

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**факультет фармацевтичних технологій та менеджменту**  
**кафедра біотехнології**

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему: **«АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЙ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ  
ІНСУЛІНІВ»**

**Виконав:** здобувач вищої освіти 2 курсу групи ПБтм22(1,6д)-01а  
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія  
освітньої програми Промислова біотехнологія  
Павло БОРИСЮК

**Керівник:** доцент закладу вищої освіти  
кафедри біотехнології, к. фарм. н., доц.  
Ольга КАЛЮЖНАЯ

**Рецензент:**  
Начальник відділу фармацевтичної розробки ТОВ “БІОЛІК  
ФАРМА”, к. фарм. н., с.н.с.  
Олена НАЗАРОВА

## АНОТАЦІЯ

У роботі розглянуто сучасний фармацевтичний ринок інсулінів та типи препаратів, що застосовуються у терапії діабету. Проведено аналіз технологій рекомбінантних інсулінів, за якими відбувається виробництво закордонними фармацевтичними компаніями. Охарактеризовано системи експресії, що використовують у цих виробництвах, а саме: бактеріальні, одноклітинні еукаріотні, рослинні клітини (тютюну, томату, полуниці), клітини комах. На основі аналізу представлених технологій розроблено технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну з використанням бактеріальної системи експресії, яка може бути реалізована на вітчизняному фармацевтичному підприємстві. Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи – 52 стор., кількість рисунків 10, джерел літератури 72, додатків 1.

*Ключові слова:* інсулін, технологія рекомбінантних ДНК, система експресії.

## ABSTRACT

The work examines the modern pharmaceutical insulin market and the types of drugs used in diabetes therapy. The analysis of recombinant insulin technologies, which are used in the production of insulin preparations by foreign pharmaceutical companies, was carried out. The expression systems used in these productions are characterized, namely: bacterial, unicellular eukaryotic, plant cells, insect cells. Based on the analysis of the presented technologies, a technological scheme for the production of recombinant insulin using a bacterial expression system was developed, which can be implemented at a domestic pharmaceutical enterprise. The work consists of an introduction, three sections, and a conclusion. The total volume of the work is 52 pages, the number of figures are 10, literature sources are 72, and appendix is 1.

*Key words:* insulin, recombinant DNA technology, expression system.

## ЗМІСТ

Вступ	3
Розділ 1 Огляд літератури	6
1.1 Інсулін – гормон підшлункової залози: будова, синтез, функції	6
1.2 Характеристика препаратів інсуліну	9
1.3 Загальна характеристика технологій виробництва інсулінів	12
1.4 Загальна характеристика систем експресії для отримання рекомбінантних білків	14
Висновок до розділу 1	15
Розділ 2 Об’єкти та методи досліджень	17
2.1. Характеристика систем експресії для отримання людського інсуліну	17
Висновок до розділу 2	26
Розділ 3 Експериментальна частина	28
3.1 Аналіз систем експресії для виробництва інсулінів	28
3.2 Аналіз методів виробництва рекомбінантних інсулів	30
3.3 Пропозиції щодо вибору системи експресії та технології для реалізації на вітчизняному підприємстві	42
Висновок до 3 розділу	49
Висновки	50
Список використаних джерел	52
Додаток. Публікації за темою роботи	60

## ВСТУП

**Актуальність теми.** За визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) діабет є глобальною епідемією [1]. Для прискорення дій щодо боротьби з діабетом у всьому світі у квітні 2021 р. ВООЗ запустила Глобальний діабетичний договір. Понад 420 мільйонів людей (6 % населення світу) жили з діабетом до появи COVID-19, і прогнозується, що це число зростатиме до 500 мільйонів до 2030 р. та до 700 мільйонів до 2045 р. [1]. Зростання кількості хворих на цукровий діабет у всьому світі через більш ширший перехід до малорухомого способу життя, у свою чергу, призведе до збільшення потреби в інсуліні. Крім того, існує незадоволений попит на доступний інсулін, особливо в країнах із низьким і середнім рівнем доходу. Багато людей із діабетом 1 типу, життя яких повністю залежать від інсуліну, не мають доступу до інсуліну. Із 60 мільйонів людей із діабетом 2 типу, які потребують лікування інсуліном, 1 з 2 не отримує інсулін через його ціну. У 2018 р. світовий ринок людського інсуліну становив 21,26 мільярда доларів США [2], у 2022 р. – 18,73 мільярда доларів США [3]. Але зниження попиту на інсулін за ці роки відбулось не через зниження потреби у ньому, а через зниження показників діагностики під час пандемії COVID-19. За прогнозами ринок виросте з 18,95 мільярда доларів США у 2023 р. до 21,04 мільярда доларів США до 2030 р., при цьому середньорічний темп росту складатиме 1,5 % протягом цього періоду [3].

Збільшення хворих на діабет та, відповідно, ріст попиту на інсулін, призвело до розвитку технологій його виробництва та появи нових продуктів по всьому світу. Багато років поспіль на ринку людського інсуліну домінують три великі компанії - Sanofi, Novo Nordisk A/S і Elli Lilly and Company, які сукупно володіють понад 90 % часткою ринкового доходу [3]. Виробники зосереджені на розробці нових продуктів інсуліну. Так, у червні 2020 р. FDA схвалила новий інсулін швидкої дії Lyumjev® (insulin lispro-aabc) компанії Elli Lilly and Company [4], а у травні 2022 р. ця ж компанія отримала дозвіл на

виробництво Mounjaro® (tirzepatid), який на сьогоднішній день є зручним і ефективним засобом при лікуванні діабету 2 типу і ожиріння [5].

Таким чином, бачимо, що дослідження, спрямовані на аналіз сучасних технологій виробництва інсулінів з подальшим їхнім впровадженням на вітчизняних підприємствах, є актуальними.

**Метою дослідження** є аналіз сучасних тенденцій у виробництві інсулінів та систем експресії, які використовуються для отримання рекомбінантних препаратів і розробка технологічної схеми виробництва рекомбінантного інсуліну, яка може бути реалізована вітчизняними підприємством.

#### **Завдання дослідження:**

1. провести аналіз джерел літератури щодо стану сучасного ринку виробництва інсулінів;
2. охарактеризувати типи препаратів інсулінів, що випускаються сучасними виробниками;
3. розглянувши системи експресії рекомбінантних білків, провести вибір об'єктів дослідження, проаналізувати їхні переваги та недоліки та запропонувати серед них найоптимальнішу;
4. дослідити технології виробництва інсуліну, запропонувати серед них найоптимальнішу та найдоступнішу;
5. згідно проведено аналізу розробити технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну на основі обраної системи експресії для реалізації на вітчизняному підприємстві.

**Об'єкти дослідження:** системи експресії рекомбінантних інсулінів: бактеріальні - *Escherichia coli*, одноклітинні еукаріотні - *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, трансгенні рослини - *Arabidopsis thaliana*, рослини тютюну, салату, полуниця, стовбурові клітини - ембріональні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку,

стромальні клітини жирового походження, мезенхімальні стовбурові клітини пуповинної крові людини.

**Предметом дослідження** є сучасні технології отримання інсулінів на основі різних систем експресії.

**Методи дослідження.** Методи опрацювання інформації з наукових публікацій та інших джерел: скринінг даних та їх порівняльний аналіз, систематизація.

**Практичне значення отриманих результатів.** Проведений аналіз сучасних технологій виробництва інсулінів та розроблена на його основі технологічна схема з використанням бактеріальної системи експресії можуть бути використані на вітчизняних підприємствах для виробництва вітчизняного препарату.

**Апробація результатів дослідження і публікації.** Окремі результати досліджень представлені на IV Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, 6-7 грудня 2023 р., м. Харків, та опубліковані у матеріалах:

1. Борисюк П.А. Характеристика систем експресії, що використовуються у виробництві рекомбінантного інсуліну/ Борисюк П.А., наук. керівн. Калюжная О.С. // IV Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «YOUTH PHARMACY SCIENCE», 6-7 грудня 2023 р., НФаУ. – Харків, 2023. – С. 156-158.

### **Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.**

Робота складається зі вступу, трьох розділів - огляду літератури, об'єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 52 стор., кількість рисунків 10, джерел літератури 72, додатків 1.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Будова молекули інсуліну

Підшлункова залоза – орган мішаної секреції, ацинарна частина якої виконує екзогенну функцію, секретуючи в дванадцятипалу кишку травні ферменти та іони, а ендокринна (острівці Лангерганса) – продукує декілька гормональних факторів пептидної природи. Синтез та секреція пептидних гормонів забезпечують різні типи клітин острівкового апарату:

A ( $\alpha$ )-клітини – глюкагон

B ( $\beta$ )-клітини – інсулін

D ( $\delta$ )-клітини – соматостатин

F-клітини – панкреатичний поліпептид.

Інсулін – поліпептидний гормон (м.м. 5,8 кД), молекула якого складається з двох ланцюгів – А та В, що мають, відповідно, 21 та 30 амінокислотних залишків. Пептидні ланцюги сполучені між собою дисульфідними зв'язками, що з'єднують залишок A<sub>7</sub> із залишком B<sub>7</sub> та залишок A<sub>20</sub> із залишком B<sub>19</sub>; третій дисульфідний місток зв'язує між собою залишки A<sub>6</sub> та A<sub>11</sub> А-ланцюга (рис. 1.1) [6].

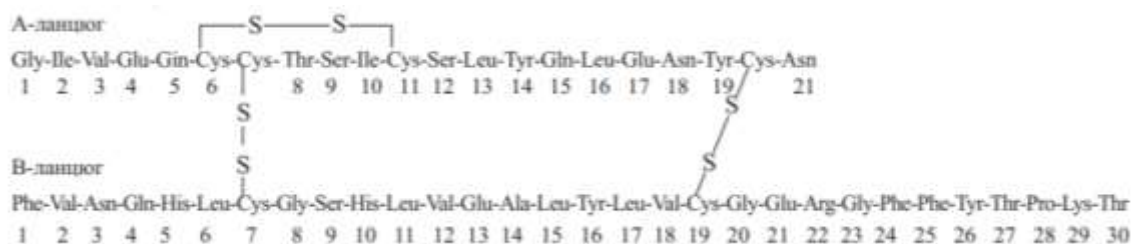


Рис. 1.1 – Первинна структура людського інсуліну

Структура інсуліну майже не змінилась в еволюції вищих хребетних, зокрема інваріабельними є положення дисульфідних зв'язків, аміно- та карбокситермінальні ділянки А-ланцюга, та гідрофобні амінокислоти близько С-кінця В-ланцюга [7]. Людський інсулін відрізняється від бичачого (рис. 1.2)

двома амінокислотними замінами в А-ланцюгу: у 8-му положенні треонін замість аланіну, а у 10-му ізолейцин замість валіну. Свинячий гормон ще ближчий до людського, він відрізняється всього однією амінокислотою: аланіном у 30-му положенні В-ланцюга замість треоніну [8].

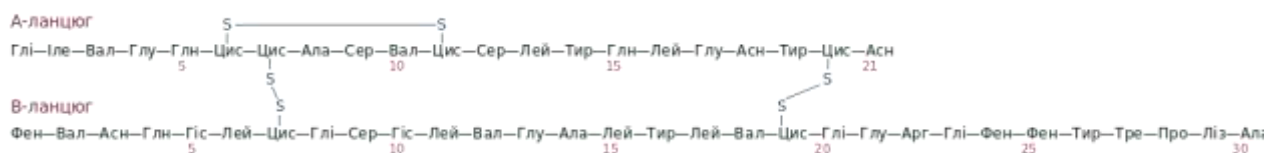


Рис. 1.2 – Первинна структура бичачого інсуліну

Інсулін був першим білком, для якого була встановлена повна амінокислотна послідовність. Цю роботу здійснив 1955 р. британський молекулярний біолог Фредерік Сенгер, за що був удостоєний Нобелівської премії з хімії 1958 року [9]. Сенгер двічі отримував Нобелівську премію з хімії, вдруге 1980 р. - за визначення послідовності основ нуклеїнової кислоти. Сенгер розділив премію 1980 року з Полом Бергом і Уолтером Гілбертом. Берг провів фундаментальні дослідження біохімії нуклеїнових кислот, зокрема рекомбінантної ДНК, Гілберт визначив послідовність основ у ДНК методом, застосовним до одноланцюгової та дволанцюгової ДНК. А робота Сенгера над інсуліном дозволила хімікам штучно синтезувати інсулін, стимулювала дослідження структури білків і привела до визначення структури багатьох інших складних білків [10]. Враховуючи важливе медико-біологічне значення гормону для лікування цукрового діабету, інсулін був також першим білком, отриманим для фармацевтичних цілей біотехнологічним методом з використанням рекомбінантних ДНК.

Просторову будову (третинну структуру) молекули інсуліну було визначено британською біохімікинею Дороті Кроуфут Годжкін, яка є розробницею рентгеноструктурного аналізу білків. 1964 р. вчена отримала Нобелівську премію з хімії «за визначення за допомогою рентгенівських променів структур біологічно активних речовин» [11]. Саме за допомогою



методу рентгенівської дифракції Годжкін 1969 р. встановила структуру інсуліну. Вивчення третинної структури інсуліну дозволило сформувати уявлення про будову його активного центру, який визначає взаємодію білка з мембранним рецептором та реалізацію гормональної активності (рис. 1.3).

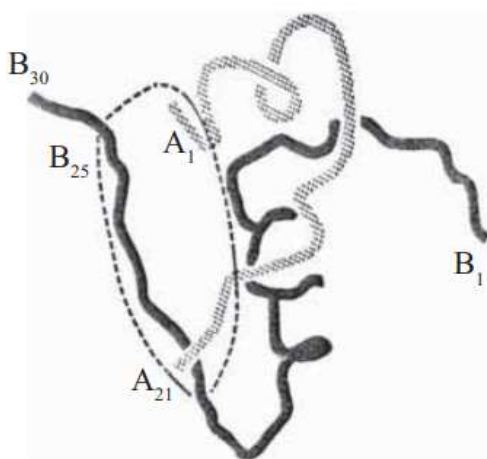


Рис. 1.3 – Просторове розміщення А- та В-ланцюгів у молекулі інсуліну  
(Пунктиром позначений домен, що взаємодіє з рецептором)

У розведеному розчині молекули інсуліну існують в мономерному стані, кожна така молекула складається із гідрофобної серцевини та переважно гідрофільної поверхні, за винятком двох неполярних ділянок. Ці ділянки беруть участь в утворенні димерів та гексамерів. У концентрованих розчинах, наприклад в препаратах для ін'єкції, та кристалах, як всередині секреторних везикул  $\beta$ -клітин, шість мономерів інсуліну разом із двома атомами Цинку утворюють гексамер. Таким чином після підшкірного введення інсуліну він всмоктується у кров повільно, через те, що для дисоціації гексамерів необхідний додатковий час (рис. 1.4).

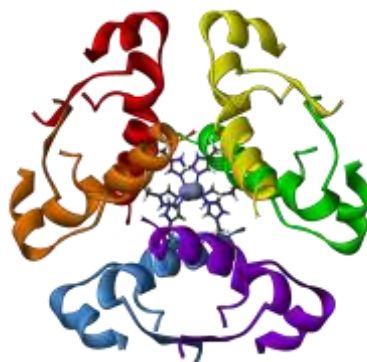


Рис. 1.4 – Гексамер інсуліну із двома атомами Цинку

## 1.2 Синтез інсуліну в клітині

Інсулін синтезується у  $\beta$ -клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. Ген попередника інсуліну - препроінсуліну - в людини локалізується в короткому плечі 11 хромосоми. Він містить 3 екзони та 2 інтрони [12]. В інших тварин, наприклад мишей, пацюків та трьох видів риб, наявні два гени інсуліну [13].

