186,544		

4.5. Контроль виробництва

Таблиця 4.3. Перелік контрольних точок.

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.2.1. Приготування миючих розчинів	Миючий розчин, кількість миючого розчину	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	С = 2-5%

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
Кт1.2.1.1.				
ДР 1.2.2. Приготування дезінфікуючих розчинів Кт1.2.2.1.	Дезінфікуючі розчини, кількість розчину	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	$С_{щод}$ = 1-2% $С_{ген}$ = 5-6%
ДР 1.3.1. Щоденне прибирання Км1.3.1.1.	Об'єкти в приміщенні, кількість мікроорганізмів	Аналіз змиву з поверхонь, аналіз кількості КУО в повітрі	Кожну операцію	Кількість КУО/м^3 повітря відповідно класу чистоти: A < 1, B < 10, C < 100, D < 200
ДР 1.3.2. Генеральне прибирання Км1.3.2.1.	Об'єкти в приміщенні, кількість мікроорганізмів	Аналіз змиву з поверхонь, аналіз кількості КУО в повітрі	Кожну операцію	Кількість КУО/м^3 повітря відповідно класу чистоти: A < 1, B < 10, C < 100, D < 200
ДР 1.4.1. Миття обладнання і комунікацій Кт1.4.1.1. Кх1.4.1.2.	Режим миття обладнання та комунікацій, pH	Годинник, pH-метр, візуально	Кожну операцію безперервно	pH = 6,5-7,5; 1-1,5 год
ДР 1.4.2. Перевірка обладнання на герметичність Кт1.4.2.1.	Герметичність обладнання	Годинник, манометр, візуально	Кожну операцію безперервно	Сталість показів манометра, 30 хв
ДР 1.4.3. Стерилізація обладнання і комунікацій Кт1.4.3.1.	Обладнання та комунікації, ефективність стерилізації	Манометр, термометр, годинник, візуально	Кожну операцію безперервно	0,2-0,25 МПа, 120-128 °С, 1 год
ДР 2.1. Забір повітря з атмосфери Кт2.1.1.	Відсутність перешкод для забору повітря	Візуально	Кожну операцію	Безперешкодний забір повітря
ДР 2.2. Механічна очистка повітря Кт2.2.1.	Ефективність очистки повітря	Манометр для вимірювання тиску до і після фільтра	Кожну операцію безперервно	Е = 50-60%
ДР 2.3. Стиснення повітря Кт2.3.1.	Ступінь стиснення повітря, температура	Манометр, термометр, візуально	Кожну операцію безперервно	0,2 МПа, 120 °С
ДР 2.4. Стабілізація параметрів повітря Кт2.4.1.	Параметри повітря	Термометр, психрометр	Кожну операцію безперервно	температура 37-40 °С, вологість 40-60%
ДР 2.5. Очистка повітря на головному фільтрі Кт2.5.1.	Ефективність очистки повітря	Манометр для вимірювання тиску до і після фільтра	Кожну операцію безперервно	Е = 98-99%
ДР 2.6. Очистка повітря на індивідуальному фільтрі Кт2.6.1.	Ефективність очистки повітря	Манометр для вимірювання тиску до і після фільтра	Кожну операцію безперервно	Е = 99,9999%
ДР 3.1.1.	Термолабільні	Ваги, мірний	Кожну	pH = 6,7-7,1, маса

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
Приготування розчинів термолабільних компонентів Кт3.1.1.1. Кх3.1.1.2.	компоненти, кількість термолабільних компонентів, pH	посуд, візуально	операцію	окремих компонентів
ДР 3.1.2. Стерилізація розчинів термолабільних компонентів Кт3.1.2.1.	Ефективність стерилізації термолабільних компонентів	Термометр, манометр, годинник	Кожну операцію безперервно	112-115 °С, 0,05 МПа, 30 хв
ДР 3.2.1. Приготування розчинів термостабільних компонентів Кт3.2.1.1. Кх3.2.1.2.	Термостабільні компоненти, кількість термостабільних компонентів, pH	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	pH = 6,7-7,1, маса окремих компонентів
ДР 3.2.2. Стерилізація розчинів термостабільних компонентів Кт3.2.2.1.	Ефективність стерилізації термостабільних компонентів	Термометр, манометр, годинник	Кожну операцію безперервно	131 °С, 0,15 МПа, 40-60 хв
ТП 4.1. Заповнення інокулятора поживним середовищем Кт4.1.1.	Ступінь заповнення інокулятора поживним середовищем	Вимірювання об'єму розчинів поживного середовища	Кожну операцію	Кз = 0,6
ТП 4.2. Внесення до інокулятора посівної культури Кт4.2.1.	Ступінь заповнення інокулятора посівною культурою	Вимірювання об'єму посівної культури, що вноситься	Кожну операцію	Посівна культура у кількості 1/10 від об'єму поживного середовища
ТП 4.3. Нарощування біомаси продуцента Кт4.3.1. Кх4.3.2. Км4.3.3.	Режим нарощування біомаси, кількість біомаси	Вимірювання оптичної густини, температури, pH, pO_2, часу вирощування	Кожну операцію безперервно	OD = 7-8 од, pH 6,7-7,1, pO2 25-55%, 36-37 °С, 4-6 год
ТП 5.1. Заповнення ферментера поживним середовищем Кт5.1.1.	Ступінь заповнення ферментера поживним середовищем	Вимірювання об'єму розчинів поживного середовища	Кожну операцію	90 л
ТП 5.2. Внесення до ферментера посівного матеріалу Кт5.2.1.	Ступінь заповнення ферментера посівним матеріалом	Вимірювання об'єму посівного матеріалу, що вноситься	Кожну операцію	10 л
ТП 5.3. Промисловий біосинтез гібридного білка	Режим культивування, накопичення ТВ	Вимірювання оптичної густини,	Кожну операцію безперервно	OD = 7-9 од, pH 6,7-7,1, pO2 25-55%,

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
Кт5.3.1. Кх5.3.2. Км5.3.3.		температури, pH, pO_2, накопичення ТВ		36-37 °С, накопичення ТВ у 90-95% клітин
ТП 6.1. Концентрування культури на сеператорі Кт6.1.1.	Температура, кратність концентрування	Вимірювання температури та концентрації культуральної рідини	Кожну операцію безперервно	0-14 °С, С = 8-10х
ТП 6.2. Гомогенізація суспензії Кт6.2.1. Кх6.2.2.	Режим утворення гомогенату	Вимірювання тепмератури, тиску, pH, концентрації речовин	Кожну операцію безперервно	Трис-основний - до 0,1 М, сечовина - до 1,5 М, ЕДТА - до 1 мМ; pH 6,8-7,0; 0,8 МПа; 15-20 °С
ТП 6.3. Центрифугування гомогенату клітин Кт6.3.1.	Режим центрифугування, гравітаційна сила	Контроль режиму роботи центрифуги	Кожну операцію безперервно	g = 18000
ТП 7.1. Приготування буферних розчинів Кт7.1.1. Кх7.1.2.	Буферні розчини 1 і 2, кількість буферних розчинів, pH	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	Буфер 1: $C_{ТХ}$ = 0,1 М, $C_{сечовини}$ = 8 М, pH = 8,0. Буфер 2: pH $_{гліцин-кауст.сода}$ = 9-11
ТП 7.2. Розчинення тілець включення Кт7.2.1. Кх7.2.2.	Режим розчинення, концентрації речовин, pH	термометр, pH-метр, годинник, вимірювання концентрацій речовин	Кожну операцію безперервно	pH = 8, $C_{дитіотреітола}$ = 10 мМ, 15 °С, 10-12 год
ТП 7.3. Ренатурація та кислотне осадження білка Кт7.3.1. Кх7.3.2.	Режим ренатурації та осадження, pH	Термометр, годинник, pH-метр	Кожну операцію безперервно	10-14 °С, 20-24 год, pH = 4,0-4,5
ТП 7.4. Освітлення за допомогою мікрофільтрації Кт7.4.1.	Режим фільтрації	Годинник, манометр для вимірювання тиску до і після фільтра	Кожну операцію безперервно	4-5 год, незмінність показів манометра
ТП 8.1. Приготування робочих розчинів Кт8.1.1. Кх8.1.2.	Буферний розчин та розчин елюента, кількість розчинів, pH	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	Буфер: С = 0,05 М, pH = 4,0-5,5. Елюент: $C_{хлорида\ натрія}$ = 0,1-0,6 М, $C_{буф}$ = 0,05 М, $C_{сечовини}$ = 1,5 М
ТП 8.2. Очистка ренатурованого білка на КМ-сефарозі Кт8.2.1.	Режим хроматографічної очистки, pH	Визначення pH, об'єму речовин	Кожну операцію безперервно	pH = 4,0-5,5

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
Кх8.2.2.				
ТП 8.3. Об'єднання фракцій білка Кт8.3.1.	Чистота білку у фракції	Метод ЗФ ВЕРХ	Кожну операцію	$C_{гібр.\ білка} > 95\%$
ТП 9.1. Приготування робочих розчинів Кт9.1.1. Кх9.1.2.	Розчини 1, 2 та 3, кількість розчинів, pH	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	Розчин 1: $C_{ТО} = 1$ М. Розчин 2: $C_{хлоридної\ к\text{-}ти} = 10\%$. Розчин 3: співвід. трипсин : карбоксипеп-тидаза В-1 : 1,25
ТП 9.2. Гідроліз білка Кт9.2.1. Кх9.2.2.	Режим гідролізу, pH	Контроль накопичення інсуліну в гідролізаті методом ЗФ ВЕРХ, вимірювання pH	Кожну операцію безперервно	pH = 3,2-3,6, 10-12 год, $C_{хлор.\ калію} = 40$ мМ
ТП 10.1. Приготування робочих розчинів Кт10.1.1. Кх10.1.2.	Буферний розчин та розчин елюента, кількість розчинів, pH	Ваги, мірний посуд, візуально	Кожну операцію	Буфер: $C_{сечовини} = 2$ М, $C_{ацетату\ амонія} = 0{,}1$ М, pH = 3,6. Елюент: $C_{хлорида\ калія}$ = 0-0,5 М
ТП 10.2. Очистка інсуліну на СП-сефарозі Кт10.2.1. Кх10.2.2.	Режим хроматографічної очистки, pH	Визначення pH, об'єму речовин	Кожну операцію безперервно	pH = 3,6
ТП 10.3. Об'єднання фракцій інсуліну Кт10.3.1.	Чистота білку у фракції	Метод ЗФ ВЕРХ	Кожну операцію	$C_{інсуліну} > 95\%$
ТП 11.1. Отримання високоочищеного інсуліну за допомогою ВЕРХ Кт11.1.1.	Режим хроматографічної очистки	Контроль режим роботи пристрою, проточний спектрофо-тометр	Кожну операцію	$\lambda = 220$ нм
ТП 11.2. Об'єднання фракцій інсуліну Кт11.2.1.	Чистота білку у фракції	Метод ЗФ ВЕРХ	Кожну операцію	$C_{інсуліну} > 98\%$
ТП 12.1. Кристалізація інсуліну Кт12.1.1. Кх12.1.2.	Режим кристалізації, pH	Вимірювання pH, об'ємів розчинів	Кожну операцію безперервно	pH = 6,2
ТП 12.2. Перекристалізація цинк-інсуліну Кт12.2.1. Кх12.2.2.	Режим перекристалізації, градієнт pH, час перекристалізації	Вимірювання градієнту pH, часу, температури	Кожну операцію безперервно	Градієнт pH: 8,5-6,8-6,5-6,2-6,0-5,8; 5°С
ТП 12.3. Відділення	Режим	Контроль	Кожну	g = 18000,

Продовження таблиці 4.3.

1	2	3	4	5
кристалів центрифугуванням Кт12.3.1.	центрифугування, гравітаційна сила	режиму роботи центрифуги	операцію безперервно	30 хв
ТП 13. Сушіння кристалів Кт13.1.	Режим сушіння	Термометр, манометр, годинник	Кожну операцію безперервно	$T_{охол.}$ = - 40 °С, $T_{висуш.}$ = 25-30 °С, р = 10 Па
ТП 14. Приготування розчину інсуліну Кт14.1. Кх14.2.	Розчин інсуліну, компонентний склад розчину, температура, pH	Ваги, мірний посуд, термометр, візуально	Кожну операцію	pH = 7,4, 20-25 °С, маса окремих компонентів
ТП 15.1. Механічна фільтрація Кт15.1.1. Км15.1.2.	Ефективність фільтрації, кількість мікроорганізмів	Висів розчину на чашки Петрі	Кожну операцію	Кількість КУО: не більше 300 на 1 г чистого інсуліну
ТП 15.2. Стерилізуюча фільтрація Кт15.2.1. Км15.2.2.	Ефективність фільтрації, кількість мікроорганізмів	Висів розчину на чашки Петрі	Кожну операцію	Кількість КУО: не більше 300 на 1 г чистого інсуліну
ТП 16.1. Наповнення картриджів розчином інсуліну Кт16.1.1.	Картриджі з розчином інсуліну, об'єм розчину	Вимірювання об'єму розчину, що вноситься до картриджа	Кожну операцію	V = 3 мл
ТП 16.2. Контроль герметичності картриджів Кт16.2.1.	Герметичність картриджів	Занурення у забарвлений метиленовим синім (0,0005%) розчин, візуально	Кожну операцію	Картриджі, в які проникла забарвлена рідина, вважаються некондиційною продукцією
ПМВ 17.1. Маркування картриджів Кт17.1.1.	Картриджі з нанесеним маркуванням	Візуально	Кожну операцію	Маркування: назва препарату, діюча речовина та її кількість в МО, дата виготовлення, термін придатності, серія, виробник
ПМВ 17.2. Упаковка картриджів в картонні коробки Кт17.2.1.	Картриджі, упаковані в картонні коробки	Візуально	Кожну операцію	5 картриджів в 1 коробці. Маркування: назва, склад, кількість діючої речовини, кількість картриджів в упаковці, реєстраційний номер, дата виготовлення, термін придатності, серія, умови зберігання, виробник та адреса виробництва

4.6. Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах, створена за допомогою програми КОМПАС-3D, подана на кресленні формату А1 - ДП 6115. 01.000 ТК.

Висновки до розділу 4:

Наведено характеристику кінцевої продукції виробництва - рекомбінантного людського інсуліну короткої дії у картриджах по 3 мл (100 МО/мл). Наведено перелік основної, допоміжної сировини, матеріалів та напівпродуктів виробництва із зазначенням показників якості, обов'язкових для перевірки.

Було складено технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну з використанням *E. coli* JM109/pHINS11 як промислового продуцента, наведено опис технологічного процесу за стадіями. Було складено матеріальний баланс на серію готової продукції - 168 картонних коробок, кожна з яких містить по 5 картриджів на 3 мл з розчином рекомбінантного інсуліну. Наведено перелік контрольних точок, що забезпечують виконання технологічного режиму.

З метою розрахунку обладнання для проведення технологічного процесу на дільниці біосинтезу, до наступного розділу поставлено такі задачі:

- обґрунтувати вибрану конструкцію ферментеру, провести технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки;

- вибрати загальнозаводське обладнання для технологічного процесу.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

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

Основними вимогами до ферментера є забезпечення в культуральній рідині заданої концентрації розчиненого кисню, відведення вуглекислого газу, створення однорідної концентрації компонентів культуральної рідини.

Вихідними даними для вибору ферментера є вимоги технології біосинтезу цільового продукту [46].

Існують особливості процесу ферментації, що впливають на підбір обладнання:

- чутливість біологічних агентів до фізико-механічних впливів, що виникають в біореакторах при аерації і перемішуванні;
- необхідність одночасної реалізації процесів масопередачі в двох (рідина-клітини популяції), трьох- (газ-рідина-клітини) і чотирьохфазних (газ-рідина-клітини-нерозчинний/слаборозчинний субстрат) системах;
- швидкість росту культур;
- необхідність забезпечення відсутності контамінації монокультур;
- використання повітря в якості єдиного економічно прийнятного джерела кисню;
- утворення піни і пов’язана з цим негомогенність;
- багатокомпонентність ПС;
- складність біохімічних механізмів регуляції росту і біосинтезу;
- нестабільність цільових продуктів, термолабільність.

До біореакторів для культивування рекомбінантних культур, зокрема *E. coli* JM109/pHINS11, що використовується в технології, яка

описана в даному проекті, висуваються спеціальні вимоги. При використанні генетично модифікованих мікроорганізмів на перший план висуваються такі показники, як стабільність модифікацій біологічних агентів, підвищені вимоги до асептики і т. п [47].