Препроінсулін людини складається із 110 амінокислот: 24 з них становлять гідрофобну N-кінцеву лідерну послідовність (сигнальний пептид), за нею розташований В-ланцюг, далі - послідовність Арг-Арг, з'єднувальний С-пептид (connecting peptide), послідовність Ліз-Арг, та А-ланцюг на С-кінці. Лідерна послідовність необхідна для котрансляційного транспорту препроінсуліну в порожнину шорсткого ендоплазматичного ретикулу. Після проходження через мембрану лідерна послідовність відщеплюється спеціальною сигнальною пептидазою і швидко деградує. Утворений після цього проінсулін складається із 86 амінокислотних залишків і не має гормональної активності. У ендоплазматичному ретикулумі відбувається його згортання та формування всередині молекули трьох дисульфідних зв'язків.

Після утворення правильної просторової структури проінсулін у транспортних везикулах переноситься до цис-сторони комплексу Гольджі. В ході руху прогормону від цис- до транс-Гольджі відбувається його відсортовування в компартмент секреторних гранул. Тут, у незрілих гранулах,

проінсулін підлягає подальшій модифікації, а саме обмеженому протеолізу, що починається із дії двох прогормонконвертаз (PC2 і PC3). Ці ферменти діють специфічно на карбоксикінцевій стороні послідовності з двох позитивно заряджених амінокислот. В молекулі проінсуліну є два таких сайти: Арг31-Арг32 (місце дії PC2) та між Ліз64-Арг65 (місце дії PC3), де і відбувається розрив пептидних зв'язків. Відразу ж після прогормонконвертаз ферментативну активність проявляє карбоксипептидаза-Н, яка відщеплює основні амінокислоти від утворених кінців. Кінцевими продуктами протеолізу є молекула інсуліну та С-пептид довжиною 31 амінокислота. Порівняно із А- та В-ланцюгами інсуліну С-пептид є значно більш варіабельним у хребетних тварин, його довжина коливається від 28 (у корів) до 38 у представників родини Вудильникові (рис. 1.5) [12].

Зрілі секреторні везикули  $\beta$ -клітин містять кристалічний інсулін у формі гексамерів з атомами цинку та еквімолярну кількість С-пептиду. Вони становлять пул гормону, готовий до екзоцитозу у відповідь на стимул. Час півжиття  $\beta$ -гранул становить кілька днів, і якщо вони не секретують свій вміст, то підлягають деградації шляхом злиття із лізосомами. При підвищеній потребі організму в інсуліні деградація відбувається повільніше.

Регуляція синтезу інсуліну відбувається на кількох рівнях, зокрема на рівні транскрипції, сплайсингу пре-мРНК, деградації мРНК [13], трансляції та посттрансляційної модифікації. Найсильнішим стимулятором цих процесів є глюкоза, проте біосинтез проінсуліну може активуватись також іншими цукрами, амінокислотами, зокрема лейцином, проміжними продуктами гліколізу, кетоновими тілами, гормоном росту, глюкагоном та деякими іншими факторами.

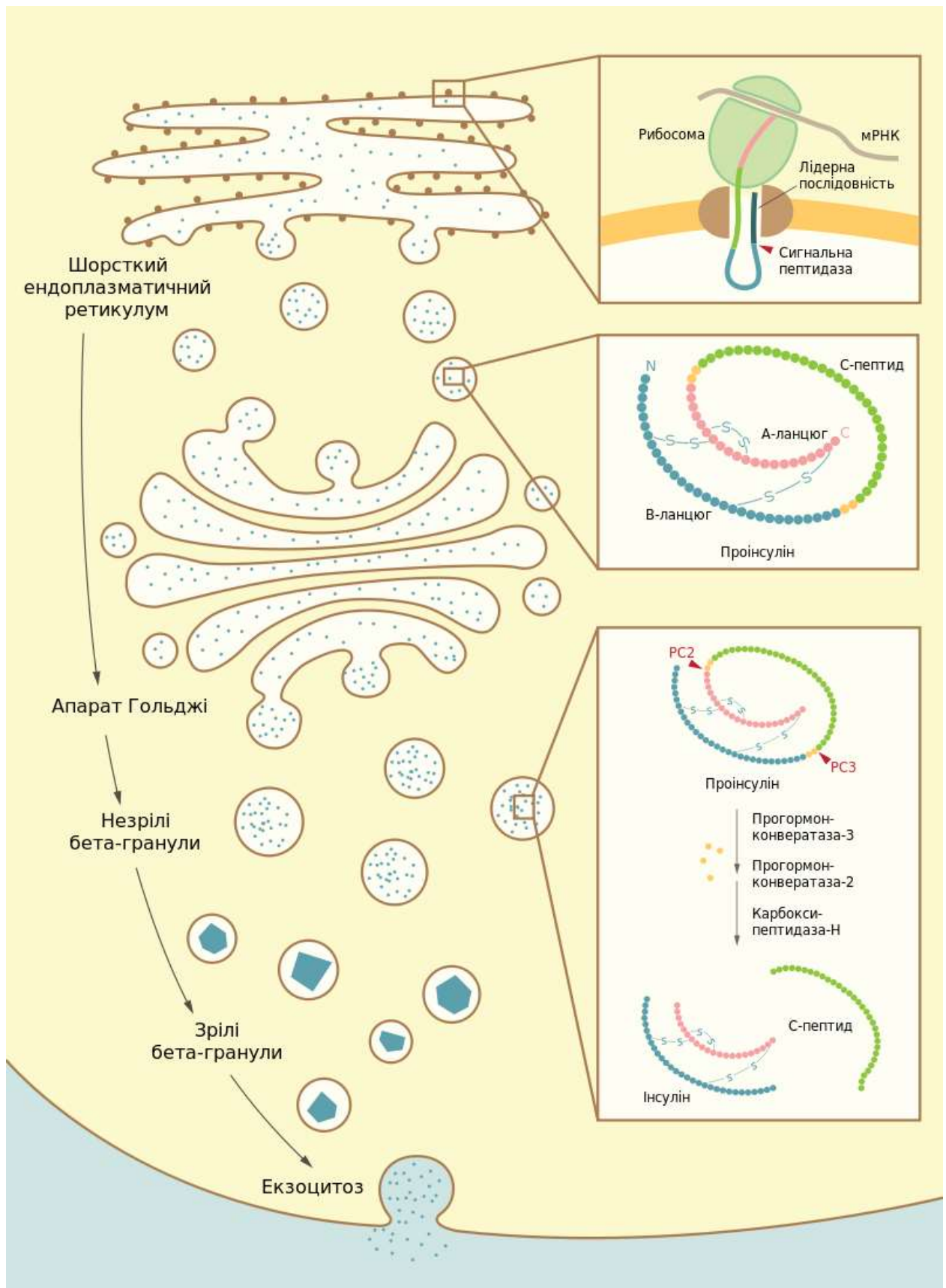


Рис. 1.5 – Загальна схема біосинтезу інсуліну

### 1.3 Секреція інсуліну в клітині

Бета-клітини підшлункової залози, як типові ендокринні клітини, секретують більшість (95 %) свого основного продукту - інсуліну - регульованим шляхом. Найважливішим активатором цього шляху є глюкоза. У мембранах бета-клітин постійно наявні переносники глюкози GLUT2, через які вона може вільно дифундувати. Завдяки цьому збільшення концентрації глюкози в крові призводить до аналогічного підвищення її рівня і в бета-клітинах. Тут вона відразу ж стає субстратом гексокіназної реакції, продуктом якої є глюкозо-6-фосфат. В інсулін-синтезуючих клітинах підшлункової залози експресується один із ізоферментів гексокінази - гексокіназа IV або глюкокіназа, для неї характерна низька спорідненість до субстрату: константа Міхаеліса становить 10 мМ, що перевищує нормальний вміст глюкози в крові (4-5 мМ). Завдяки цьому глюкокіназа може працювати «глюкозним сенсором», активуючись тільки в умовах гіперглікемії [12].

Глюкозо-6-фосфат вступає в реакції гліколізу, продукти якого далі окиснюються у мітохондріях, внаслідок чого в клітині утворюється велика кількість АТФ. Підвищення концентрації АТФ призводить до закриття АТФ-керованих калієвих каналів у плазмалемі. Внаслідок зменшення відтоку калію із клітини мембрана деполяризується, а це веде до відкриття потенціал-керованих кальцієвих каналів і притоку кальцію в клітину. Початкове збільшення концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі веде до подальшого їх вивільнення із ендоплазматичного ретикулуму. Кальцій викликає злиття клатрин-облямованих бета-гранул із плазмалемою і вивільнення їх вмісту в міжклітинний простір, звідки інсулін потрапляє в кров через фенестровані стінки капілярів.

На активність АТФ-керованих калієвих каналів окрім власне АТФ можуть впливати також інші речовини. Ці трансмембранні білки складаються із восьми субодиниць: чотирьох ідентичних Kir6.2 та чотирьох ідентичних SUR1. Перші формують гідрофільний тунель і відповідають за чутливість до

АТФ, а другі є рецепторами до сульфанілсечовин (англ. sulphonylurea receptor) і можуть інактивувати канал після зв'язування зі своїм лігандом [12]. Таким чином сульфанілсечовини активують синтез інсуліну, завдяки чому використовуються як пероральні цукрознижувальні препарати при цукровому діабеті (рис. 1.6).

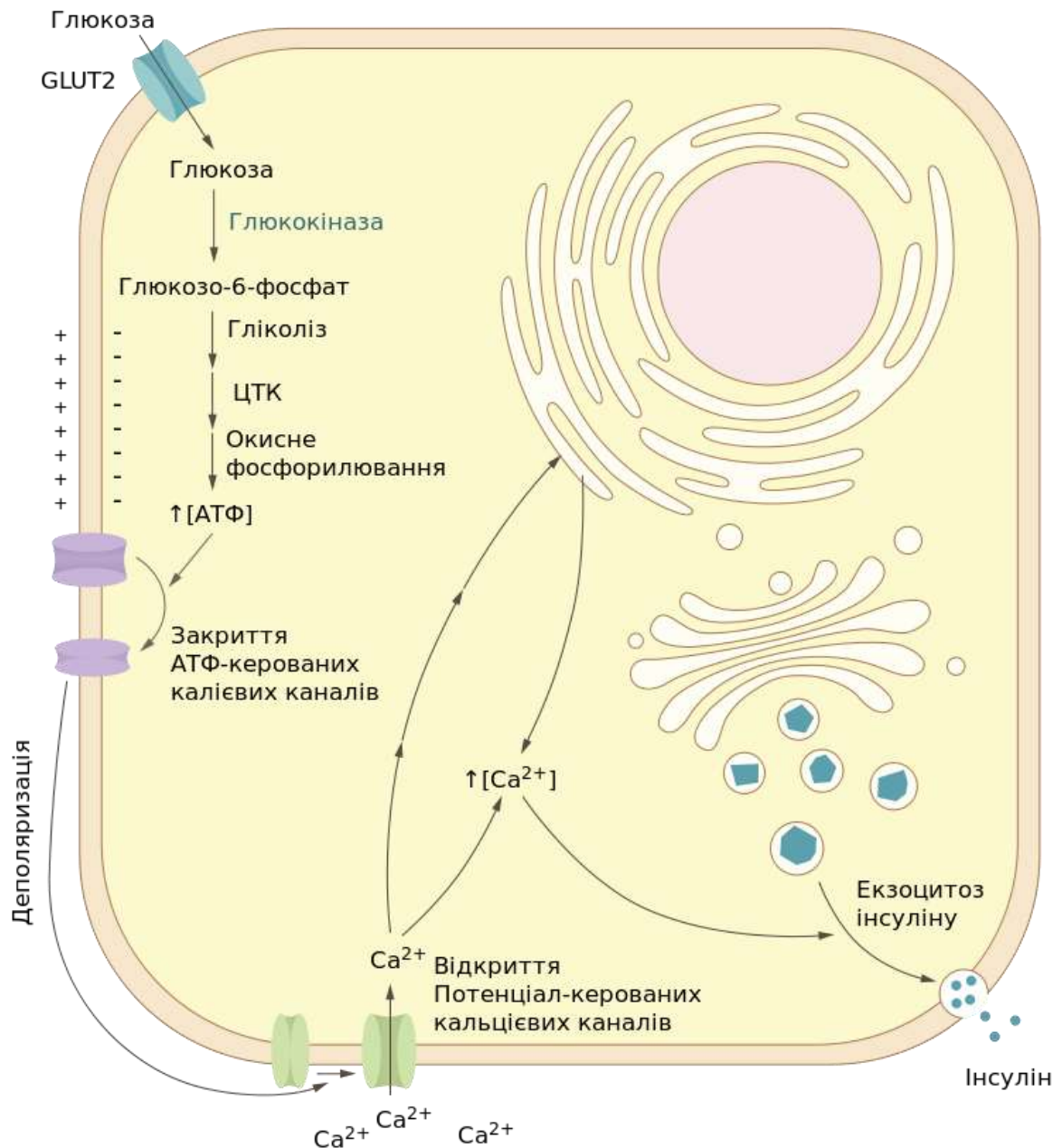


Рис. 1.6 – Схема регульованого шляху секреції інсуліну

Окрім регульованого існує так званий «конститутивний шлях» секреції інсуліну бета-клітинами, він працює за певних розладів, таких як інсулінома

та цукровий діабет другого типу. В цьому випадку велика кількість незрілого гормону (проінсуліну або проміжних «розщеплених» форм) виділяється прямо із везикул, що утворюються в ендоплазматичному ретикуліумі [13].

#### **1.4 Фізіологічна дія інсуліну**

Основна фізіологічна дія інсуліну полягає у зниженні вмісту глюкози в крові, проте вона не обмежується цим, гормон також впливає на метаболізм білків та ліпідів. Одним із визначальних ефектів інсуліну є те, що він стимулює посилення засвоєння глюкози м'язами та жировою тканиною, проте не впливає на цей процес у печінці, нирках та мозку, клітини яких можуть транспортувати глюкозу навіть за відсутності гормональної стимуляції. Також інсулін блокує ті метаболічні шляхи, кінцевим продуктом яких є глюкоза, зокрема глюконеогенез та розщеплення глікогену, і стимулює ті, в яких вона використовується. Перший пріоритет при цьому належить задоволенню енергетичних потреб, зокрема протіканню гліколізу, кінцевим продуктом якого є піруват, та подальшого окиснення пірувату до ацетил-КоА, який може бути використаний у циклі трикарбонових кислот. Залишок глюкози використовується на поповнення запасів глікогену у печінці та м'язах. У печінці інсулін також стимулює синтез жирних кислот із ацетил-коА, необхідний для цього НАДФН виробляється у пентозофосфатному шляху. Далі жирні кислоти у формі тригліцеридів транспортуються до жирової тканини. Інсулін також впливає на метаболізм опосередковано через головний мозок. Він впливає на ядра гіпоталамуса таким чином, що пригнічує споживання їжі та посилює термогенез [12].

У м'язовій тканині інсулін стимулює захоплення амінокислот і синтез білків. Залишок амінокислот перетворюється у печінці до пірувату та ацетил-КоА і використовується для синтезу жирів.