Ферментери для глибинного культивування поділяють на ряд груп за певними ознаками.

За способом культивування ферментери поділяють на апарати безперервної та періодичної дії. Апарати безперервної дії використовуються в окремих випадках - при культивуванні дріжджів, біосинтезі оцтової кислоти, вирощуванні мікроорганізмів з метою переробки відходів. При біосинтезі в фармацевтичній промисловості використовуються ферментери періодичної дії.

За стерильністю ферментери поділяють на герметичні і ті, що не вимагають суворої герметичності [48]. При біосинтезі гібридного білка для отримання з нього інсуліну як продукту фармацевтичної промисловості необхідне забезпечення асептичних умов проведення процесу [46]. Асептичність процесу забезпечується шляхом стерилізації ферментера, трубопроводів і датчиків КВП; подачі стерильного ПС і чистої посівної культури, стерильного повітря для аерації культури і стерильного піногасника; установки датчиків для контролю і регулювання параметрів процесу; підтримки стерильного повітряного або парового захисту потовщення вала перемішуючого пристрою, технологічних трубопроводів і арматури протягом усього процесу культивування.

За способом введення енергії та організації перемішування і аерації ферментери поділяють на апарати з підведенням енергії до газової фази, до рідкої фази і комбіновані [48]. До апаратів з комбінованим підведенням енергії відносяться барботажні ферментери з механічними перемішуючими пристроями. Дані ферментери застосовуються в фармацевтичній та мікробіологічній промисловості. Вони використовуються для роботи в асептичних умовах, розраховані на тиск до 3 МПа, мають коефіцієнт

заповнення 0,5-0,7. Так як даний апарат задовольняє умови біосинтезу гібридного білка з подальшим отриманням інсуліну, в технології, описаній в дипломному проекті, використовується апарат такого типу [46].

При використанні перемішування для інтенсифікації хімічних, теплових і дифузійних процесів в гетерогенних системах створюються кращі умови для підведення, речовини в зону реакції, до межі розділу фаз або до поверхні теплообміну. Збільшення ступеня турбулентності системи, що досягається при перемішуванні, призводить до зменшення товщини пристінкового шару, збільшення і безперервного оновлення поверхні взаємодіючих фаз. Це викликає значне прискорення процесів тепло- і масообміну.

Найбільшого поширення в біотехнологічній та хімічній промисловості отримало перемішування з введенням в середовище механічної енергії із зовнішнього джерела.

Механічні перемішуючі пристрої складаються з власне мішалки, валу і приводу. Мішалка є робочим елементом пристрою, що закріплюється на валу. Привід може бути здійснений або безпосередньо від електродвигуна (для швидкохідних мішалок), або через редуктор чи клиноремінну передачу.

За будовою лопатей розрізняють мішалки лопатеві, пропелерні, турбінні та спеціальні.

Мішалки лопатевого типу. Дані пристрої складаються з двох або більшої кількості лопатей прямокутного перерізу, закріплених на валу. До лопатевих мішалок відносяться також і деякі мішалки спеціального призначення: якірні, рамні і листові. Основні переваги лопатевих мешалок - простота пристрою і невисока вартість виготовлення. До недоліків відноситься низька насосна дія мішалки (слабкий осьовий потік), що не забезпечує повного перемішування у всьому об’ємі апарата.

Пропелерні мішалки. Робочою частиною пропелерної мішалки є пропелерний пристрій з декількома лопатями, вигнутими за профілем гребного гвинта. До переваг пропелерних мішалок слід віднести відносно високу

швидкість обертання і можливість безпосереднього приєднання мішалки до електродвигуна, що призводить до зменшення механічних втрат.

Турбінні мішалки. Дані мішалки мають форму коліс водяних турбін з плоскими, похилими або криволінійними лопатями, закріпленими на вертикальному валу. В апаратах з турбінними мішалками створюються переважно радіальні потоки рідини. Закриті турбінні мішалки на відміну від відкритих створюють більш чітко виражений радіальний потік.

Турбінні мішалки забезпечують інтенсивне перемішування у всьому об'ємі апарата. Потужність, що споживається турбінними мішалками, які працюють в апаратах з відбивними перегородками, при турбулентному режимі перемішування практично не залежить від в'язкості середовища, тому мішалки цього типу можуть застосовуватися для сумішей, в'язкість яких під час перемішування змінюється. Враховуючи переваги даного типу мішалок, турбінну мішалку обрано для використання в технології даного проекту [49].

Виходячи з вищенаведених переваг, в технології даного проекту обрано герметичний ферментер для глибинного культивування періодичної дії з комбінованим підведенням енергії - ферментер з механічним перемішуючим пристроєм (з турбінною мішалкою) та барботером. Апарат забезпечений гладкою приварною сорочкою для теплоносія.

Середовище в ферментері є неагресивним та невибухонебезпечним, температура культивування становить 36-37 °С, pH 6,7-7,1. Дезінфекція здійснюється розчином каустичної соди, стерилізація - насиченою водяною парою. Як матеріал для виготовлення конструкції обрано сталь 12Х18Н10Т, що відповідає умовам проведення процесів в апараті та характеристикам середовища.

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Технічна характеристика ферментера з механічним перемішуванням барботажного типу

Апарат призначено для виробничого культивування в процесі виробництва рекомбінантного інсуліну людини.

1. Номінальний об’єм	0,16 $м^3$
2. Робочий об’єм	0,1 $м^3$
3. Тиск	
в апараті	0,1 МПа
в сорочці	0,3 МПа
4. Температура	
середовища	37°С
середня теплоносія	10°С
5. Тип перемішуючого пристрою	турбінна відкрита мішалка
6. Частота обертання валу мішалки	4,9 $с^{-1}$
7. Потужність електродвигуна	0,37 кВт
8. Габаритні розміри	
ширина	768 мм
висота	1156 мм
довжина	768 мм

Розрахунок ферментера складається з конструктивного розрахунку, розрахунку потужності, яка витрачається при перемішуванні, теплового розрахунку, розрахунку процесів масопереносу в ферментері. Гідравлічний розрахунок необхідний для визначення потужності насосу для подачі теплоносія в сорочку.

Конструктивний розрахунок має на меті визначення розмірів ферментера і його основних конструктивних елементів (мішалки, барботера, сорочки).

Об'єм виробництва препарату на серію готової продукції - $2{,}544 \cdot 10^{-3}$ м^3. Дана кількість препарату відповідає 0,0941 м^3 культуральної рідини. Враховуючи втрати КР 5,09%, робочий об'єм ферментера V_p = 0,1 м^3. Час культивування τ_p=15 год = 54000 с.

Продуктивність ферментера:

$$Q = \frac{V_p}{\tau_p} = \frac{0{,}1}{54000} = 1{,}852 \cdot 10^{-6} \text{ м}^3/\text{с}.$$

Конструктивний розрахунок виконують, виходячи з робочого об'єму ферментера.

У виробництві, яке проектується, коефіцієнт заповнення $K_з$ = 0,67, робочий об'єм V_p = 0,1 м^3.

$$V_н = \frac{V_p}{K_з} = \frac{0{,}1}{0{,}67} = 0{,}15.$$

Номінальний об'єм ферментера $V_н$ = 0,15 м^3. Це не стандартний розмір, тому необхідно округлити його до найближчого стандартного - 0,16 м^3 [50].

Згідно з таблицею стандартних розмірів, визначаємо діаметр апарату: D = 600 мм. Висота апарату разом з еліптичними днищем та кришкою L = 670 мм, висота циліндричної частини апарату (без днища і кришки, приблизно дорівнює висоті сорочки) l = 370 мм [51].

Ескіз еліптичного днища апарату зображено на рис. 5.1.

$D_в$ = 600 мм, h_1 = 25 мм, $h_в$ = 150 мм, s = 10 мм [53].

Висота рівня рідини апарату $H_р$ = 0,4 м [50].

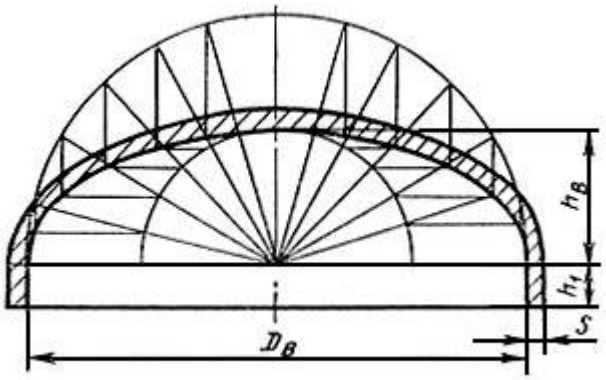

Рисунок 5.1. Еліптичне днище апарату [53].