Поглинання кальцію клітинами також активується під впливом інсуліну. Тому його препарати разом із глюкозою використовують для тимчасового

зниження гіперкальціємії у пацієнтів із нирковою недостатністю. Точний молекулярний механізм такої дії інсуліну не з'ясований, проте відомо, що він може активувати  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу.

До довготривалих ефектів інсуліну на організм належить прискорення росту, що відбувається завдяки його загальному анаболічному та білок-заощаджувальному впливу. Тому у дітей із цукровим діабетом першого типу спостерігається затримка росту. Інсулін може стимулювати ріст незрілих гіпофізектомічних щурів, майже з такою ж інтенсивністю як і гормон росту за умови, якщо вони вживають велику кількість вуглеводів. Також відомо, що в культурі клітин інсулін пришвидшує клітинний поділ, подібно до пептидних факторів росту, фактор росту епідермісу, фактор росту фібробластів та тромбоцитарний фактор росту, і, окрім того, може посилювати їхній біологічний вплив [12].

### **Висновок до розділу 1**

На сьогоднішній день традиційними методами виробництва рекомбінантних інсулінів є проінсуліновий метод і дволанцюговий метод. Проінсуліновий метод був розроблений нещодавно і є більш надійним, оскільки включає менше кроків, ніж дволанцюговий метод, що робить його ефективним і рентабельним.

Бактеріальні та дріжджові системи експресії зазвичай є кращими для комерційного виробництва, але нещодавно були представлені нові організми та трансгенні рослини. У *E. coli* та *S. cerevisiae* відсутній С-пептид проінсуліну, через що виникає необхідність проведення додаткової стадії виробництва. Цей недолік обумовлює подальші дослідження фармацевтичних компаній нових систем експресії, таких як *P. pastoris*, *A. thaliana*, клітинних ліній тютюну, полуниці, салату, мезенхімальних стовбурових клітин. Використання нових підходів, таких як нанотехнології, сигнальні гормони, невірусне програмування або регуляція генів різних типів стовбурових клітин, може



бути використано для розробки клітин, що виробляють інсулін, які можуть служити ефективним варіантом лікування пацієнтів з діабетом.

## РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1 Характеристика систем експресії для отримання людського інсуліну

Основним об'єктом виробництва рекомбінантних інсулінів є система експресії, від правильного вибору якого залежить якість молекули інсуліну, метод виробництва та, відповідно, основні показники технологічного процесу для підприємства, тому детально охарактеризуємо перелічені у розділі 1 перспективні системи експресії.

#### Кишкова паличка

Система експресії *E. coli* була першою використаною для отримання людського інсуліну у 1978 р. з використанням технології рекомбінантних ДНК дволанцюговим методом. Ця система експресії є кращою для великомасштабного виробництва звичайного інсуліну короткої дії, оскільки кишкова паличка швидко росте на дешевих середовищах, з нею легко поводитись і її можна генетично маніпулювати. Однак кілька аспектів обмежують її корисність, включаючи втрату плазмід, розвиток антибіотичних властивостей, відсутність посттрансляційних модифікацій, накопичення тілець включення в клітинах, неправильне згортання, протеолітичне травлення та погану секрецію, що ускладнює відновлення білка [31].

Для вирішення означених проблем використання *E. coli* застосовують різні підходи:

1. Так, нещодавно для клонування людського інсуліну було використано новий підхід на основі ПЛР, який виключає кілька етапів, таких як афінні мітки, ренатурацію білка, етапи відновлення тілець включення та ферментативне розщеплення С-пептиду інсуліну, що робить виробництво ефективнішим [40].

2. У 2019 році Zieliński et al. повідомили про створення нового вектора експресії pIBAINS і створення 20 нових штамів *E. coli*, які забезпечують більшу ефективність виробництва рекомбінантного інсуліну на літр середовища [41].

3. Протеазодефіцитні штами *E. coli* несуть мутацію, яка усуває продукування протеази, що допомагає зменшити протеолітичну деградацію звичайного інсуліну. Штам *E. coli* BL-21 не має генів протеази *lon* (цитоплазматичний) і *ompT* (периплазматичний), і його також можна використовувати для підвищення виходу інсуліну [42].

4. Експресію гена інсуліну також можна збільшити шляхом заміни кодонів на кодони з більш високою експресією, які присутні в рідкісних штаммах *E. coli*. Таким чином, спільна експресія генів, що кодують тРНК, підвищить вихід гетерологічних білків у цій системі експресії. Штами BL-21, BL-21 CodonPlus-RIL і Rosetta включають такі кодони, як, наприклад, AGG, AGA, CGG (аргінін), AUA (ізолейцин), GGA (гліцин) і CCC (пролін). Введення цих високоекспресійних кодонів у сконструйовані штами *E. coli* може призвести до кращого виходу цільового продукту [31, 42].

5. Для попередження накопичення тілець включення в *E. coli* можна використовувати шаперони, оскільки вони допомагають запобігти агрегації білків та забезпечують повторне згортання та розчинення неправильно згорнутих білків. Звичайними шаперонами, які використовуються з цією метою є GroEL, GrpE, DnaK і тригерний фактор є [43].

### **Системи експресії дріжджів**

Дріжджі є іншою комерційно використовуваною системою експресії для виробництва гетерогенних білків за допомогою рекомбінантної технології завдяки посттрансляційної модифікації (ПТМ). Такі ПТМ включають ацилювання, фосфорилювання та N- та O-зв'язане глікозилювання білків [33]. Дріжджі можна легко виростити у біореакторах, і їх використання є економічно ефективним, що робить їх потенційним кандидатом в якості системи експресії для виробництва рекомбінантного інсуліну. Однак фактором занепокоєння при використанні дріжджів як системи експресії є те, що білки, синтезовані в дріжджах, мають N-глікозилювання з високим вмістом манози. Це скорочує період напіврозпаду рекомбінантних білків *in vivo* та активує імунну відповідь у людини, оскільки білки з такою модифікацією

вважаються чужорідними антигенами. Таким чином, перед використанням дріжджі необхідно гуманізувати шляхом модифікації шляхів їх N-глікозилювання для створення менш імуногенних продуктів для людини [34].

#### *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* комерційно використовується як дріжджова система експресії інсуліну з 1980-х років шляхом створення проінсуліну, який зв'язує ланцюги А та В за допомогою короткого синтетичного С-пептиду. Сигнальна послідовність  $\alpha$ -фактора допомагає в синтезі ланцюгів і підвищує експресію проінсуліну до 80 мг/мл [34]. Проінсулін перетворюється на активний інсулін за допомогою опосередкованої трипсином реакції транспептидації з ефіром треоніну. Так, на основі *S. cerevisiae* виробляються наступні аналоги інсуліну:

1. Швидкодіючий інсулін для лікування людини (компанією Novo Nordisk). У цьому продукті залишок у 28-му положенні ланцюга проінсуліну В був замінений на аспарагінову кислоту. Ця модифікація посилює відштовхування між ланцюгами, що, у свою чергу, зменшує самоасоціацію та сприяє дисперсії в крові [44].

2. Інсулін Детемір є аналогом тривалої дії, комерційно виробленим у 2004 р. компанією Novo Nordisk [45]. Його послідовність була змінена шляхом видалення треоніну в 30-му положенні ланцюга В разом із приєднанням жирної кислоти C14 до 29 позиція того ж ланцюга [46]. Такі модифікації допомагають інсуліну зв'язуватися з альбуміном у плазмі, що подовжує тривалість дії інсуліну до цілої доби.

#### *Pichia pastoris*

Метилотрофні дріжджі з високою клітинною щільністю *P. pastoris* також комерційно використовуються для виробництва інсуліну [35]. Особливістю цієї системи експресії дріжджів є наявність індукованої метанолом алкогольоксидази-1 (АОХ-1), яка збільшує щільність клітин за простих стратегій культивування, що особливо важливо у великомасштабному виробництві рекомбінантних білків. На відміну від *S. cerevisiae*, *P. pastoris* не гіперглікозилює свої секретовані гетерогенні білки, що є перевагою для

використання у створенні терапевтичних засобів для людини [36]. Обидві системи експресії дріжджів дійсно здійснюють N-глікозилування з високим вмістом манози, але в *P. pastoris* олігосахаридний ланцюг складається з 8-14 манозних залишків, що набагато коротше, ніж ланцюг *S. cerevisiae* із 50-150 манозних залишків. Експресія неоднорідного білка, досягнута у *P. pastoris*, становить приблизно 30% від загального білка клітини, що набагато вище, ніж у *S. cerevisiae* [35]. Такі характеристики роблять *P. pastoris* привабливою системою експресії для використання в комерційному виробництві рекомбінантного інсуліну людини та його аналогів.

### **Трансгенні рослини**

Останнім часом інтерес у цій галузі викликає виробництво рекомбінантних або гетерогенних білків із трансгенних рослин, які мають перевагу низької вартості та високої якості білка [47]. Рослини не мають людських патогенів, і оскільки вони є еукаріотичними, їхні механізми ПТМ більш схожі на людські, ніж раніше описані в дріжджах [48]. Механізм виробництва людського інсуліну в трансгенних рослинах показаний на рис. 2.1.

#### *Arabidopsis thaliana*

Завдяки останнім експериментам ген людського інсуліну був успішно експресований в олійних культурах рослини *Arabidopsis thaliana*. Ця рослина має короткий період генерації майже 6 тижнів і може легко рости в лабораторних умовах з обмеженим сонячним світлом. Геном *A. thaliana* повністю відомий, що полегшує подальші дослідження виробництва рекомбінантного інсуліну. Кожна рослина здатна генерувати приблизно від 10 000 до 30 000 насінин.

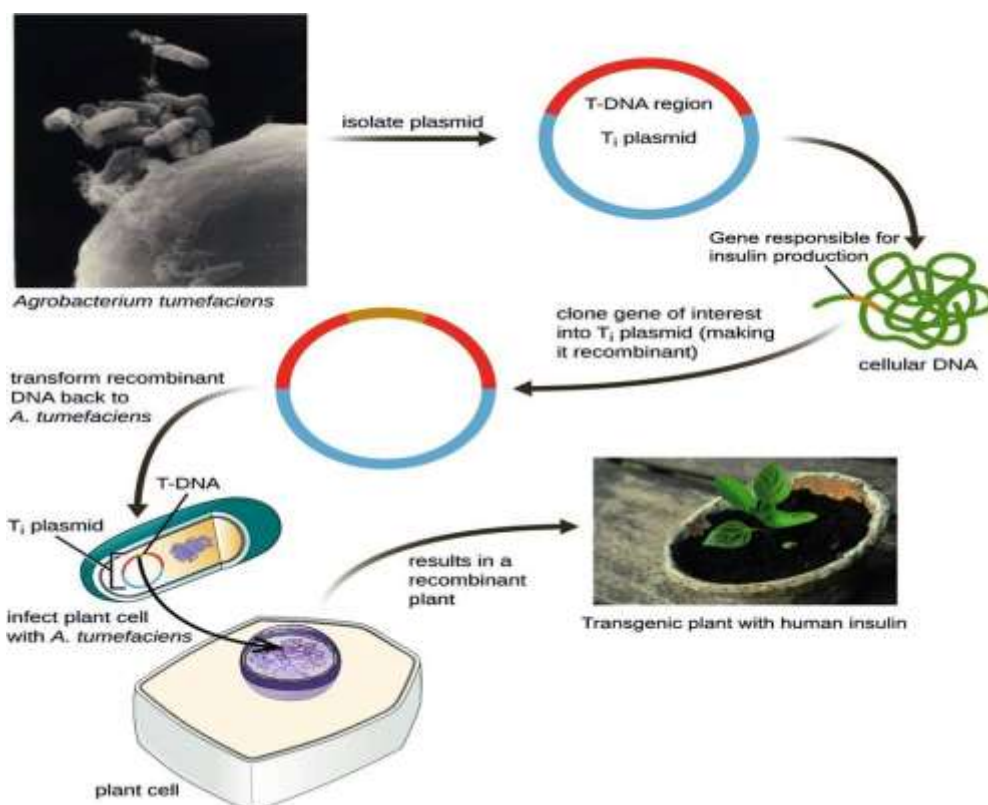


Рис. 2.1 – Механізм отримання інсуліну на основі трансгенної рослини за допомогою *Agrobacterium*

Інсулін експресується в субклітинних органелах масляних тілець, що, разом із високою кількістю білка, полегшує його відновлення. Усередині насіння олійних культур масляні тільця інкапсульовані гідрофобною триацилгліцерин-фосфоліпідною мембраною, а їх зовнішня стінка складається з олеозинів. Ці олійні тільця можна легко відокремити від інших компонентів насіння за допомогою методів поділу фаз рідина-рідина, що зменшує потребу в хроматографічних етапах очищення інсуліну. Експериментальні результати показали, що накопичення інсуліну в трансгенному насінні становить до 0,31% від загальної кількості білків насіння [48]. Розщеплення трипсином використовується для відщеплення олеозину від масляних тілець, що є технологічно легкорезалізуємим.

#### *Рослини тютюну та салату*

Рослина тютюну демонструє вищу схожість насіння та виживаність, тоді як рослина салату широко споживається в усьому світі та є дуже привабливою

системою експресії [49]. Хлоропласти цих рослин використовуються для синтезу проінсуліну. Ланцюги інсуліну (А і В) і С-пептид зливаються з субодиницями холерного токсину В. Опубліковані дані показують, що старе листя рослин тютюну містить майже 47% проінсуліну від загальної кількості білків листя. У старих листках салату до 53% загальних білків листя було зареєстровано як проінсулін [50]. Виявлено, що екстрагований інсулін є дуже стабільним і має до 98 % чистоти при розщепленні обробкою протеазою для вивільнення пептидів інсуліну. Пероральна доставка рослинних клітин також показує подібні результати, як комерційно доступний інсулін. Зареєстрований вихід проінсуліну цими рослинами становить 3 мг/г листя, що вказує на те, що один акр таких рослин може виробляти 20 мільйонів добових доз інсуліну щороку [48].

#### *Полуниця*

Полуниця (*Fragaria ananassa* Duch.) є одним із найбільш значущих і популярних фруктів у світі та містить кілька вітамінів, мінералів, антоціанів і незамінних амінокислот, які позитивно впливають на людину [51]. Їстівна природа полуниці робить її корисною в якості рослини для виробництва інсуліну, оскільки його можна використовувати як носій для перорального введення. Також полуниця містить левульозу, яка швидко засвоюється і розкладається в організмі і не впливає на хворих на діабет [52]. Тому слід вивчити полуницю, щоб визначити, чи пероральне введення інсуліну є життєздатним варіантом для людей з діабетом. Згідно з правилами успадкування Менделя, якщо ген доставляється в ядро рослинної клітини, принаймні одна чверть рослини буде нетрансгенною в наступному поколінні [53]. Однак наявність у рослин полуниці пагонів, які є клонами материнської рослини, дозволяє кожному поколінню мати материнську рослину [52]. Завдяки цим якостям полуниця є перспективною системою експресії для трансформації гена проінсуліну людини та виробництва рекомбінантного білка.

У недавньому дослідженні проводили інфікування експлантів полуниці (листя, черешки та бруньки) модифікованими *A. rhizogenes* та *A. tumefaciens* які містили гени, що продукують інсулін. Волохаті корені, які виростили в результаті обробки *A. rhizogenes*, пересівали в біореактор протягом кількох днів, а експланти, заражені *A. tumefaciens*, мікророзмножували. Передачу та експресію генів інсуліну у волосистих коренях і регенерованих рослинах аналізували за допомогою ПЛР, RT-PCR та ELISA. Крім того, проінсулін був очищений з трансгенних рослин і волосистих коренів і введений діабетичним щурам, завдяки чому вдалося значно знизити рівень цукру в крові у цих щурів [53].