Розрахунок перемішуючого пристрою:

За таблицею, діаметр валу мішалки - $d_в$ = 40 мм.

$$d_м = (0{,}2…0{,}3)\ D = (0{,}2…0{,}3)\ 600 = 120…180.$$

Округлюємо до стандартного діаметру $d_м$ = 160.

Ескіз турбінної мішалки відкритого типу, яку обрано для використання в даному проекті, враховуючи її параметри та умови роботи [50], зображено на рис. 5.2.

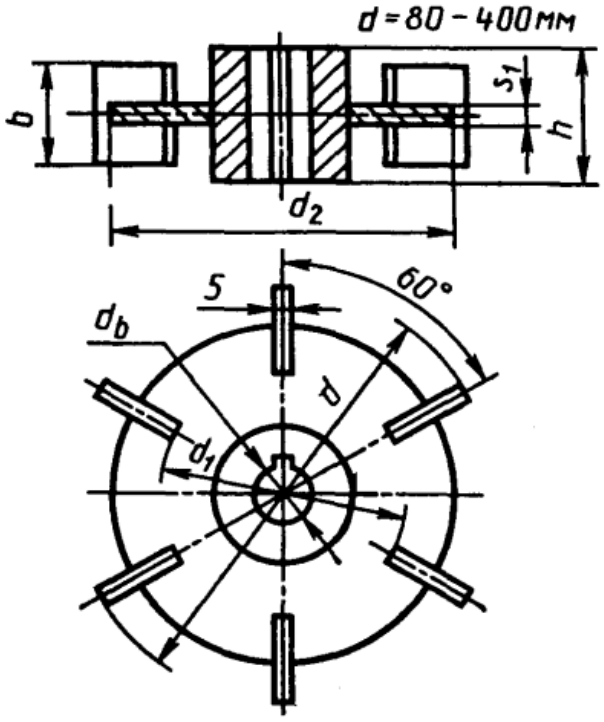

Рисунок 5.2. Турбінна мішалка відкритого типу [52].

$d_1 = 0{,}5 \cdot d_м = 0{,}5 \cdot 160 = 80$ мм,

$d_2 = 0{,}75 \cdot d_м = 0{,}75 \cdot 160 = 120$ мм,

$s_1 = s = 5$ мм,

$b = 0{,}2 \cdot d_м = 0{,}2 \cdot 160 = 32$ мм [52].

Ширина лопаті мішалки $l_л = 0{,}25 \cdot d_м = 0{,}25 \cdot 160 = 40$ мм.

Розрахунок газорозподільчого пристрою:

Розміщення мішалки та барботеру показано на рис. 5.3.

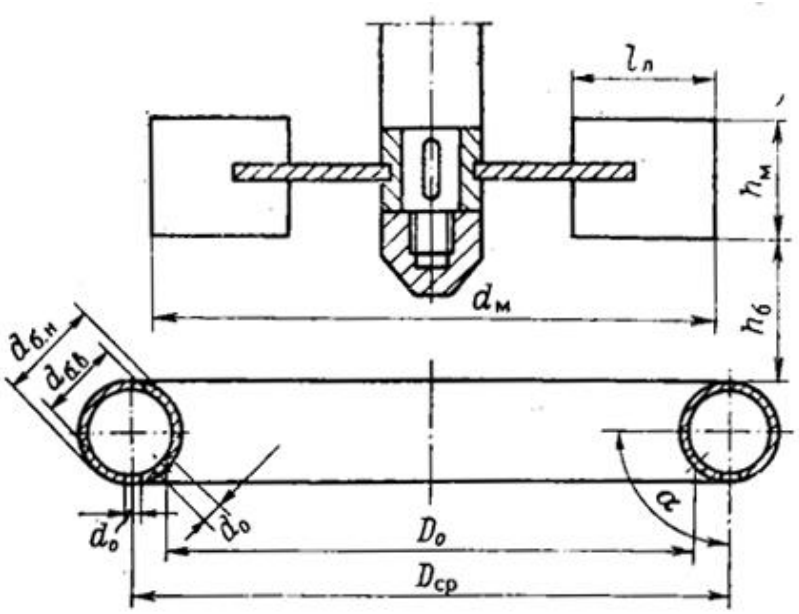

Рисунок 5.3. Розміщення мішалки та барботеру в реакторі [50].

Для вибору розмірів барботера використано наступні співвідношення:

$h_б = 0{,}25 \cdot d_м = 0{,}25 \cdot 160 = 40$ мм;

$D_{ср} = 6d_{б.н}$;

$D_0 = 0{,}5 \cdot d_м = 0{,}5 \cdot 160 = 80$ мм;

$d_0 = 4$ мм.

Внутрішній діаметр труби барботера $d_{б.в}$ розраховується при швидкості газу в ній $\omega_б = 25$ м/с [50].

Витрати газової фази задаються технологічним регламентом і визначаються потребою біосинтезу. Для даного технологічного процесу $V_г$ = 1,5 vvm = 1,5 л/л/хв = (1,5·100) / (60·1000) = 0,0025 м^3/с.

$$d_{б.в.} = \sqrt{\frac{V_г}{0,785 \cdot \omega_б}} = \sqrt{\frac{0,0025}{0,785 \cdot 25}} = 0,0113 \text{ м.}$$

Уточнюємо внутрішній і зовнішній діаметри труби за стандартними розмірами:

$d_{б.в}$ = 12 мм;

$d_{б.н}$ = 14 мм [54];

$D_{ср}$ = 6·14 = 84 мм.

Швидкість газу в отворах барботера:

$$\omega_0 = 3,4\sqrt{d_{б.в.}\rho_р / \rho_г} = 3,4\sqrt{0,012 \cdot 1060 / 1,128} = 11,42 \text{ м}^3\text{/с.}$$

Визначення потужності, що витрачається на перемішування. В залежності від діаметру і інтенсивності обертання мішалки, в ферментері будуть різні режими диспергування повітря.

Газорідинну суміш характеризує газовміст φ. Для апаратів з барботером:

$$\varphi = \left(\frac{W_г \rho_г}{U_б}\right) + 2,16 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{\varepsilon_м^{0,4} \cdot \rho_р^{0,2}}{\sigma_р^{0,6}} \left(\frac{W_г}{U_б}\right)^{0,5},$$

де $W_г$ - приведена швидкість газу в апараті:

$$W_г = \frac{4V_г}{\pi D^2} = \frac{4 \cdot 0,0025}{3,14 \cdot 0,6^2} = 0,0088 \text{ м/с;}$$

$\rho_г$ - густина повітря (1,128 кг/м^3);

$U_б$ - швидкість підйому бульбашки повітря:

$$U_б = \left(\frac{1,5 \cdot \rho_р \cdot g \cdot (\rho_р - \rho_г)}{\rho_р^2}\right)^{0,25} =$$

$$= \left(\frac{1,5 \cdot 1060 \cdot 9,81 \cdot (1060 - 1,128)}{1060^2}\right)^{0,25} = 1,96 \text{ м/с;}$$

$\sigma_р$ - коефіцієнт поверхневого натягу культуральної рідини ($69 \cdot 10^3$ Н/м);

$\rho_р$ - густина культуральної рідини (1060 кг/м^3);

g - прискорення вільного падіння (9,81);

$\varepsilon_м$ - коефіцієнт, який характеризує введення механічної енергії в культуральну рідину мішалкою і барботером:

$$\varepsilon_м = \varepsilon_N + \varepsilon_{гідравл} = 915,4 + 26,0 = 941,4;$$

$$\varepsilon_N = \frac{K_N \rho_р n^3 d_м^5}{V_{робочий}} = \frac{7 \cdot 1060 \cdot 4,9^3 \cdot 0,16^5}{0,1} = 915,4;$$

$$\varepsilon_{гідравл} = \rho_р \cdot V_г \cdot g = 1060 \cdot 0,0025 \cdot 9,81 = 26,0.$$

K_N - коефіцієнт потужності. Для його знаходження використовується критерій Рейнольдса.

$$K_N = f(\mathrm{Re}_{відцентр})$$

$$\mathrm{Re}_{відц} = \frac{n d_м^2}{\nu_р} = \frac{4,9 \cdot 0,16^2}{1,4 \cdot 10^{-6}} = 8,9 \cdot 10^4$$

$$\nu_р = \frac{\mu_р}{\rho_р} = \frac{1,5 \cdot 10^{-3}}{1060} = 1,4 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$$

Частота обертання мішалки:

$$n = \frac{\omega}{\pi d_м} = \frac{2,5}{3,14 \cdot 0,160} = 4,9 \text{ с}^{-1},$$

де для $\mu_р \le 10$ Па·с ω = 2,5-10 м/с для турбінної мішалки.