### **Роль стовбурових клітин у лікуванні діабету**

Стовбурові клітини - це спеціалізовані клітини, які з часом розвиваються у тканини і органи тіла. Протягом усього свого життя організм використовує стовбурові клітини для відновлення пошкоджених тканин і клітин, оскільки вони можуть самооновлюватися та диференціюватися. У різноманітних дослідженнях з можливості їхнього використання у виробництві інсулінів використовували ембріональні стовбурові клітини (ЕСК), мезенхімальні стовбурові клітини (МЗК) та індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК) (рис. 2.2) [54].

#### *Ембріональні стовбурові клітини (ЕСК)*

ЕСК можуть розвиватися в клітини ентодерми, мезодерми та ектодерми та екстрагуються з бластоцист. Коли ЕСК трансплантують діабетичним мишам, вони можуть розвинути в клітини, що виробляють інсулін, які можуть вивільняти інсулін у відповідь на стимуляцію глюкозою та відновлювати правильний рівень глюкози в крові. Людські ЕСК також можна диференціювати в ендокринні клітини, однак це несе в собі ризик сприяння утворенню пухлини [55].



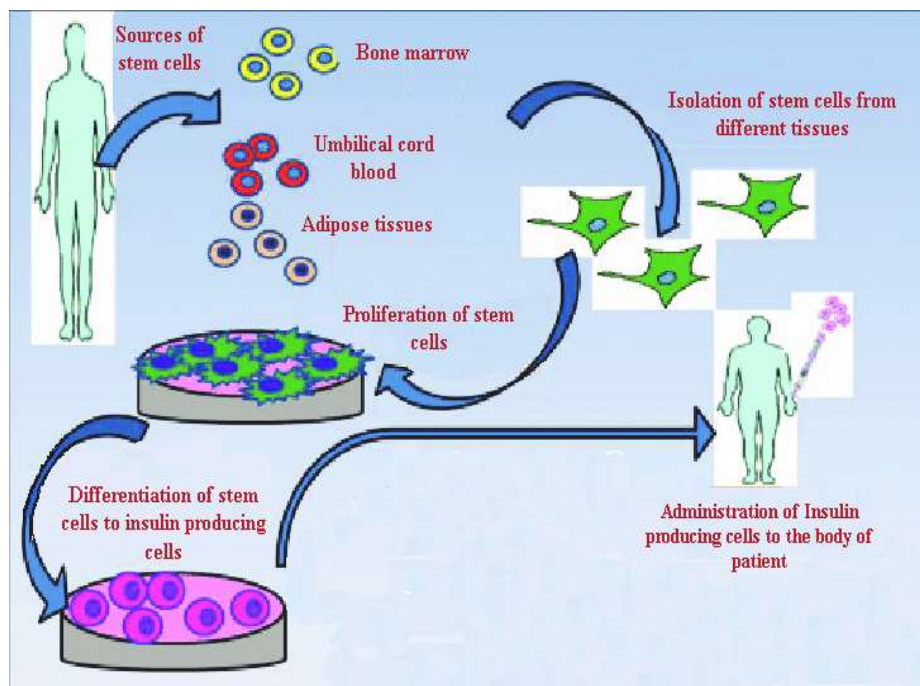


Рис. 2.2 - Механізм виділення та диференціації різних типів стовбурових клітин до клітин, що продукують інсулін людини

#### *Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (іПСК)*

Подібно до ЕСК, іПСК мають невизначену здатність до самовідновлення та здатність диференціюватись у широкий діапазон типів клітин. Недиференційовані іПСК можна підтримувати як клітинні лінії, що має величезний потенціал для моделювання захворювання та розробки аутологічних клітинних терапій. іПСК, отримані з фібробластів шкіри миші, змогли розвинути в  $\beta$ -подібні клітини, які можна порівняти з природними ендогенними клітинами, що секретують інсулін, і допомогли діабетичним мишам регулювати гіперглікемію. Людські ЕСК та іПСК були перетворені у зрілі клітини підшлункової залози, здатні секретувати інсулін та С-пептид. Клітини, що продукують інсулін, також вирощували *in vitro* з іПСК з використанням невеликих хімічних речовин і факторів росту [56].

#### *Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК)*

МСК можна екстрагувати з жирової тканини, мобілізованої периферичної крові, печінки плоду, періодонтальної зв'язки, пуповинної крові, плаценти, фетальної легені, пульпи зуба, пуповини, синовіальної

оболонки, ендометрія, компактної кістки, трабекулярної та зубної пульпи, синовіальної оболонки, ендометрію, періодонтальної зв'язки, трабекулярної та компактної кістки. МСК можуть диференціюватися в мезодермальні, ентодермальні та навіть ектодермальні клітини при культивуванні за правильних умов. Вони можуть секретувати фактори росту та імунізаційні цитокіни під час трансплантації. МСК також вводили безпосередньо в підшлункову залозу як клітини, що створюють нішу, що допомогло полегшити симптоми діабету на тваринних моделях шляхом покращення метаболічної регуляції, протидії аутоімунітету, посилення приживлення та виживання острівців, а також виступаючи джерелом факторів росту та цитокінів. Ін'єкції МСК покращують функцію підшлункової залози, а також полегшують такі симптоми, як діабетична стопа, нефропатія та нейропатія [57].

#### *Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку*

МСК, отримані з кісткового мозку людини, можуть зберігатися *in vitro* протягом 44 тижнів без втрати своїх морфологічних, фенотипових, функціональних або каріотипових особливостей. МСК з кісткового мозку пригнічують імунологічну відповідь Т-клітин на щойно згенеровані  $\beta$ -клітини. Як наслідок, терапія стовбуровими клітинами може бути найефективнішим методом лікування хворих на діабет 1 типу. Стовбурові клітини мігрують до ушкодженої ділянки, розвиваються та починають структурну та функціональну репарацію, що допомагає в лікуванні діабету та нормалізації рівня інсуліну. Клітини кісткового мозку миші перетворилися на функціональні  $\beta$ -клітини в експерименті *in vivo* [58].

#### *Стромальні клітини жирового походження (СКЖП)*

Стромальні клітини жирового походження (СКЖП), також відомі як жирові тканини, виділені з ліпоаспіратів людини, можуть бути отримані у великих кількостях і мають здатність до диференціювання. При вирощуванні СКЖП у середовищі, що містить фактор росту фібробластів, вони виробляли маркери, такі як мРНК *Isl1*, які необхідні для утворення клітин панкреатичних острівців. Кілька досліджень показали, що СКЖП з придатка яєчка миші

можуть розвиватися в клітини, які експресують PDX1, Ngn3, NeuroD, Pax4, Glut2 і виробляють інсулін і С-пептид. Після 38 днів спільного культивування з острівцевими клітинами було показано, що СКЖП диференціюються в іПСК. Порівняно з окремою трансплантацією острівців або спільною трансплантацією острівців і диференційованих клітин, комбінування диференційованих СКЖП і острівцевих клітин призвело до кращого лікування діабету [59].

#### *Мезенхімальні стовбурові клітини пуповинної крові людини*

МСК з пуповинної крові та необмежені соматичні стовбурові клітини з пуповинної крові можуть розвиватися в іПСК з тими ж клітинними маркерами та характеристиками, що й мультипотентні дорослі клітини-попередники. Після інкубації в середовищі, яке не містить конкретних цитокінів або факторів росту, окрім фетальної телячої сироватки, клітини пуповинної крові експресують гени, необхідні для диференціювання в ендокринну тканину підшлункової залози, включаючи Isl1, PDX1, Pax4 та Ngn3 [13]. In vitro та in vivo інсулін і С-пептид вивільнялися іПСК, створеними з МСК з пуповинної крові, у відповідь на виклик глюкозою. Після внутрішньовенної ін'єкції МСК з пуповинної крові 25 мишам з діабетом 1 типу покращилися глікемічні профілі разом із гістологічними покращеннями в острівцях [60]. МСК з пуповинної крові є широко доступними, мають мінімальний ризик імунологічного відторгнення та демонструють покращені можливості для росту та диференціації в іПСК, що робить їх життєздатним вибором для лікування діабету.

## **Висновок до розділу 2**

Найкращими для комерційного виробництва рекомбінантних інсулінів є бактеріальні та дріжджові системи експресії. Але у *E. coli* та *S. cerevisiae* відсутній С-пептид проінсуліну, через що виникає необхідність проведення додаткової стадії виробництва, тому проводяться дослідження з пошуку нових ефективних систем експресії, таких як *P. pastoris*, *A. thaliana*, клітинних ліній

тютюну, полуниці, салату. Так, при використанні трансгенних рослин відсутня стадія постферментаційної обробки проінсуліну, також вони можуть забезпечити більш високий рівень експресії білка. Також проводяться дослідження з використання мезенхімальних стовбурових клітин. Але, незважаючи на те, що людські МСК можуть бути диференційовані у функціональні клітини підшлункової залози *in vitro*, швидкість трансдиференціації обмежена, а тривалість функціональної підтримки *in vivo* оцінити складно. Враховуючи відсутність визначених протоколів для росту та виробництва клітин, що секретують інсулін, клінічні результати є суперечливими. Хоча, використання нових підходів, таких як нанотехнології, сигнальні гормони, невірусне програмування або регуляція генів різних типів стовбурових клітин, може бути використано для розробки клітин, що виробляють інсулін, які можуть служити корисним варіантом лікування для пацієнтів з діабетом.

## РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 3.1. Аналіз систем експресії для виробництва інсулінів

Гуманізована експресія генів є кращою в еукаріотичних системах, ніж у прокаріотичних. Ген людського інсуліну, який є еукаріотичним, не може бути негайно перенесений в прокаріотичну систему експресії, оскільки ген містить інтрони, які повинні бути сплайсовані перед трансляцією, після чого потрібно провести посттрансляційні модифікації для створення активного продукту інсуліну. Замість цього створюється кДНК потрібного гена, яка потім вводиться в прокаріотичну клітину. Історично *E.coli* була улюбленою прокаріотичною системою експресії для великомасштабного виробництва рекомбінантного білка через її легкість генетичної модифікації, економічну ефективність і високі темпи росту та синтезу рекомбінантного білка. Однак ця система експресії включає велику кількість незвичайних кодонів і має високу частоту помилок трансляції, таких як амінокислотні заміни, передчасне припинення трансляції та мутації зі зсувом рамки. У випадку терапевтичних білків, таких як інсулін, такі помилки можуть погіршити якість, викликаючи імуногенну реакцію у людей [61]. Посттрансляційна модифікація, втрата плазмід, антибіотичні властивості та подальші процедури для вилучення необхідних білків із шаперонів є одними з недоліків використання системи експресії *E. coli*.

Гуманізовані системи експресії дріжджів, які використовують одноклітинні організми з еукаріотичними процесами посттрансляційної модифікації, можуть бути використані для подолання вищезгаданих обмежень. У великих масштабах дріжджі можна легко підтримувати за допомогою основного середовища. Серед видів дріжджів *S. cerevisiae* відіграє вирішальну роль, зокрема у виробництві аналогів проінсуліну. Було описано, що природні плазмідні мають сильні споріднені промотори. Вони виробляють лише кілька білків. Незважаючи на високу кількість копій і наявність LUE2,

дріжджові епісомальні плазмідні найчастіше використовуються для виробництва. *S. cerevisiae* використовується для виробництва інсуліну аспарт, похідного інсуліну швидкої дії. *P. pastoris*, з іншого боку, є кращим вибором для промислового виробництва через його плазмідну деградацію та менший ступінь гіперглікозилювання. У методах бактеріальної та дріжджової експресії загальний просторово-часовий вихід є подібним, хоча дріжджі, зокрема *P. pastoris*, є більш доцільними [62].

Оскільки трансгенні рослини не містять захворювань людини, вважають, що вони є більш безпечним методом експресії людського інсуліну. Насіння *A. thaliana*, листя тютюну та салату, а також кореневі волоски суниці належать до трансгенних рослин, які вивчаються для використання у виробництві проінсуліну. Фізіологічно активний інсулін можна легко виділити з субклітинних масляних тілець насіння *A. thaliana* за допомогою рідкофазної хроматографії [63]. У більшому масштабі можна застосовувати ферментативне очищення. Ударостійкість і низька вартість насіння як біореактора є двома найважливішими перевагами. Однак труднощі зі стабільністю білка залишаються ключовою проблемою при використанні систем експресії рослин. Для подолання цієї проблеми як проінсулінові біореактори було обрано листя тютюну та салату. Тютюн забезпечує захист від забруднення харчового ланцюга, тоді як салат – ні. Однак механізм експресії на основі хлоропласту, який використовується в обох рослинах, має вплив хлоропластного глюкану, глікозилювання, не властиве людині, і може вимагати посттрансляційної модифікації. Як наслідок, перед використанням таких систем експресії виникає необхідність змін у методах виробництва [63]. Полуниця є ще однією інтригуючою рослиною для синтезу проінсуліну, і її кореневі волоски вивчаються як біореактор. На даний момент це найбезпечніший варіант, оскільки відсутні гени втікачі, тобто відсутня можливість переміщення генетичного матеріалу від генно-інженерного організму до іншої популяції чи іншого виду [52]. Але, використання цієї

рослини як системи експресії може викликати алергічні реакції у людей через вживанні всередину.

Ембріональні ствольні клітини (ЕСК) є популярною мішенню для дослідників, оскільки вони виробляються з невикористаних або незапліднених ембріонів у клініках екстракорпорального запліднення, але є кілька обмежень у використанні цих клітин. Їх слід використовувати лише для клінічних досліджень за попередньою згодою донора. Однак у більшості випадків клітини ембріона отримують шляхом знищення ембріона, що викликає етичні сумніви щодо походження життя та права на знищення ембріона. ЕСК людини можуть бути диференційовані в ендокринні клітини, але тоді вони також можуть сприяти росту пухлини [64].

Відсутність етичних питань і мінімальна ймовірність розвитку тератоми є двома перевагами використання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (ІПСК). Найпоширенішим методом трансформації соматичних клітин в ІПСК є використання вірусної трансфекції факторів транскрипції. Використання шкідливих геномів, які можуть спричиняти мутації та впливати на нормальну функцію ІПСК, здатність до диференціації та пухлиноутворення, є важливим недоліком цієї технології. Подібним чином мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) рідко спонтанно диференціюються в тканині хазяїна. Таким чином, їх терапевтична корисність залежить від здатності регулювати їх *in vivo* диференціювання у функціональні клітини з високою ефективністю та чистотою. Крім того, МСК можуть розвиватися в небажані мезенхімальні лінії, що може обмежити їх терапевтичну ефективність [65].

### **3.2 Аналіз методів виробництва рекомбінантних інсулів**

На сьогоднішній день у виробництві рекомбінантного інсуліну використовують дві технології. Перша технологія передбачає синтез проінсуліну, друга – альтернативна, побудована на використанні

дволанцюгового методу, при якому ланцюги А та В інсуліну виробляються окремо.