За графіком для турбінної відкритої мішалки [50], K_N = 7.

$$\varphi = \left(\frac{0,0088 \cdot 1,128}{1,96} \right) + 2,16 \cdot 10^{-4} \cdot \frac{941,4^{0,4} \cdot 1060^{0,2}}{(69 \cdot 10^3)^{0,6}} \left(\frac{0,0088}{1,96} \right)^{0,5} = 0,0051.$$

Потужність, яка витрачається на перемішування рідини:

$$N_р = K_N \rho_р n^3 d_м^5 = 7 \cdot 1060 \cdot 4,9^3 \cdot 0,16^5 = 91,54 \text{ Вт}$$

Так як система не суцільна, в рідині наявні бульбашки повітря, потрібно витратити меншу потужність на перемішування:

$$N_{гр} = K_N \rho_р (1 - \varphi) n^3 d_м^5 = 91,54 \cdot (1 - 0,0051) = 90,62 \text{ Вт}$$

В апараті встановлені додаткові пристрої, що впливають на потужність.

Потужність, що витрачається на ущільнення валу:

$$N_{ущ} = 6020 \cdot d_в^{1,3} = 6020 \cdot 0,04^{1,3} = 91,68 \text{ Вт}$$

Потужність електродвигуна:

$$N_{ел.двиг.} = \frac{K_н \cdot K_п \cdot \sum K_i \cdot N_{гр} + N_{ущ}}{\eta} = \frac{0,82 \cdot (1,1+1,1) \cdot 90,62 + 91,68}{0,9} = 283,5 \text{ Вт},$$

де $K_н = \sqrt{\frac{H_р}{D}} = \sqrt{\frac{0,4}{0,6}} = 0,82$ - коефіцієнт, що враховує висоту рідини в апараті;

$K_п$ - коефіцієнт, що враховує наявність перегородок ($K_п$=1);

K_i - коефіцієнт, що враховує наявність різних пристроїв (для гільзи термометра, рівнеміра - K_i = 1,1-1,2).

Коефіцієнт корисної дії $\eta_{приводу} \approx 0,9$.

За каталогом ПК «Системакс» обрано двигун АИР63А2 потужністю 0,37 кВт.

Тепловий розрахунок ферментера. Для теплового розрахунку складається тепловий баланс (табл. 5.1).

Таблиця 5.1. Тепловий баланс ферментера.

Надходження	**Витрати**
1. З ПС: $E_{ПС} = M_{ПС} \cdot c_{ПС} \cdot t_{ПС}$; $E_{ПС}$ = (2,439+1,138+4,064+0,004+ +0,488+0,244+0,04+81,29)·4174·37 = = 13,854 МДж.	1. З КР: $E_К = M_К \cdot c_К \cdot t_К$; $E_К$ = 0,094·1060·4000·37 = 14,75 МДж.
2. З ПМ: $E_{ПМ} = M_{ПМ} \cdot c_{ПМ} \cdot t_{ПМ}$; $E_{ПМ}$ = 1081·3000·37 = 119,99 МДж.	2. З повітрям: $E_{пов\ к} = V_г \cdot c_{пк} \cdot t_{пк} \cdot \tau_{аерації}$; $E_{пов\ к}$ = 0,0025·1005·37·54000 = 5,02 МДж.
3. З повітрям: $E_{пов\ н} = V_г \cdot c_{пн} \cdot t_{пн} \cdot \tau_{аерації}$; $E_{пов\ н}$ = 0,0025·1005·37·54000 = 5,02 МДж [55].	3. З теплоносієм: $E_{тк} = M_{тк} \cdot c_{тк} \cdot t_{тк}$

Продовження таблиці 5.1.

4. Від мішалки: $E_{дис1} = N \cdot \tau_{аерації}$; $E_{дис1} = 90{,}62 \cdot 54000 = 4{,}89$ МДж.	4. Втрати: $E_{втрат} = 0{,}1 \cdot E_{надходження}$; $E_{втрат} \approx 0{,}1 \cdot (13{,}854 + 119{,}99 +$ $+ 5{,}02 + 4{,}89 + 465{,}5 + 1{,}7) = 61{,}10$ МДж.
5. Від барботера: $E_{дис2} = \rho_р \cdot g \cdot W_г \cdot V_р \cdot \tau_{аерації}$; $E_{дис2} = 1060 \cdot 9{,}81 \cdot 0{,}0088 \cdot 0{,}094 \times$ $\times 54000 = 464{,}5$ МДж.	
6. З теплоносієм: $E_{тн} = M_{тн} \cdot c_{тн} \cdot t_{тн}$	
7. Енергія реакції: $E_р = 20$ МДж/кг $= 20 \cdot 0{,}085 = 1{,}7$ МДж	

Рівняння теплового балансу:

$$E_{ПС} + E_{ПМ} + E_{пов\ н} + E_{дис1} + E_{дис2} + E_{тн} + E_р = E_К + E_{пов\ к} + E_{втрат} + E_{тк}$$

Енергію в ферментер вносить теплоносій:

$$E_{тн} - E_{тк} = - E_{ПС} - E_{ПМ} - E_{пов\ н} - E_{дис1} - E_{дис2} - E_р + E_К + E_{пов\ к} + E_{втрат}$$

$$E_{тн} - E_{тк} = \Delta$$

$$M_{тн} \cdot c_{тн} (t_{тн} - t_{тк}) = \Delta$$

Склавши рівняння теплового балансу, можна встановити, в якому тепловому режимі працює ферментер - потребує охолодження чи нагрівання.

Для знаходження теплового навантаження потрібно встановити величину Δ.

$$\Delta = - E_{ПС} - E_{ПМ} - E_{пов\ н} - E_{дис1} - E_{дис2} - E_р + E_К + E_{пов\ к} + E_{втрат} =$$

$$= - 13{,}854 - 119{,}99 - 4{,}89 - 464{,}5 - 1{,}7 + 14{,}75 + 61{,}10 = - 529{,}084 \text{ МДж}.$$

$\Delta < 0$, тому $t_{тн} - t_{тк} < 0$, звідси $t_{тн} < t_{тк}$. Ферментер потребує охолодження.

Визначення витрати теплоносія:

Масова витрата:

$$G_m = \frac{Q_m}{c_m \Delta t_m} = \frac{E_m / \tau}{c_m (\mathrm{t}_{KP} - \Delta \mathrm{t}_{сер})} = \frac{529084000 / 54000}{4174 \cdot (37 - 10)} = 0{,}087 \text{ кг/с.}$$

Об'ємна витрата:

$$V_m = \frac{G_m}{\rho_m} = \frac{0{,}064}{999{,}7} = 8{,}7 \cdot 10^{-5} \text{ м}^3\text{/с.}$$

Розрахунок коефіцієнта теплопередачі:

Після вибору конструкції і розмірів теплообмінного пристрою (сорочки), знаходять коефіцієнт теплопередачі за формулою:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_{теплоносія}} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_{КР}}},$$

де $\alpha_{теплоносія}$ - коефіцієнт тепловіддачі до сорочки.

$\delta_{ст}$ - товщина стінки корпусу (10 мм).

$\lambda_{ст}$ - коефіцієнт теплопровідності матеріалу корпусу (для неіржавіючої сталі - 45 Вт/м·К).

$\alpha_{КР}$ - коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини.

Знаходження $\alpha_{теплоносія}$:

Площа перетину сорочки:

$$F_{сор} = \frac{\pi (D^2_{сорочки} - (D + 2\delta)^2)}{4} = \frac{3{,}14(0{,}63^2 - 0{,}620^2)}{4} = 0{,}001 \text{ м}^2.$$

Швидкість води в сорочці:

$$w = \frac{V_m}{F_{сорочки}} = \frac{8{,}7 \cdot 10^{-5}}{0{,}001} = 0{,}087 \text{ м/с.}$$

Еквівалентний діаметр:

$$d_e = D_{сорочки} - (D + 2\delta) = 0{,}63 - (0{,}6 + 0{,}02) = 0{,}01 \text{ м}$$

Критерій Рейнольдса:

$$\mathrm{Re} = \frac{w \cdot d_e \cdot \rho_m}{\mu_m} = \frac{0{,}0087 \cdot 0{,}01 \cdot 999{,}7}{1306 \cdot 10^{-6}} = 66{,}60.$$

Так як значення Re < 2300, додамо перегородку в сорочку, товщина якої b = 0,005 м, довжина якої l = 0,023 м. При цьому:

$$w = \frac{V_m}{b \cdot l} = \frac{8,7 \cdot 10^{-5}}{0,005 \cdot 0,023} = 0,757 \text{ м/с}.$$

$$d_e = \frac{2bl}{b+l} = \frac{2 \cdot 0,005 \cdot 0,023}{0,005 + 0,023} = 0,0098 \text{ м}.$$

$$\text{Re} = \frac{w \cdot d_e \cdot \rho_m}{\mu_m} = \frac{0,757 \cdot 0,0098 \cdot 999,7}{1306 \cdot 10^{-6}} = 5678,6.$$

Для перехідного режиму руху рідини:

$$Nu = K_0 \cdot \text{Pr}^{0,43} \left(\frac{\text{Pr}}{\text{Pr}_{ст}} \right) = 16,5 \cdot 9,52 \left(\frac{9,52}{7,02} \right) = 213,02,$$

де Pr = 9,52;

K_0 (при Re = $5 \cdot 10^{-3}$) = 16,5 [55];

$$\alpha_{теплоносія} = \frac{Nu \cdot \lambda}{d_e} = \frac{213,02 \cdot 57,4 \cdot 10^{-2}}{0,0098} = 12476 \text{ Вт/м}^2\text{К}.$$

Знаходження $\alpha_{КР}$:

Для апаратів з механічним перемішуючим пристроєм і барботером:

$$Nu = 1,35 \cdot \text{Re}^{0,59} \cdot \text{Pr}^{0,33} \cdot Fr^{-0,1} =$$
$$= 1,35 \cdot (9,36 \cdot 10^4)^{0,59} \cdot (9,45)^{0,33} \cdot (0,39)^{-0,1} = 2668,02,$$

де $\text{Re} = \frac{d_м}{\nu_{КР}} \cdot \left(d_м \cdot n + 4W_г \right) = \frac{0,16}{1,4 \cdot 10^{-6}} \cdot \left(0,16 \cdot 4,9 + 4 \cdot 0,0088 \right) = 9,36 \cdot 10^4$,

$$\text{Pr} = \frac{\mu_{КР} \cdot c_{КР}}{\lambda_{КР}} = \frac{1,5 \cdot 10^{-3} \cdot 4000}{63,5 \cdot 10^{-2}} = 9,45,$$

$$Fr = \frac{4,9^2 \cdot 0,16}{9,81} = 0,39.$$

$$\alpha_{КР} = \frac{Nu \cdot \lambda_{КР}}{D} = \frac{2668,02 \cdot 63,5 \cdot 10^{-2}}{0,6} = 2823,65 \text{ Вт/м}^2\text{К}.$$

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_{теплоносія}} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_{КР}}} = \frac{1}{\frac{1}{12476} + \frac{0,01}{45} + \frac{1}{2823,65}} = 1515 \text{ Вт/м}^2\text{К}.$$

Визначення розрахункової поверхні теплообміну:

$$F = \frac{E_m}{K \cdot \Delta t_{сер} \cdot \tau} = \frac{529084000}{1515 \cdot 10 \cdot 54000} = 0{,}647 \text{ м}^2,$$

Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_{апарату} = \pi(D + 2\delta_{ст})H_{сорочки} = 3{,}14 \cdot (0{,}6 + 0{,}006) \cdot 0{,}37 = 0{,}704 \text{ м}^2.$$

$$F < F_{апарату}$$

Так як розрахункова поверхня теплообміну менша дійсної, в апараті забезпечується ефективний процес охолодження.

Розрахунок процесів масообміну в ферментері. Метою розрахунку є знаходження коефіцієнту масовіддачі та потоку маси O_2 від газової фази до культуральної рідини, який забезпечується при даному режимі перемішування та витраті газу.

Розраховуємо середній діаметр газових бульбашок [56]:

$$d_б = 4{,}15 \cdot \left(\frac{\sigma^3}{\rho_р \cdot \varepsilon_м^2} \right)^{0{,}2} \cdot \varphi^{0{,}5} + 0{,}0009 =$$

$$= 4{,}15 \cdot \left(\frac{\left(69 \cdot 10^3\right)^3}{1060 \cdot 941{,}4^2} \right)^{0{,}2} \cdot 0{,}0051^{0{,}5} + 0{,}0009 = 3{,}808 \text{ м}.$$

Питома площа поверхні газових бульбашок:

$$a = 1{,}44 \cdot \left(\frac{\varepsilon_м^{0{,}4} \cdot \rho_р^{0{,}2}}{\sigma^{0{,}6}} \right) \cdot \left(\frac{W_г}{U_б} \right)^{0{,}5} =$$

$$= 1{,}44 \cdot \left(\frac{941{,}4^{0{,}4} \cdot 1060^{0{,}2}}{\left(69 \cdot 10^3\right)^{0{,}6}} \right) \cdot \left(\frac{0{,}0088}{1{,}96} \right)^{0{,}5} = 0{,}0075 \text{ м}^2/\text{м}^3.$$

Критерій Шервуда:

$$\text{Sh} = 0{,}33 \cdot \left(\frac{n \cdot d_м \cdot d_б}{\mu_р} \right) \cdot \left(\frac{\mu_р}{D_р} \right)^{0{,}5} =$$

$$= 0{,}33 \cdot \left(\frac{4{,}9 \cdot 0{,}16 \cdot 3{,}808}{1{,}5 \cdot 10^{-3}} \right) \cdot \left(\frac{1{,}5 \cdot 10^{-3}}{2{,}1 \cdot 10^{-9}} \right)^{0{,}5} = 555097,$$

де D_p - коефіцієнт молекулярної дифузії ($2{,}1 \cdot 10^{-9}$ м^2/с) [57].

Поверхневий коефіцієнт масопереносу:

$$\beta_p = \frac{\mathrm{Sh} \cdot D_p}{d_б} = \frac{555097 \cdot 2{,}1 \cdot 10^{-9}}{3{,}808} = 0{,}00031 \text{ м/с}.$$

Рівноважна концентрація кисню на межі поділу фаз:

$$x^* = \frac{y \cdot p \cdot \rho_p}{Mm} = \frac{0{,}21 \cdot 0{,}1 \cdot 1060}{18 \cdot 5560} = 0{,}00022 \text{ кг/м}^3,$$

де y - середня концентрація кисню в повітрі (0,21 кг/м^3);

p - тиск над рідиною в ферментері (0,1 МПа);

M - молекулярна маса рідини (18 кг/кмоль);

m - фазова рівновага при розчиненні кисню в воді (5560 МПа при 40°С).

Концентрація кисню, розчиненого в об'ємі рідини:

$$x \approx 0{,}21 \cdot x^* = 0{,}21 \cdot 0{,}00022 = 0{,}000046 \text{ кг/м}^3.$$

Площа поверхні контакту фаз:

$$F = a \cdot V_p = 0{,}0075 \cdot 0{,}1 = 0{,}00075 \text{ м}^2.$$

За законом Щукарева, потік маси, що забезпечується перемішуванням, дорівнює масі кисню, що витрачається на реакцію за одиницю часу:

$$Q_{O_2} = \beta_p \cdot F \cdot (x^* - x) = 0{,}00031 \cdot 0{,}00075 \times$$
$$\times (0{,}00022 - 0{,}000046) = 4{,}05 \cdot 10^{-11} \text{ кг/с}.$$

Потік маси кисню від повітря до культуральної рідини при даному режимі перемішування складає $4{,}05 \cdot 10^{-11}$ кг/с.