### **Виробництво інсуліну із синтезом проінсуліну (рис. 3.1)**

Отримання посівного матеріалу

Частіше за все як систему експресії використовують рекомбінантну *E. coli*, за допомогою якої отримують достатню кількість проінсуліну. Цей рекомбінантний білок отримують шляхом включення плазмід, що продукують проінсулін, у *E. coli*. Потім трансформовані клітини вирощують на триптонному соєвому бульйоні, що містить антибіотик канаміцину моносульфат. Плазміда містить ген стійкості до моносульфату канаміцину разом із генами, що кодують проінсулін, тому трансформована кишкова паличка може виживати в бульйоні, так як моносульфат канаміцину вбиває клітини *E. coli*, які не були трансформовані [66].

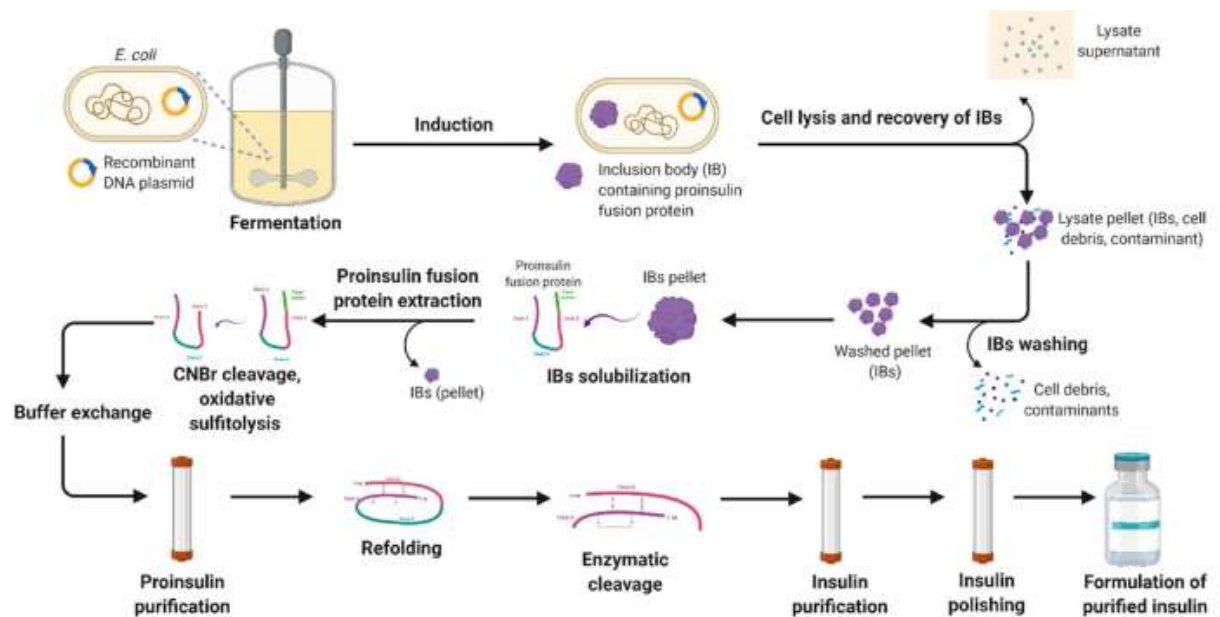


Рис. 3.1 – Етапи виробництва рекомбінантного людського інсуліну та його аналогів (із синтезом проінсуліну)

Після отримання трансформованої *E. coli* наступною метою є збільшення кількості клітин для ініціювання виробництва тілець включення проінсуліну. З цією метою вихідні трансформовані клітини, вирощені в



триптонному бульйоні та моносультаті канаміцину, потім інокують і вирощують у біореакторі за контрольованих параметрів для максимізації виробництва інсуліну.

#### Масштабування та ферментація

На етапі масштабування культури шість пробірок об'ємом 200 мл використовуються для вирощування 0,5 г первинних трансформованих клітин *E. coli* в 1 л розчину триптон-соевого бульйону з 0,5 г моносультату канаміцину. У пробірках культуру інкубують протягом 24 год при 37 °C.

Через 24 год вирощену *E. coli* передають до біореактору загальним об'ємом 23 л і робочим об'ємом 16 л: 1 л культуральної рідини з кишкової палички додають до 9 л середовища (клітини отримують вуглець з гліцерину, глюкози, дріжджового екстракту, азот із пептону, сульфату амонію, тіаміну, неорганічні поживні речовини з дигідрофосфату калію та дикалійфосфату, які також діють як буфери для підтримки рН). До середовища додають мікроелементи - цитрат натрію, сульфат магнію та розчин вітамінів [67].

При вирощуванні культури на всіх етапах контролюють приріст біомаси шляхом вимірювання її щільності. Умови всередині біореактора контролюються біосенсорами. Ці параметри включають контроль температури (37°C), рН (7), піноутворення, подачу живильних компонентів, рівень кисню (підтримується на рівні 30% і підтримується шляхом регулювання кількості подачі гліцерину). Кишкова паличка досягає максимального зростання протягом 28 год, після чого культуральну рідину передають на стадію виділення центрифугуванням.

#### Виділення клітин шляхом центрифугування

Виділення клітин є першим кроком у отриманні інсуліну, виробленого трансформованими клітинами *E. coli*. Цей процес також називають збиранням клітин. Оскільки кишкова паличка має найвищу щільність серед усіх компонентів середовища для росту, бактеріальні клітини осідають на дно після центрифугування при відносному центробіжному прискоренні 7500 x g

(швидкість обертів - 8185 об/хв) протягом 10 хв. Потім супернатант відкидають, а осад передають на подальшу обробку.

#### Лізис клітин шляхом гомогенізації

Тільця включення проінсуліну, присутні всередині клітини, містять продукти-попередники інсуліну у формі злитих білків проінсуліну. Оскільки ці білки присутні в щільних агрегатах, вони захищені від переробки в розчинну форму в цитоплазмі. Для вивільнення цих тілець включення доступні різні методи руйнування клітинної мембрани. У цьому конкретному процесі використовується гомогенізація під високим тиском за допомогою гомогенізатора лопатевого типу та обробка лугом.

Бактерії та середовище вводять у камеру гомогенізатора високого тиску з інтенсивною швидкістю, і в результаті, коли суміш натикається на лопаті всередині камери, створюється умова високої турбулентності та зсуву, що призводить до стиснення, прискорення, і падіння тиску. Через ці сили клітинна мембрана руйнується, вивільняючи цитоплазматичний вміст. Однак молекули проінсуліну залишаються непошкодженими. Тиск, що забезпечується гомогенізатором, становить 45 000 PSI (310263517 Па) зі швидкістю потоку 150 мл/хв. Таким чином, відбувається гомогенізація 3 л суспензії клітин (осаду) і середовища за 20 хв. Після гомогенізації проінсулін необхідно відокремити від залишків клітин і внутрішньоклітинного матеріалу.

#### Відокремлення тілець включення центрифугуванням

Після лізису *E. coli* необхідно виділити тільця включення від уламків клітин. Для цього можна використовувати центрифугування при зворотньому осмосі. Оскільки тільця включення проінсуліну щільні, вони опускаються на дно. Однак швидкість центрифугування має бути вищою (15000 x g протягом 30 хв), ніж раніше, оскільки тільця включення мають меншу щільність, ніж інтактні бактеріальні клітини. Після центрифугування супернатант відкидають, а проінсулін і деякі домішки залишаються [68].

#### Солубілізація тілець включення та розщеплення проінсуліну

Після відділення тілець включення проінсулін знаходиться в нерозчинній формі і тому повинен бути розчинений. Це досягається шляхом додавання денатуруючих агентів, таких як сечовина або гуанідієва соляна кислота, які вивільняють злиті білки. Для розриву дисульфідних зв'язків, присутніх у злитих білках проінсуліну, цей процес супроводжується додаванням  $\beta$ -меркаптоетанолу та дитіотреїтолу (ДТТ), які є відновниками.

У традиційній процедурі проінсуліну після солюбілізації виконується стадія розщеплення для отримання проінсуліну. Цей крок також можна виконати пізніше під час обробки. Він передбачає додавання бромиду ціаногену та 70 % мурашиної кислоти для розщеплення пептидного лінкера між проінсуліном та злитим білком.

#### Сульфітоліз проінсуліну

Сульфітоліз спочатку включає розрив дисульфідних зв'язків шляхом додавання відновників. Ці зв'язки розриваються під час солюбілізації або інших попередніх етапів очищення. Процес сульфітолізу виконується разом із 6-годинним розчиненням і додається 0,8 М  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  і 0,3 М  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  для полегшення окислення та підтримки розгорнутої форми проінсуліну. Іони сульфіту ( $\text{SO}_3$ ) додаються до молекул цистеїну, що запобігає утворенню неправильних дисульфідних зв'язків. Усі залишки цистеїну в молекулі проінсуліну мають додані сульфітні іони. Однак хвіст ZZ не має залишків цистеїну, тому він залишається незмінним і використовується в подальших процесах.

#### Додаткове відділення

Перед ренатурацією домішки та реагенти від солюбілізації та сульфітолізу необхідно видалити за допомогою центрифугування при 17700 x g протягом 33 хв [69].

#### Діаліз

Цей процес використовується для видалення раніше використаних денатурантів і розчинених реагентів без хімічної модифікації злитого білкового продукту. Він передбачає додавання буферів, таких як 10 mM Tris-

HCl (4 повторення), для видалення реагентів, включаючи сечовину, ДТТ і  $\beta$ -меркаптоетанол, і ініціювання процесу рефолдингу злитого білка проінсуліну [41].

#### Рефолдинг проінсуліну

Процес ренатурації включає правильне згортання білків, яке значною мірою залежить від правильного утворення дисульфідних зв'язків. Ренатурацію проводять протягом 20 год при 4 °C з додаванням 1М буфера гліцин-гідроксид натрію (pH 10,5 або вище) і  $\beta$ -меркаптоетанолу в молярному співвідношенні 18:1 до злитого білка. Існує кілька доступних методів. Двома широко використовуваними методами є:

- використання окислювальних буферів, таких як низькомолярний трис-HCl або гліцин-гідроксид натрію, для окислення відновленого проінсуліну
- перетворення проінсуліну в S-гексасульфовану форму шляхом сульфотіолізу за допомогою сульфату натрію з подальшим додаванням окисно-відновних реагентів, таких як цистеамін, глутатіону або цистеїну [70].

Правильне згортання є критичним фактором, що визначає вихід продуктів проінсуліну.

Процес денатурації з подальшою ренатурацією з відновленням дисульфідних зв'язків між ланцюжками амінокислот називається рефолдингом. Фактори для оптимізації рефолдингу включають використання прискореної швидкості окислення, основний pH 9 і високу концентрацію окисно-відновних реагентів. Навіть за оптимізованих умов вихід становить від 60 % до 70 %. Тому цей етап виробничого процесу потребує подальших досліджень [68, 70].

#### Концентрування проінсуліну

Після ренатурації реагенти та буфери, які використовувалися, необхідно видалити, щоб можна було виділити продукт проінсуліну. Це можна зробити шляхом додавання слабкої кислоти для регулювання pH з подальшим центрифугуванням при 17700 x g протягом 33 хв. Альтернативним методом може бути седиментація [70].

### Афінна хроматографія проінсуліну

Було підраховано, що більше половини вартості виробництва інсуліну витрачається на подальші процеси очищення, а не на вирощування трансформованих бактерій. Таким чином, методи очищення повинні бути ефективними за часом і витратами, а також забезпечувати високий вихід продукту, який є достатньо чистим для використання людиною. Цей процес передбачає зменшення об'єму за допомогою сайт-специфічної хроматографії розщеплення інсуліну при проінсуліновому методі [69].

Цей метод передбачає очищення ZZ-R проінсуліну за допомогою афінної хроматографії з використанням колонки IgG-Sepharose. При цьому використовують оцтову кислоту з рН 8 у вигляді супернатанту, що отримують центрифугуванням протягом 20 хв перед використанням. 50 мл розчину завантажують зі швидкістю потоку 3 мл/хв, що означає, що приблизно 2,5 г ZZ-R проінсуліну буде пропущено через колонку діаметром HR16/10, яка містить 12 мл IgG-сефарози. Розчин додають загалом 6 разів, і в останні три завантаження використовують 10 мМ ацетату натрію з рН 8.

Результати афінної хроматографії проглядають за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі SDS-PAGE на гомогенному 12 % гелі. Він передбачає використання ексклюзійної хроматографії на колонці Superdex 75 PC3.2/10 з додаванням 200 мМ натрій-фосфатного буфера зі швидкістю потоку 100 мл/хв. ZZ-R проінсулін стійкий до розкладання протеазами при проходженні через афінну хроматографію. Потім його додатково очищають за допомогою ексклюзійної хроматографії, ступінь відновлення якої становить 70 %. Більша частина відновленого проінсуліну є мономером, але в невеликих кількостях також присутні і інші форми ZZ-R проінсуліну.

### Сайт-специфічне розщеплення проінсуліну

Після хроматографії очищений ZZ-R проінсулін піддається ультрафільтрації, яка зменшує його об'єм у 5 разів, збільшуючи його концентрацію до 12 мл/хв. Після ультрафільтрації відбувається розщеплення проінсуліну на С-пептид та інсулін за допомогою трипсину та карбоксипептидази В. Трипсин використовується для розщеплення білка в травній системі, тоді як карбоксипептидаза використовується для розщеплення проінсуліну в певному місці для перетворення проінсуліну в нативний інсулін і С-пептид. Використовується приблизно 1:1000 за масою трипсину до ZZ-R проінсуліну, тоді як кількість карбоксипептидази В вдвічі перевищує кількість ZZ-R проінсуліну. Ферментативну реакцію залишають на 30 хв, після чого її зупиняють додаванням трифтороцтової кислоти, карбонової кислоти і загального буфера при рН 3. Додають також 20 % ацетонітрил. Отриманий розчин зберігають при 4 °С перед подальшим очищенням за допомогою хроматографії з оберненою фазою [66].

Очищення інсуліну (обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія)

Обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія (ОФ-ВЕРХ, *reverse-phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC) використовується для розділення С-пептиду та людського інсуліну. ОФ-ВЕРХ є поширеним методом аналізу продуктів інсуліну, оскільки він може розділяти інсулін на різні види, а використання високого тиску збільшує швидкість процесу та чистоту продукту. ОФ-ВЕРХ включає неполярну стаціонарну фазу та полярну рухому фазу. Оскільки інсулін неполярний і великий, він прилипає до колонки нерухомої фази, тоді як рухома фаза містить метанол або ацетонітрил у буферному розчині для аналізу інсуліну. Довжина хвилі, яка використовується для виявлення інсуліну, становить від 190 до 220 нанометрів. За допомогою цього методу зручно розділити обидва ланцюга інсуліну. Для ланцюга А використовується трифтороцтова кислота, тоді як для ланцюга В використовується мурашина кислота. Однак для виділення С-

пептиду найкращою технікою є гель-хроматографія з 1 М оцтовою кислотою як буфером [69].

#### Комплексоутворення інсуліну з цинком

Мета під час введення інсуліну - прискорити час його активації та подовжити години пік. При використанні звичайного інсуліну, R-інсуліну (regular insulin), час активації становить 30-60 хв, а пік досягається через 2-4 год після введення. Це означає, що потрібно приблизно від 4 до 6 ін'єкцій щодня. Основними методами продовження активності інсуліну є пригнічення його негайного використання клітинами, запобігання його виведенню печінкою та стабілізація його в кровотоці [71].

Eli Lilly and Co. розробили метод, який вимагає лише 2 ін'єкцій інсуліну щодня для людей, які ведуть активний спосіб життя. Вони використовували іони цинку для утворення кристалічних комплексів з інсуліном, названих 2Zn інсуліном, які мають гексагональну конфігурацію, демонструючи осьову симетрію, отже сповільнюючи вивільнення інсуліну в організмі та запобігаючи його негайному використанню клітинами. З цією метою також можна використовувати кобальт. Ці металеві іони утворюють слабкі іонні зв'язки з інсуліном, змушуючи молекули інсуліну збиратися й утворювати зважені кристали. Утворення кристалів досягається шляхом періодичної кристалізації, і розчин зберігається при 4°C. Чим кращий і регулярніший кристал, тим довше він може залишатися активним у кровотоці.

Крім того, кристалізація з цинком може допомогти зменшити дефіцит цинку, який зазвичай зустрічається у людей з діабетом. Крім того, інсулін природним чином зберігається у вигляді гексамерів цинку в бета-клітинах острівців Лангерганса. Зазвичай 70 % комплексного кристалічного інсуліну змішують з 30% мономерного інсуліну, що дозволяє організму негайно використовувати мономерний інсулін, тоді як комплексний інсулін виділяється повільно протягом тривалого періоду [45, 70].

*Альтернативна дволанцюгова технологія виробництва інсуліну (рис. 3.2)*

Другим комерційним методом виробництва інсуліну є дволанцюговий метод, за якого ланцюг А та ланцюг В інсуліну виробляються окремо, а потім зливаються (рис. 3.20). Обидва поліпептиди культивуються в бактеріях у двох різних ферментерах, а потім очищаються. Потім очищені ланцюги А і В інкубують в умовах окислення для утворення дисульфідних зв'язків, які присутні в інсуліні людини [29].

#### Виділення гена

Молекули комплементарної ДНК (кДНК), що кодують ланцюг А і ланцюг В, отримують з мРНК людського інсуліну за допомогою зворотної транскрипції. кДНК обох ланцюгів ампліфікують методом ПЛР.

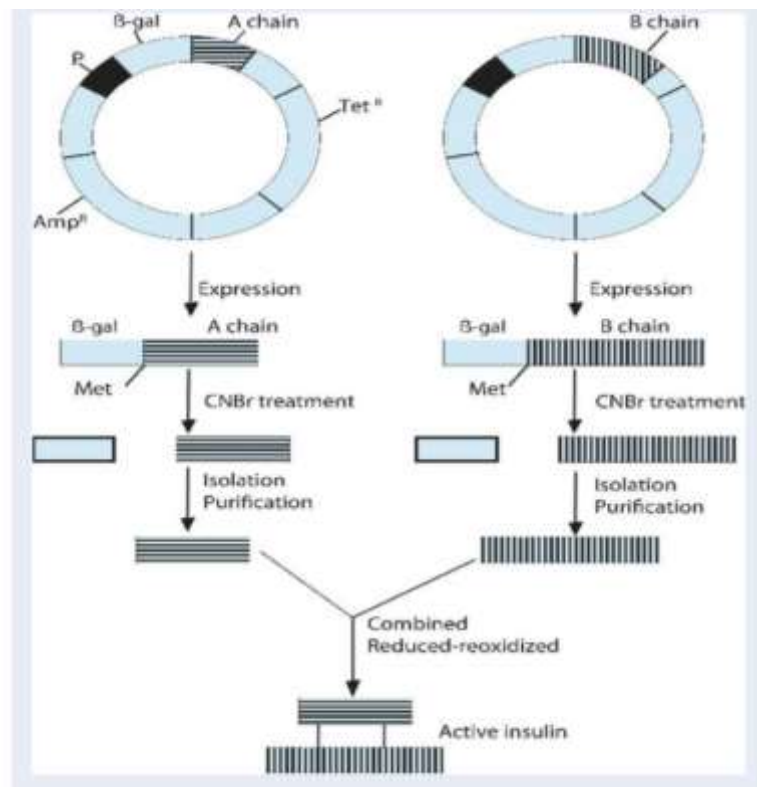


Рис. 3.2 – Схема виробництва інсуліну дволанцюговою технологією



### Створення плазмід

Дві плазмиди розрізають за допомогою ферментів рестрикції для вбудування окремо послідовності ДНК для ланцюга А або ланцюга В. Кожен ланцюг подовжується кодоном ініціації ATG на 5'-кінці для початку процесу трансляції, тоді як сигнал термінації присутній на плазміді на 3'-кінці сайтів рестрикції. Сайти рестрикції EcoR1 і BamH1 містять один із генів ланцюга в обох плазмідах. Плазміда також містить ген *lacZ*, який кодує  $\beta$ -галактозидазу, що дозволяє проводити скринінг колоній. Специфічні ДНК-лігази додаються для зв'язування вставленого гена ланцюга в плазмиду.

### Трансфекція

Впровадження рекомбінантних плазмід у клітини бактерій називається трансфекцією. Для трансформації *E. coli* можна використовувати різні методики, такі як обробка  $\text{CaCl}_2$  або методи електропорації. Після надходження плазмиди клітини трансформуються.

### Підготовчі роботи перед ферментацією

Бульйон LB використовують як культуральне середовище для *E. coli*. Його спочатку розчиняють і розчин автоклавують для стерилізації, а потім додають ампіцилін і лактозу. Середовище засівають трансформованими клітинами *E. coli*. Біореактори STR використовуються для ферментації двох штамів *E. coli*, що кодують ланцюги інсуліну. Біореактори стерилізуються, рН і  $\text{pO}_2$  зонди, конденсатори та впускний отвір повітря відкалібровуються.

### Масштабування та ферментація

На етапі масштабування використовують колби для струшування, в яких вирощують рекомбінантні клітини *E. coli*, що кодують ланцюги А та В. Гени резистентності до ампіциліну та *lacZ*, присутні на плазмідах, використовуються для ідентифікації успішно трансформованих клітин, оскільки вони виявляють резистентність до ампіциліну, присутнього в середовищі росту, і кодують  $\beta$ -галактозидазу. Ці успішно трансформовані клітини зберігаються для реплікації в оптимальних умовах, а потім переносяться в біореактор на стадію ферментації. Ланцюги А і В

синтезуються, коли їхні відповідні штами *E. coli* реплікуються в окремих ферментерах.

#### Виділення сирого продукту

Бактеріальні клітини видаляються з резервуара біореактора і лізуються одним із методів - розщепленням ферментами, обробкою ультразвуком або заморожуванням та розморожуванням клітин. Використання лізосомних ферментів є кращим для великомасштабних операцій, оскільки вони перетравлюють зовнішній шар бактерій для вивільнення інсуліну у навколишнє середовище, тому пізніше можна додати детергенти для видалення клітинної стінки.

#### Очищення

Компоненти клітини відокремлюються від двох ланцюгів інсуліну. Для видалення домішок використовують методи гель-фільтрації та іонообмінної хроматографії.

#### Виділення ланцюга інсуліну

Виділений очищений білок має ланцюг інсуліну, злитий з  $\beta$ -галактозидазою, оскільки він був пов'язаний з геном, включеним у плазмиду, і трансклюється разом з нею. Для відділення ланцюгів інсуліну від  $\beta$ -галактозидази використовують бромід ціаногену, який розщеплює білок по залишку метіоніну, з якого починається білок  $\beta$ -галактозидази [72].

#### Зшивання ланцюгів

Ланцюги інсуліну (A і B) обробляють дитіонітом натрію та сульфідом натрію для утворення дисульфідних зв'язків, які сполучають ланцюги. Весь цей процес називається відновлено-повторним окисленням, і він індукується  $\beta$ -меркаптоетанолом і окисленням повітря.

#### Обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія

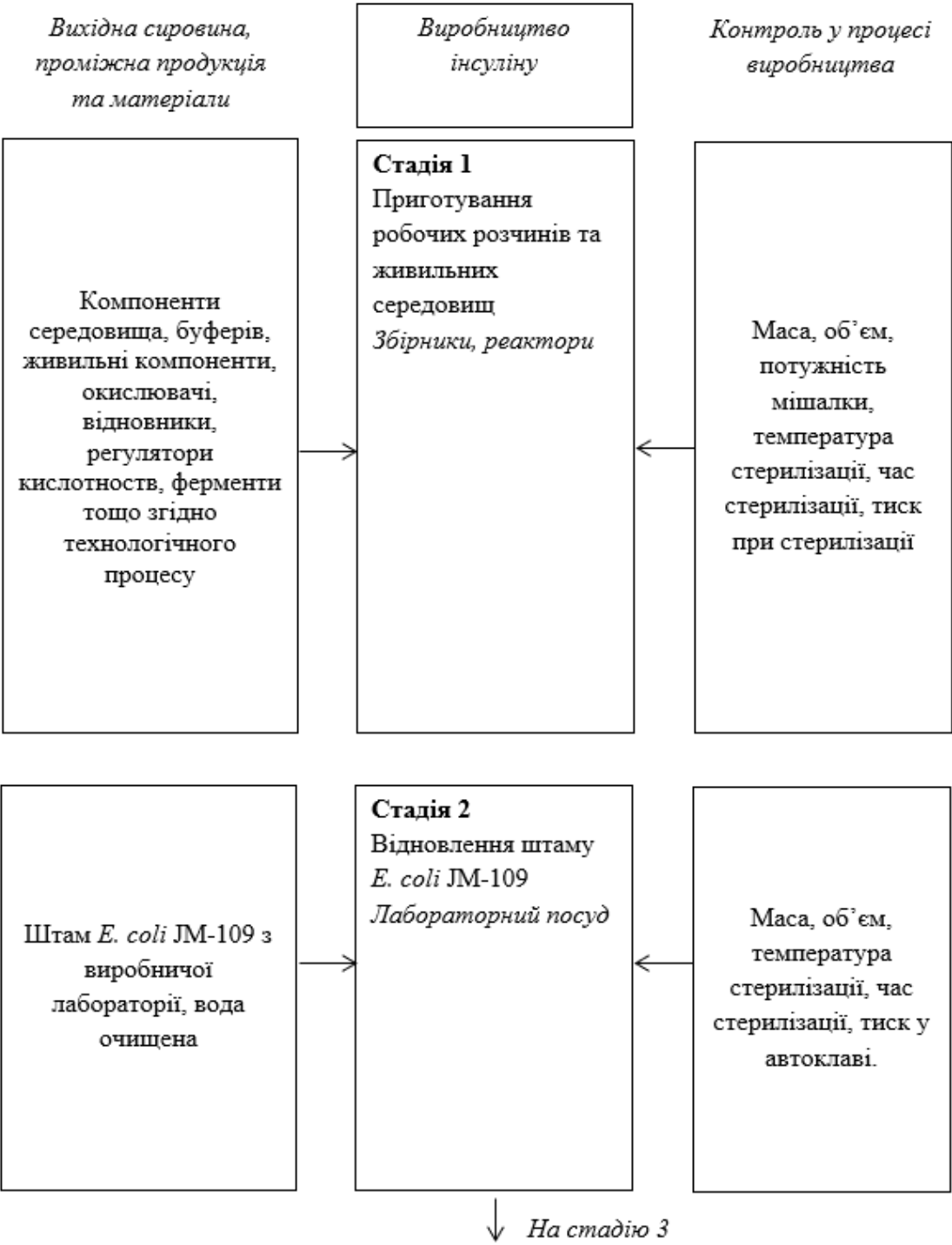
ОФ-ВЕРХ проводиться для видалення решти домішок або реагентів. Надалі очищений активний людський інсулін поступає на фасування та пакування.

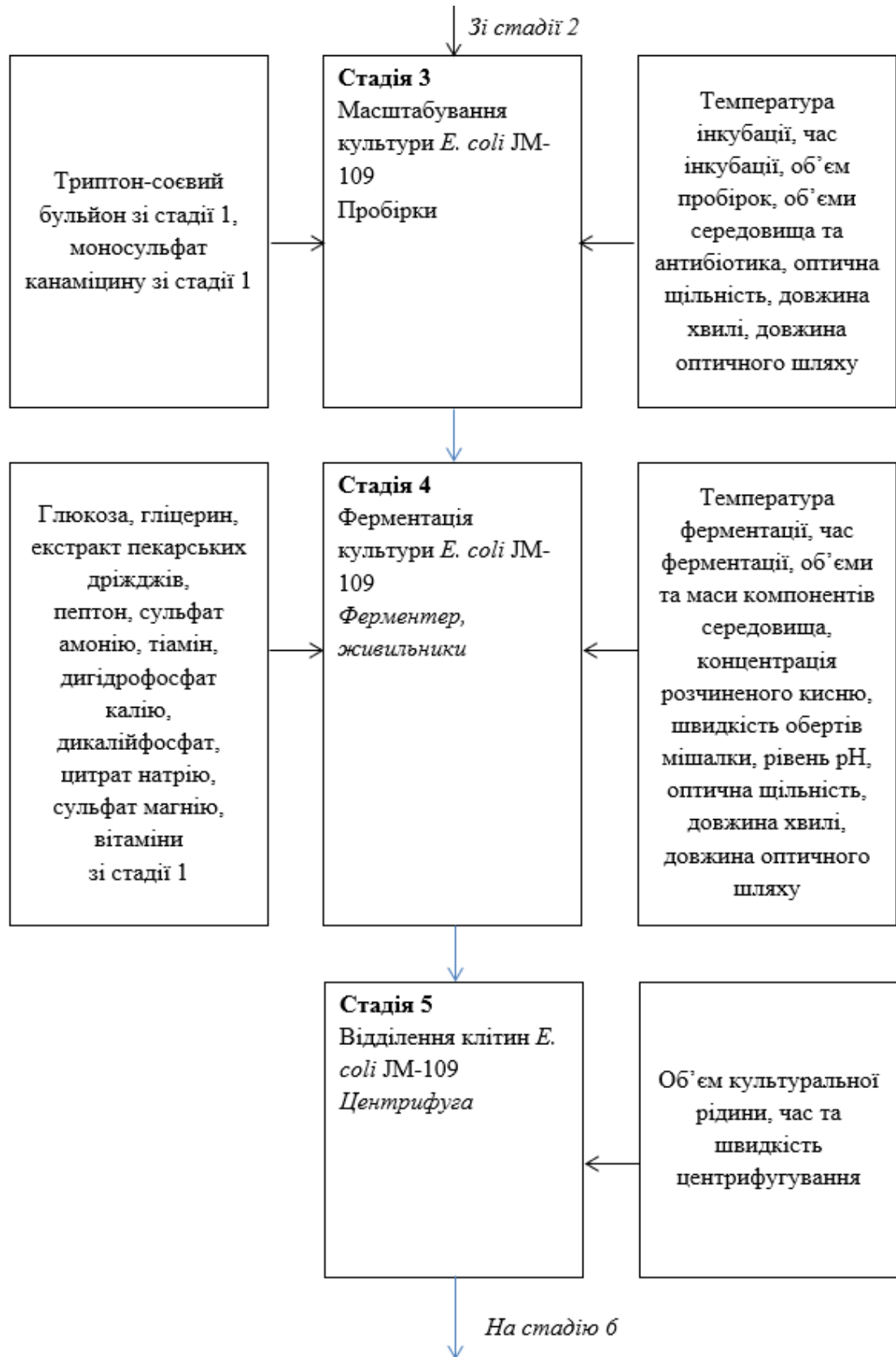
### 3.3 Пропозиції щодо вибору системи експресії та технології для реалізації на вітчизняному підприємстві