Гідравлічний розрахунок. Даний розрахунок необхідний для визначення потужності насосу для подачі теплоносія в сорочку.

Втрата тиску на створення швидкості потоку [57]:

$$\Delta p_{шв} = \frac{w^2 \rho}{2} = \frac{0{,}757^2 \cdot 999{,}7}{2} = 286{,}44 \text{ Па}.$$

Втрата тиску на прямій ділянці:

$$\Delta p_{тр} = \lambda \cdot \frac{H_{сор}}{d_e} \cdot \Delta p_{шв} = 0{,}113 \cdot \frac{0{,}37}{0{,}0098} \cdot 286{,}44 = 1222{,}05 \text{ Па},$$

де $\lambda = \frac{64}{\text{Re}} = \frac{64}{5678,6} = 0,113$ - коефіцієнт тертя, що залежить від режиму руху течії.

Втрата тиску на місцеві опори:

$$\Delta p_{мс} = \sum \xi \cdot \Delta p_{шв} = (0,81 + 0,45) \cdot 286,44 = 360,91 \text{ Па},$$

де $\sum \xi = \xi_р + \xi_з$ - сума коефіцієнтів місцевих опорів, $\xi_р$=0,81 для розширення, $\xi_з$=0,45 для звуження.

Втрата тиску на підняття рідини:

$$\Delta p_{під} = \rho \cdot g \cdot H_{сор} = 999,7 \cdot 9,81 \cdot 0,37 = 3628,61 \text{ Па}.$$

Сумарна втрата тиску:

$$\Delta p = \Delta p_{шв} + \Delta p_{тр} + \Delta p_{мс} + \Delta p_{під} = 286,44 +$$
$$+1222,05 + 360,91 + 3628,61 = 5498,01 \text{ Па}.$$

Потужність насоса:

$$N = \frac{V_т \Delta p}{1000\eta} = \frac{8,7 \cdot 10^{-5} \cdot 5498,01}{1000 \cdot 0,6} = 0,00079 \text{ кВт}.$$

Вибираємо відцентровий насос Calpeda NM 1/AE з електродвигуном потужністю 0,37 кВт ($V_т$ =1-4,2 м^3/с, Н=16,3-22 м) з каталогу насосів Calpeda.

5.3. Вибір загальнозаводського обладнання

Основною вимогою до загальнозаводського обладнання є забезпечення асептичності відповідних стадій виробництва. Повинна бути забезпечена відсутність контамінації при транспортуванні рідких та пастоподібних речовин (пасти ТВ, гібридного білка, очищеного інсуліну). Повинні бути забезпечені стерильність технологічного аераційного повітря, а також відповідні показники якості повітря згідно з класом чистоти приміщення.

Для транспорту різних речовин на виробництві, що проектується, можливе використання насосів різних типів, що підбираються за продуктивністю, напором та потужністю.

Основними перевагами поршневих і плунжерних насосів є високий ККД і можливість подачі незначних об'ємів рідин, в тому числі високов'язких, під будь-яким заданим тиском, тому дані насоси використовуються для перекачування високов'язких рідин, а також при дозуванні рідких середовищ. Шестеренні і гвинтові насоси, що є конструктивно простими і забезпечують плавну подачу рідини, також можливо застосовувати для перекачування малих кількостей в'язких рідин. Насоси таких типів можна підібрати за каталогом «Tapflo», наприклад, серія шестеренних насосів Top Gear MAG продуктивністю до 80 $м^3$/год, з температурою рідини, що перекачується, до 250°С.

Відцентрові насоси набули найбільшого поширення в біотехнологічній промисловості, так як вони мають ряд важливих переваг: 1) висока продуктивність і рівномірна подача; 2) компактність і швидкохідність; 3) простота; 4) можливість перекачування рідин, що містять тверді зважені частинки, завдяки великим зазорам між лопатями і відсутності клапанів. До недоліків відцентрових насосів відноситься обмеженість їх застосування в області малих продуктивностей і великих напорів [58]. Насоси такого типу можна підібрати за каталогом Calpeda, наприклад, серії NM та NMD, продуктивністю 1-66 $м^3$/год, напором 3,5-114 м, потужністю 0,37-9,2 кВт.

Перистальтичні (шлангові) насоси широко використовуються для асептичного транспортування речовин в фармацевтичній промисловості. Виконавши шланг з матеріалу, який практично не виділяє сторонніх речовин (наприклад, силікону), можна домогтися того, що перекачувана речовина в ньому буде забруднюватися мінімально [59]. Насоси такого типу можна підібрати за каталогом «Tapflo», наприклад, серія PT продуктивністю до 150 $м^3$/год, з температурою рідини, що перекачується, до 135°С.

Для отримання очищеного повітря виробничих приміщень різних класів чистоти та стерильного аераційного повітря для культивування, на виробництві, що проектується, необхідне використання фільтрів, що забезпечують різні ступені очистки.

Фільтри класу G (грубої очистки, нестерилізуючі) забезпечують очищення з ефективністю Е = 65-90%, фільтри класу F (тонкої очистки) - очищення з ефективністю Е = 40-95%.

Стерилізуючими є фільтри класу H (HEPA) та U (ULPA). Фільтри HEPA забезпечують очищення з ефективністю Е = 99-99,995%. Фільтри такого типу можна підібрати за каталогом NEW FILTER, площею фільтрації від 2,7 до 20 $м^2$. Фільтри ULPA забезпечують очищення з ефективністю до 99,999995%.

5.4. Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

5.4.1. Охорона праці

Охорона праці - це система правових, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів та засобів, спрямованих на збереження життя, здоров'я і працездатності людини у процесі трудової діяльності [60].

Охорона праці повинна бути забезпечена на проектованому виробництві, при чому необхідне дотримання вимог законодавства про охорону праці, що складається з Закону України «Про охорону праці», Кодексу законів про працю України, Закону України «Про загальнообов'язкове державне соціальне страхування від нещасного випадку на виробництві та професійного захворювання, які спричинили втрату працездатності».

Вимоги до безпечності підприємств повинні встановлюватись з урахуванням сукупності чинників, від яких залежить характер та рівень впливу підприємства на реципієнтів.

Виробнича діяльність персоналу фармацевтичної галузі пов'язана з впливом великої кількості негативних факторів. На фармацевтичних підприємствах у працівників можливе виникнення захворювань, які виникають у результаті впливу хімічних факторів (кислоти, луги, органічні розчинники, сполуки сірки), фізичних факторів (ультрафіолетове, іонізуюче випромінювання, інтенсивне теплове випромінювання), алергічні захворювання

(при роботі зі сполуками алергічного дії). Охорону праці під час виробництва лікарських засобів з урахуванням зазначених факторів забезпечують завдяки вимогам до документації, виробництва, обладнання, персоналу. Для кожного виробничого об'єкта повинні бути розроблені інструкції з охорони праці, виробничої санітарії та пожежної безпеки.

Відповідно до Закону України «Про охорону праці», на роботах із шкідливими умовами праці, працівникам повинні видаватися безоплатно спеціальний одяг, спеціальне взуття та інші засоби індивідуального захисту, а також мийні та знешкоджувальні засоби. Роботодавець зобов'язаний забезпечити за свій рахунок придбання, комплектування, видачу та утримання засобів індивідуального захисту [60].

Безпека виробничого обладнання повинна забезпечуватися:

- вибором принципів дії, джерел енергії, параметрів робочих процесів;

- мінімізацією енергії, що споживається чи накопичується;

- застосуванням вмонтованих в конструкцію засобів захисту та інформації про можливі небезпечні ситуації;

- застосуванням засобів автоматизації, дистанційного керування та контролю;

- дотриманням ергономічних вимог.

Виробниче обладнання повинно відповідати вимогам безпеки протягом всього періоду його експлуатації [61].

Для недопускання виділення шкідливих речовин в повітря виробничих приміщень, реактори повинні бути забезпечені пробовідбірниками, оглядовими вікнами, засобами вимірювання, які виключають, де це можливо, необхідність відкривання люків апаратури для відбору проб і спостереження за ходом процесу.

Завантаження і вивантаження рідин, що містять залишки речовин з терапевтичною дією або речовин з різким запахом, повинне здійснюватися у закритих комунікаціях із використанням насосів, самопливу, вакууму.

Завантаження реагентів в апарати повинне здійснюватися таким чином, щоб виключити можливість перегріву і перевищення допустимого тиску всередині апарату. Повинно бути заборонене вивантаження відфільтрованих речовин без попереднього включення системи місцевої витяжної вентиляції.

Кристалізацію розчинів (цинк-інсуліну та перекристалізацію інсуліну) необхідно проводити в закритій апаратурі, обладнаною місцевою витяжною вентиляцією.

Розвантаження кислот і лугів з тари повинне бути механізоване. Кислоти і луги слід транспортувати по трубопроводах самопливом, насосами або за допомогою вакууму.

Системи припливно-витяжної вентиляції в боксах, де пред'являються підвищені технологічні вимоги до чистоти повітря, повинні забезпечувати параметри мікроклімату, чистоти повітря, інших факторів середовища, що відповідають санітарно-гігієнічним вимогам відповідно до класу чистоти приміщення.

Облаштування природного і штучного освітлення у виробничих і допоміжних приміщеннях фармацевтичних підприємств повинно відповідати вимогам ДБН В.2.5-28:2018 «Природне і штучне освітлення». Допускається в окремих випадках обладнання робочих місць без природного освітлення, якщо це обумовлено вимогами технологічного процесу (перегляд картриджів). При роботі в цих умовах повинні бути вжиті заходи щодо компенсації у працівників ультрафіолетової недостатності.

Санітарно-побутове забезпечення працюючих має здійснюватися у відповідності до СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016.

У фармацевтичній промисловості під час обладнання складів для зберігання речовин потрібно враховувати правила і положення санітарної та пожежної безпеки, що є загальними для всіх складів. Речовини потрібно зберігати в тарі та упакуванні, що регламентовані відповідними стандартами або технічними умовами.

Підприємство повинне керуватися «Правилами пожежної безпеки в Україні», Законом України «Про пожежну безпеку» для запобігання виникненню пожеж, нещасних випадків під час пожеж, а також для гасіння пожеж [61]. Промислові приміщення повинні мати зовнішнє і внутрішнє протипожежне водопостачання, спроектоване згідно з вимогами ДБН В.2.5-74:2013 «Водопостачання. Зовнішні мережі і споруди» та ДБН В.2.5-64:2012 «Внутрішній водопровід та каналізація».

5.4.2. Охорона навколишнього середовища

Очищення стоків. Промислові стоки, що скидаються у водойми, порушують біологічну рівновагу водойм. Необхідне очищення стоків до такої міри, щоб при скиданні їх у водойми і змішуванні з водою показник БПК залишався в межах норми, встановленої санітарними правилами (Санітарні правила і норми охорони поверхневих вод від забруднення. СанПіН 4630-88).

Знезараження стічних вод передбачає видалення з них патогенних мікроорганізмів. Ступінь очищення розраховується в залежності від витрат води в водоймі: чим менша секундна витрата води, тим більший ступінь очищення стоку потрібен.

Для очищення застосовуються три основних типи очисних споруд: локальні (цехові), загальні (заводські) і районні (міські).

Локальні очисні споруди, які рекомендовано використовувати для очищення стоків у проектованому виробництві, призначені для знешкодження стічних вод безпосередньо після технологічних установок і цехів. На локальних установках очищуються стічні води, які без очищення не можуть бути спрямовані в системи повторного і оборотного водопостачання або на загальні заводські чи районні очисні споруди. Застосовуються регенераційні методи очищення: відстоювання, флотація, екстракція, ректифікація, адсорбція, іонний обмін, зворотний осмос та ін.

Загальні (заводські) очисні споруди можуть включати споруди первинного (механічного), вторинного (біологічного) і третинного (доочистки) очищення стічних вод. На багатьох підприємствах знаходяться споруди первинної та вторинної очистки. Установки доочищення необхідно застосовувати для отримання води, яка може бути використана повторно в технологічних процесах або в системах оборотного водопостачання.

Районні (міські) очисні споруди призначені в основному для механічної та біологічної очистки побутових стічних вод [62].

Очищення повітря. Повітряні викиди піддаються очищенню до такої міри, щоб в кінцевому результаті ГДК не перевищували допустимих норм (Державні санітарні правила охорони атмосферного повітря населених місць (від забруднення хімічними та біологічними речовинами) (ДСП-201-97)).

Широко розповсюдженим пристроєм для механічного пиловловлення є циклон, дія якого заснована на використанні відцентрової сили, що виникає шляхом введення запиленого повітря в корпус циклону через патрубок, вісь якого направлена по дотичній до корпусу циклону. Ефективність очищення збільшується при зменшенні розмірів циклону, так як величина відцентрової сили обернено пропорційна відстані частинок пилу від осі циклону, тому застосовуються батарейні циклони - кілька циклонів, встановлених паралельно, замість одного циклону великого розміру.

Для очистки повітря також застосовуються мокрі скрубери, що представляють собою вертикальні циліндричні колони, в які запилене повітря вводиться по дотичній до стінки апарату, а в потік повітря через форсунки впорскують рідину. На краплях рідини відбувається осадження пилових частинок, очищене повітря відводиться з верхньої частини апарату, вода з пилом збирається внизу скрубера.

Для очистки повітря від мікроорганізмів також можливе використання таких самих фільтрів, що і при підготовці повітря. Найбільш поширеними є тканинні рукавні фільтри, коефіцієнт вловлювання яких досягає 99% [62].

Висновки до розділу 5:

Було проведено аналіз існуючих конструкцій ферментерів за такими ознаками, як спосіб культивування, стерильність, спосіб введення енергії та організації перемішування і аерації. Для технологічного процесу даного проекту було обрано герметичний ферментер для глибинного культивування періодичної дії з комбінованим підведенням енергії - ферментер з механічним перемішуючим пристроєм (з турбінною мішалкою) та барботером. Було висвітлено переваги даної конструкції, а також вибрано матеріал для її виготовлення - сталь 12Х18Н10Т, - що відповідає умовам проведення процесів в апараті та характеристикам середовища.

Було проведено конструктивний розрахунок для визначення розмірів ферментера і його основних конструктивних елементів, розрахунок потужності, яка витрачається при перемішуванні. Було здійснено тепловий розрахунок для підтвердження ефективності процесу охолодження ферментера, розрахунок процесів масообміну в ферментері для знаходження коефіцієнту масовіддачі та потоку маси O_2 від газової фази до культуральної рідини, який забезпечується при даному режимі перемішування та витраті газу. Було проведено гідравлічний розрахунок для визначення потужності насосу при подачі теплоносія в сорочку.

Було вибране загальнозаводське обладнання, що забезпечує асептичність відповідних стадій виробництва, відсутність контамінації при транспортуванні рідких та пастоподібних речовин (пасти ТВ, гібридного білка, очищеного інсуліну), стерильність технологічного аераційного повітря, а також відповідні показники якості повітря згідно з класом чистоти приміщення.

Були наведені вимоги до охорони праці при використанні даного обладнання та сформульовані рекомендації стосовно очищення повітря та стоків.

ВИСНОВКИ

1. В проекті для виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах обрано продуцент *E. coli* JM109/pHINS11. Вихід готового продукту при використанні даного штаму - 27 мл/л культуральної рідини.

2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів *E. coli* та описано схему отримання продуценту рекомбінантного інсуліну шляхом комбінації кон'югації, трансдукції, трансформації та використання генної інженерії.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості продуценту *E. coli* JM109/pHINS11, обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу - варіація середовища LB, - тривалість культивування 15 год. Було обрано кількісний склад поживного середовища для проведення технологічного процесу в даному обладнанні: гідролізат казеїна соляно-кислотний - 28,36 кг/м^3, екстракт пекарських дріжджів - 13,23 кг/м^3, глюкоза - 47,26 кг/м^3, ампіциліну натрієва сіль - 0,05 кг/м^3, дигідрофосфат калію - 5,67 кг/м^3, гідрофосфат калію - 2,84 кг/м^3, сульфат магнію - 0,47 кг/м^3.

4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту, для біосинтезу обрано і розраховано конструкцію ферментера з механічним перемішуючим пристроєм (турбінною мішалкою) та барботером, продуктивністю 6,7 дм^3/год, яка дозволяє отримати напівпродукт належної якості (культуральну рідину з наявністю тілець включення у 90-95% клітин). Розроблено креслення загального виду ферментера.

5. У відповідності до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну і апаратурну схеми виробництва інсуліну рекомбінантного у картриджах на 3 мл, по 5 картриджів в картонній упаковці.