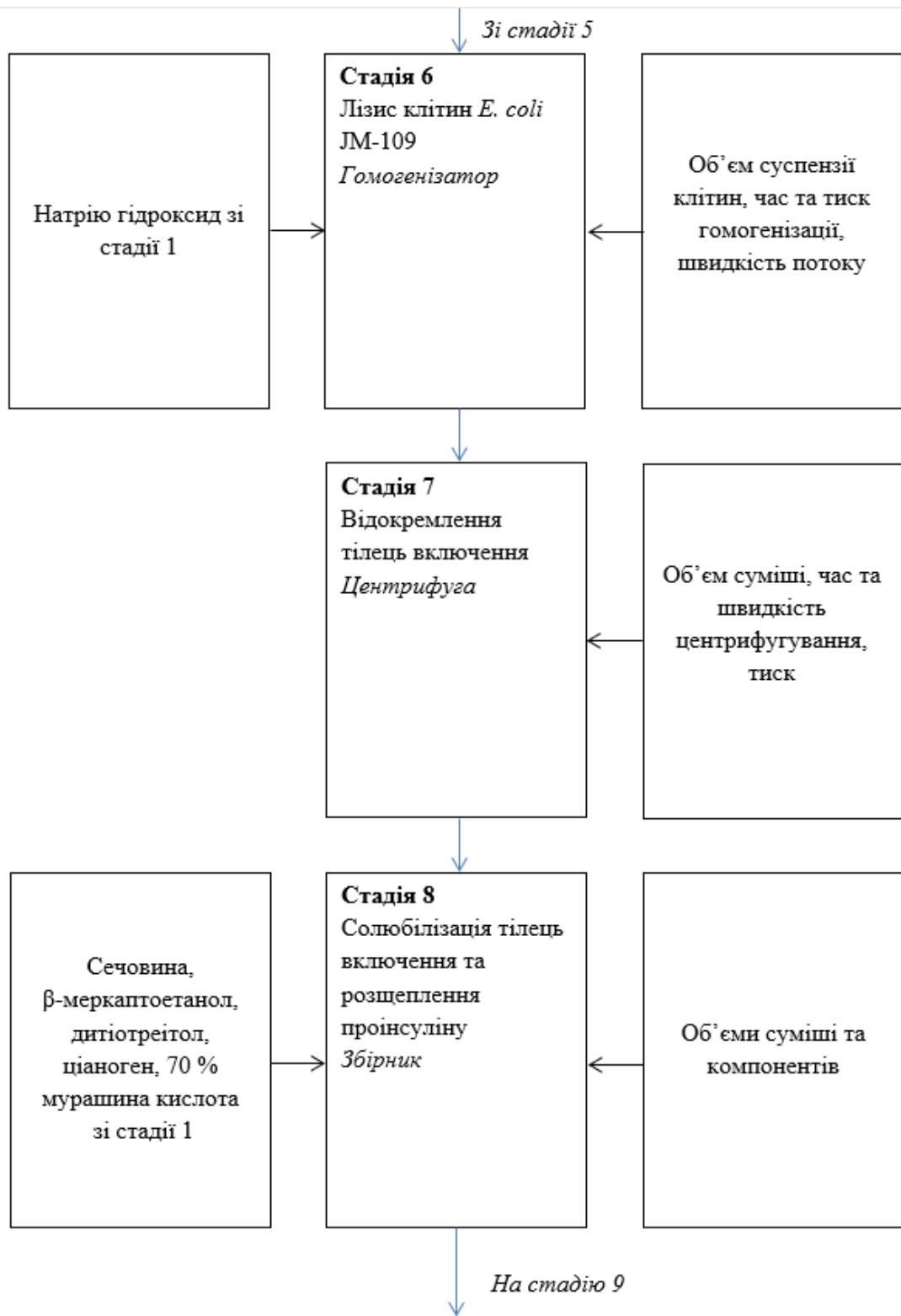
Враховуючи те, що вітчизняні фармацевтичні компанії роблять перші кроки у виробництві рекомбінантних інсулінів повним біотехнологічним циклом, перспективною системою експресії для вітчизняного виробництва повним біотехнологічним циклом даної групи лікарських засобів, залишається найвідоміша і найвивченіша - *E. coli*. У цій кваліфікаційній роботі для реалізації на вітчизняному підприємстві, зокрема на АТ «Фармак», яке характеризується інноваційним обладнанням та необхідними ресурсами, запропонована технологічна схема виробництва рекомбінантного інсуліну лізпро на основі цієї системи експресії.

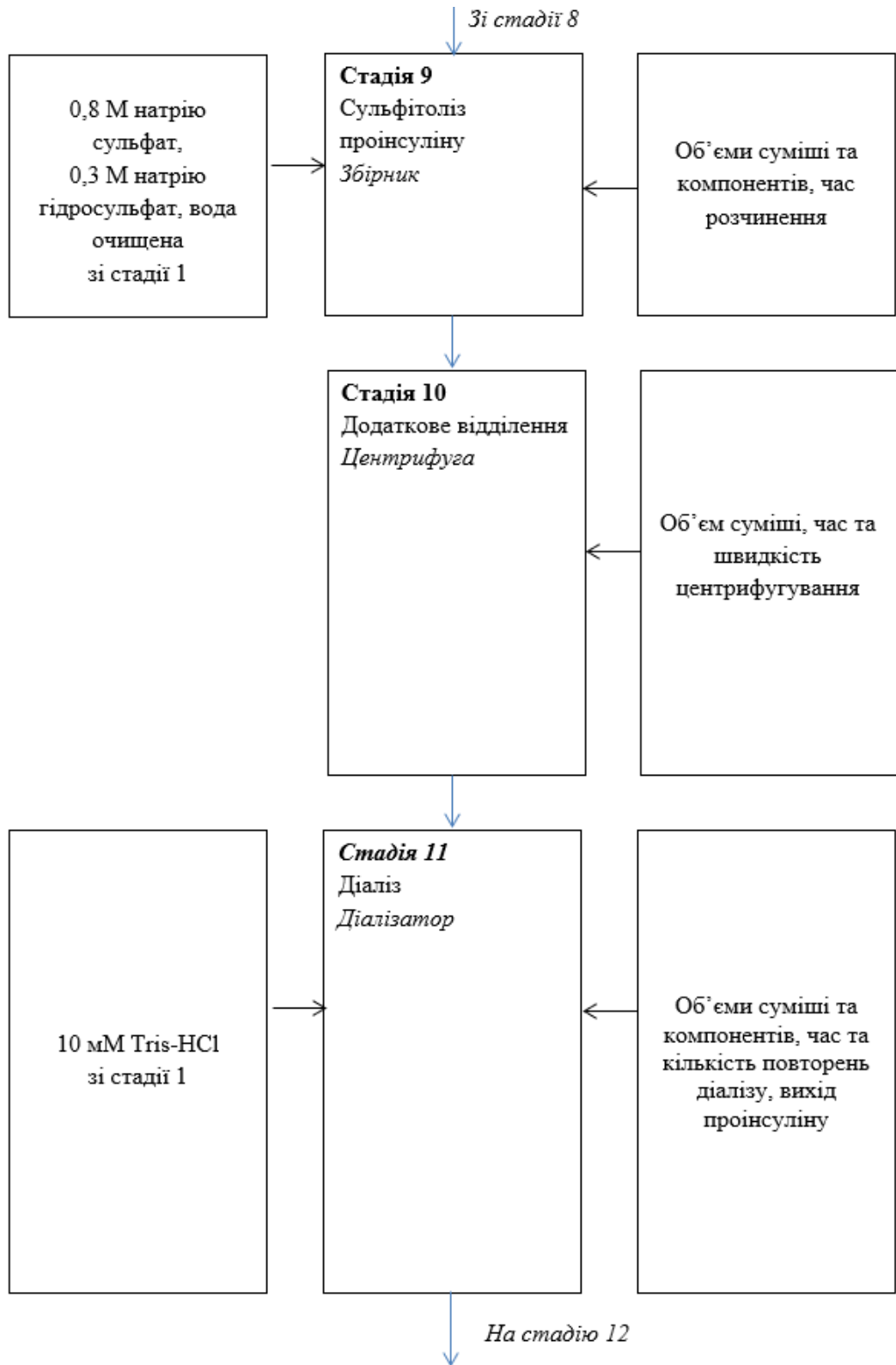
Слід відмітити, що компанія є однією з перших в Україні, яка запустила виробництво інсулінів: з 1999 р. здійснювався випуск готового лікарського засобу шляхом етикетування і фасування флаконів, а також вхідний і вихідний контроль якості, виведення препарату на ринок під торговельною назвою Фармасулін, з відповідним маркетинговим супроводом, у 2003 р. було укладено ліцензійну угоду про передачу «Фармак» компанією Eli Lilly технології виробництва готової лікарської форми рекомбінантного інсуліну у флаконах і картриджах із активної фармацевтичної субстанції. З 2017 р. компанія АТ «Фармак» займається розробкою власної промислової лінії з повним технологічним циклом виробництва рекомбінантного людського інсуліну – інсуліну лізпро, який є аналогом препаратів лідера світового протидіабетичного ринку Eli Lilly – Хумулін та Хумалог, тому враховуючи досвід компанії нами була розроблена технологічна схема виробництва інсуліну саме за технологією компанії Eli Lilly (із синтезом проінсуліну) (рис. 3.3). В даній схемі використовували генно-інженерний штамі *E. coli JM-109*, який відомий як активний продуцент проінсуліну.

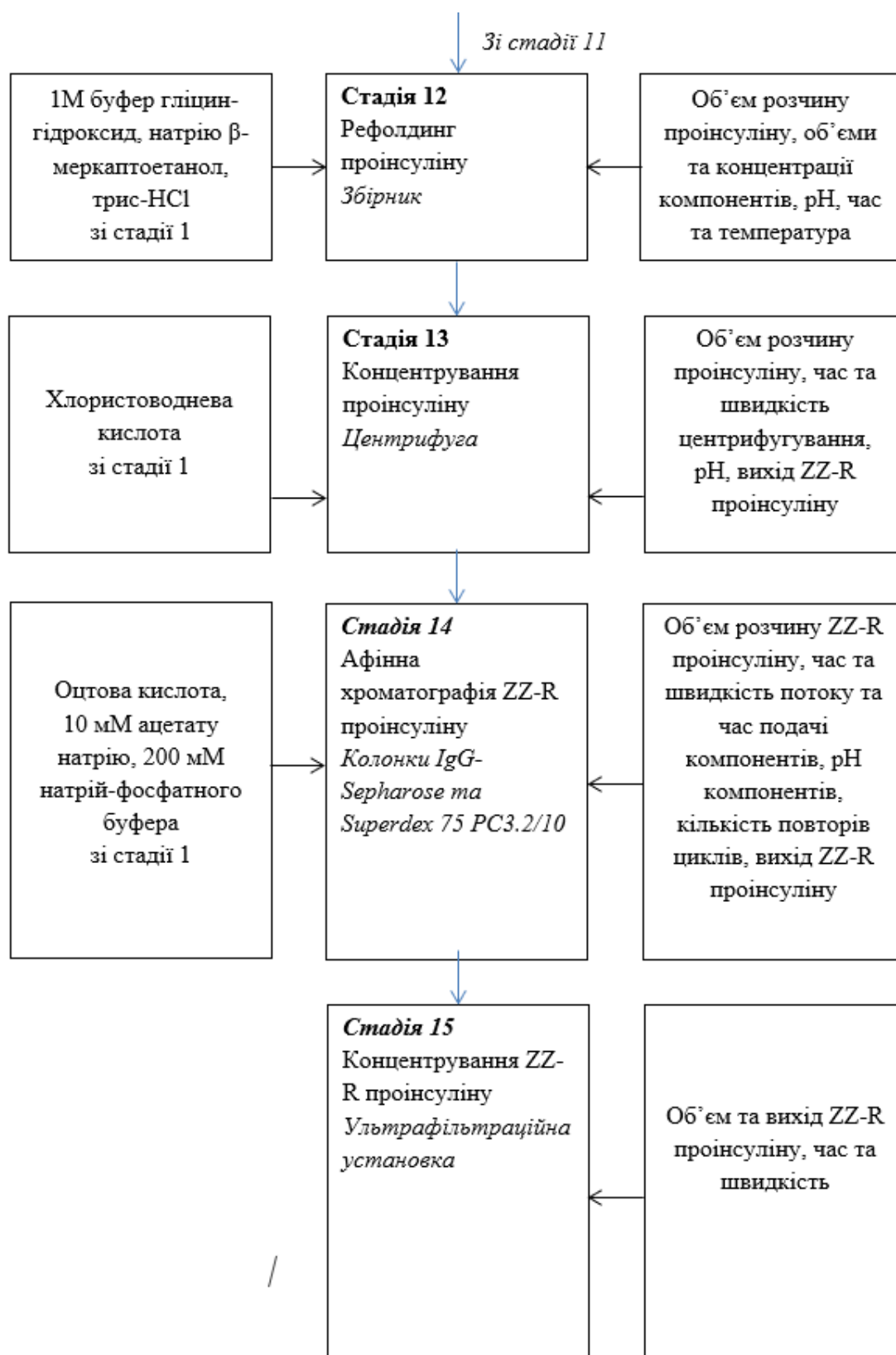
**Технологічна схема виробництва інсуліну**













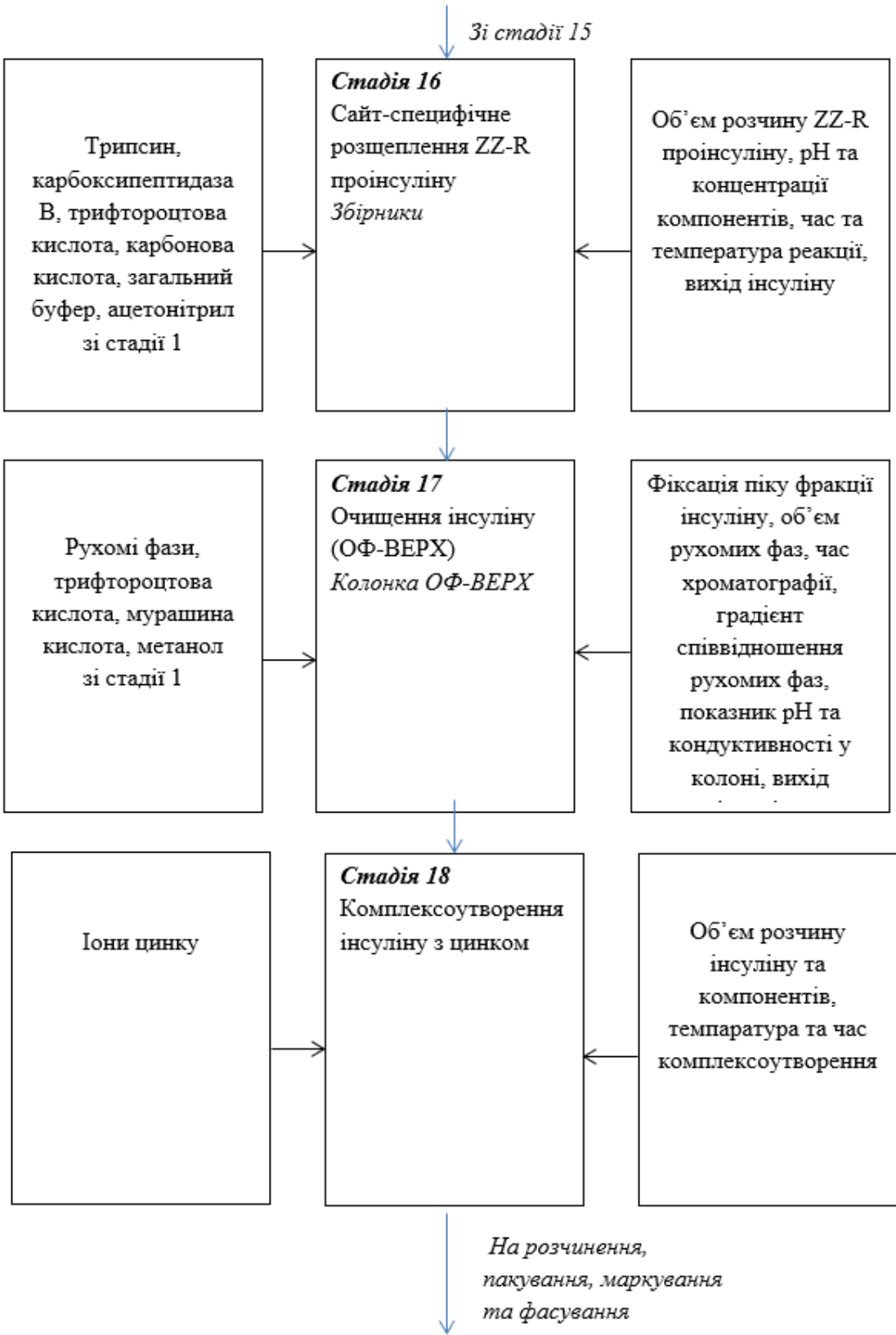


Рис. 3.3 – Технологічна схема виробництва інсуліну  
(за технологією синтезу проінсуліну)

### Висновок до 3 розділу

Провідними компаніями виробництво рекомбінантних інсулінів здійснюється, в основному, за допомогою найпопулярнішої бактеріальної системи експресії *Escherichia coli* та дріжджової системи *Saccharomyces cerevisiae*. Але через наявність певних проблем, в першу чергу пов'язаних з посттрансляційною модифікацією білка, ведуться дослідження по можливості використання інших систем експресії, а саме: одноклітинних еукаріот (в основному це дріжджі родів *Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Torulopsis*), трансгенних рослин (клітини тютюну, томату, салату, полуниці), клітинних ліній тварин (серед яких найбільш розповсюджені CHO (Chinese hamster ovary cell), Baby hamster kidney (БНК), PerC6, HEK293, раку молочної залози MCF7, злоякісної меланоми A375, печінковоклітинної карциноми HepG2, ембріональної нирки (а як пізніше виявилось, надниркової залози) HEK293), ембріональних стовбурових клітин (ЕСК).

На сьогоднішній день у виробництві рекомбінантного інсуліну використовують дві технології: через синтез проінсуліну та через окремий синтез ланцюгів А та В інсуліну.

Нами розроблено технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну через проінсулін за допомогою штаму *Escherichia coli*. Ця технологія і система експресії на сьогоднішній день найдослідженіша та найдоступніша і може бути реалізована на вітчизняних підприємствах.

## ВИСНОВКИ

1. На сьогоднішній день спостерігається тенденція зростання кількості хворих на цукровий діабет у всьому світі через більш ширший перехід до малорухомого способу життя, що у свою чергу, призводить до збільшення потреби в інсуліні. Близько 85 % препаратів інсуліну виробляється провідними фармацевтичними компаніями світу: Ново Нордіск (Данія), Санофі-Авентіс (Німеччина), Біотон (Польща), Еллі Лілі (США). Промислове виробництво інсуліну в Україні почалося у 1999 р. на заводі «Індар», а згодом на підприємствах «Фармак», «Дарниця», «Артеріум». Збільшення хворих на цукровий діабет по всьому світі призводить до розвитку технологій його виробництва та появи нових продуктів по всьому світу.

2. Сьогодні в світі налічується більше 200 комерційних препаратів інсуліну. Вони відрізняються між собою клініко-фармакологічними характеристиками, тривалістю дії, ступенем очищення. Залежно від тривалості дії інсуліни діляться на 4 групи: ультракороткої, короткої (простої) дії, середньої тривалості дії, тривалої та подовженої дії, а також комбіновані препарати інсуліну. Слід відмітити, що майже всі з них – це аналоги інсуліну, тобто генетично модифіковані рекомбінантні препарати інсуліну, які максимально відповідають фізіологічному ритму секреції інсуліну. Вони суттєво покращують глікемічний контроль, знижують до- і постпрандіальну глікемію, коливання глікемії, стабілізують перебіг цукрового діабету, знижують рівень глікованого гемоглобіну, що покращує якість життя хворих, уповільнює розвиток хронічних ускладнень.

3. Провідними компаніями виробництво рекомбінантних інсулінів здійснюється, в основному, за допомогою найпопулярнішої бактеріальної системи експресії *Escherichia coli* та дріжджової системи *Saccharomyces cerevisiae*. Але через наявність певних проблем, в першу чергу пов'язаних з посттрансляційною модифікацією білка, ведуться дослідження по можливості використання інших систем експресії, а саме: одноклітинних еукаріот,

трансгенних рослин, клітинних ліній тварин та людей, ембріональних стовбурових клітин. Серед потенційних систем експресії інсуліну для реалізації на вітчизняному підприємстві нами була обрана *Escherichia coli* як найпростіша та найзручніша у використанні.

4. Багато років джерелом промислового виробництва інсуліну була підшлункова залоза свиней і великої рогатої худоби. На сьогодні використовується біосинтетичний (рекомбінантний) метод виробництва людського інсуліну. У великомасштабному виробництві використовують дві технології: через синтез проінсуліну та через оксремий синтез ланцюгів А та В інсуліну. Нами була обрана технологія, яка використовується світовою компанією Еллі Лілі, заснована на синтезі проінсуліну рекомбінантною бактерією з наступною обробкою білка у активний інсулін.

5. Згідно проведеного аналізу нами розроблено технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну через проінсулін за допомогою штаму *Escherichia coli*. Ця технологія і система експресії на сьогоднішній день найдослідженіша та найдоступніша і може бути реалізована на вітчизняних підприємствах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. World Health Organization, WHO (2021) The WHO Global Diabetes Compact. <https://www.who.int/docs/default-source/world-diabetes-day/global-diabetes-compact-final.pdf>. Accessed 01 December 2023.
2. Fortune Business Insights (2020) Human insulin market size, share & industry analysis, by type (analogue insulin, traditional human insulin), by diabetes type (type 1, type 2), by distribution channel (retail pharmacy, hospital pharmacy, online pharmacy), and regional forecast, 2019–2026. <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/human-insulin-market-100395>. Accessed 01 December 2023.
3. Fortune Business Insights (2022) Human insulin market size, share & COVID-19 impact analysis, by type (analogue insulin and traditional human insulin), by diabetes type (diabetes 1 and diabetes type 2), by distribution channel (hospital pharmacy and retail and online pharmacy), and regional forecast, 2023–2030. <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/human-insulin-market-100395>. Accessed 01 December 2023.
4. <https://www.lilly.com/news/media/media-kits/lyumjev>. Accessed 01 December 2023.
5. Офіційний сайт компанії Elli Lily and Company <https://www.lilly.com/our-medicines/current-medicines>. Accessed 01 December 2023.
6. Біологічна хімія : підручник / Губський Ю. І., Ніженковська І. В., Корда М. М. [та ін.] ; за ред. І. В. Ніженковської. – Вінниця : Нова Книга, 2021. – 648 с.
7. Zajac J, Shrestha A, Patel P, Poretsky L (2010). The Main Events in the History of Diabetes Mellitus. У Poretsky L (ред.). Principles of Diabetes Mellitus (вид. 2nd). New York: Springer. ISBN 978-0-387-09840-1. doi:10.1007/978-0-387-09841-8.

8. Strakosch C. The discovery of Insulin, 2000. Ramsay Health Care [https://web.archive.org/web/20140125100917/http://historicgreenslopes.com/documents/Booklet\\_The%20Discovery%20of%20Insulin%2006.pdf](https://web.archive.org/web/20140125100917/http://historicgreenslopes.com/documents/Booklet_The%20Discovery%20of%20Insulin%2006.pdf). Accessed 01 December 2023.

9. Frederick Sanger Facts <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1958/sanger/facts/> Accessed 01 December 2023.

10. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1980/summary/> Accessed 01 December 2023.

11. The Nobel Prize in Chemistry 1964 <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1964/hodgkin/biographical/> Accessed 01 December 2023.

12. Актуальні підходи до лікування хворих на цукровий діабет : навч. посібник для студентів, лікарів-інтернів терапевтів, ендокринологів та лікарів загальної практики. Присвячується 80-річчю від дня народження доктора медичних наук, професора В. М. Хворостінки / Л. В. Журавльова, О. М. Кривоносова. – Харків : ХНМУ, 2019. – 124 с

13. Внутрішня медицина : модуль 1, змістовий модуль 1 «Основи діагностики, лікування та профілактики основних хвороб ендокринної системи» : навч. посіб. для студентів 4 курсу медичних факультетів в галузі знань 22 «Охорона здоров'я», спеціальностей 222 «Медицина» , 228 «Педіатрія» / С. М. Кисельов [та ін.]. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2021. - 137 с.

14. Treatment intensification with stepwise addition of prandial insulin aspart boluses compared with full basal-bolus therapy (FullSTEP Study): a randomised, treat-to-target clinical trial / H. W. Rodbard, V. E. Visco, H. Andersen et al. // Lancet Diabetes Endocrinol. – 2014. – Vol. 2 (1). – P. 30–37.

15. Safety and effectiveness of biphasic insulin aspart 30 in people with type 2 diabetes switching from basal-bolus insulin regimens in the A1chieve study / G. Dieuzeide, L. M. Chuang, A. Almaghami et al. // Prim Care Diabetes. – 2014. – Vol. 8 (2). – P. 111–117.

16. Does a patient-managed insulin intensification strategy with insulin glargine and insulin glulisine provide similar glycemic control as a physician-managed strategy? Results of the START (Self-Titration With Apidra to Reach Target) study: a randomized noninferiority trial / S. B. Harris, J. F. Yale, L. Berard et al. // *Diabetes Care*. – 2014. – Vol. 37 (3). – P. 604–610.

17. New insulin glargine 300 Units mL<sup>-1</sup> provides a more even activity profile and prolonged glycemic control at steady state compared with insulin glargine 100 Units mL<sup>-1</sup> / A. Steinstraesser, R. Schmidt, K. Bergmann and others // *Diabetes Care*. – 2015. – № 38 (4). – P. 637–645.

18. Ligand-controlled assembly of hexamers, dihexamers, and linear multihexamer structures by the engineered acylated insulin degludec / D. B. Steensgaard, G. Schluckebier, H. M. Strauss and others // *Biochemistry*. – 2013. – № 52 (2). – P. 295–309.

19. Distinct prandial and basal glucose-lowering effects of insulin degludec/insulin aspart (IDegAsp) at steady state in subjects with type 1 diabetes mellitus / T. Heise, L. Nosek, C. Roepstorff and others // *Diabetes Therapy*. – 2014. – № 5 (1). – P. 255–265.

20. Standardizing Clinically Meaningful Outcome Measures Beyond HbA1c for Type 1 Diabetes: A Consensus Report of the American Association of Clinical Endocrinologists, the American Association of Diabetes Educators, the American Diabetes Association, the Endocrine Society, JDRF International, the Leona M. and Harry B. Helmsley Charitable Trust, the Pediatric Endocrine Society, and the T1D Exchange / G. Agiostratidou, H. Anhalt, D. Ball et al. // *Diabetes Care*. – 2017. – № 40. – P. 1622–1630.

21. American Diabetes Association. Cardiovascular Disease and Risk Management // *Diabetes Care*. – 2017. – № 40 (Suppl. 1). – P. 75–87.

22. Lewis G.F., Brubaker P.L., The discovery of insulin revisited: lessons for the modern era. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021; 131 (1) : 142239.

23. Jorgensen-Earp C.R., Jorgensen D.D., To Fly Under Borrowed Colours: Insulin Discovery Accounts, Scientific Credit, and the Nobel Prize. *Rhetoric & Public Affairs*. 2020; 23 (1) : 1-45.
24. Hegele R.A., Maltman G.M., Insulin's centenary: the birth of an idea. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*. 2020; 8 (12) : 971-7.
25. Vecchio I., Tornali C., Bragazzi N.L., Martini M., The discovery of insulin: an important milestone in the history of medicine. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2018; 9 : 613.
26. Animaw W., Seyoum Y., Increasing prevalence of diabetes mellitus in a developing country and its related factors. *PLoS One*. 2017; 12 (11) : e0187670.
27. Chinnaboina G.K., Sudhakar A., Verma R., Sharma P., Shrivastava B., A Review on Diabetes Mellitus: Current Update on Management and Treatment. *Asian Pacific Journal Health Science*.. 2018; 53 (3) : 67-82.
28. Ghazavi M.K., Johnston G.A., Insulin allergy. *Clinics in Dermatology*. 2011; 29 (3) : 300-5.
29. Riggs A.D., Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: The Path to Humulin. *Endocrine Reviews*. 2021; 42 (3) : 374-80.
30. Zhao M., Jiang Y., Great expectations and challenges of artificial intelligence in the screening of diabetic retinopathy *Nature Publishing Group* 2020.
31. Jafari S., Babaeipour V., Seyedi H.A., Rahaie M., Mofid M.R., Haddad L., Recombinant production of mecasermin in E. coli expression system. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2014; 9 (6) : 453-61.
32. Baeshen M.N., Al-Hejin A.M., Bora R.S., Ahmed M.M., Ramadan H.A., Saini K.S., Production of biopharmaceuticals in E. coli: current scenario and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015; 25 (7) : 953-62.
33. Wildt S., Gerngross T.U., The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews. Microbiology*. 2005; 3 (2) : 119-28.
34. Baghban R., Farajnia S., Rajabibazl M., Ghasemi Y., Mafi A., Hoseinpoor R., Yeast expression systems: overview and recent advances. *Molecular Biotechnology*. 2019; 61 (5) : 365-84.



35. Safder I., Khan S., Islam Iu, Ali M., Bibi Z., Waqas M., *Pichia pastoris* expression system: a potential candidate to express protein in industrial and biopharmaceutical domains. *Biometrical Letters*. 2018; 4 (1) : 1-14.
36. Polez S., Origi D., Zahariev S., Guarnaccia C., Tisminetzky S.G., Skoko N., A simplified and efficient process for insulin production in *Pichia pastoris*. *PLoS One*. 2016; 11 (12) : e0167207.
37. Shi Y., Inoue H., Wu J.C., Yamanaka S., Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2017; 16 (2) : 115-30.
38. Prabakar K.R., Domínguez-Bendala J., Molano R.D., Pileggi A., Villate S., Ricordi C., Generation of glucose-responsive, insulin-producing cells from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*. 2012; 21 (6) : 1321-39.
39. Dong O.X., Ronald P.C., Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives. *Plant Physiology*. 2019; 180 (1) : 26-38.
40. Govender K., Naicker T., Lin J., Baijnath S., Chuturgoon A.A., Abdul N.S., A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in *Escherichia coli* (*E. coli*). *AMB Express*. 2020; 10 (1) : 43
41. Zieliński M., Romanik-Chruścielewska A., Mikiewicz D., Lukasiewicz N., Iowska I., Sokoł, Antosik J., Expression and purification of recombinant human insulin from *E. coli* 20 strain. *Protein Expression and Purification*. 2019; 157 : 63-9.
42. Jenkins N., Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects. *Cytotechnology*. 2007; 53 (1-3) : 121-5.
43. Baeshen M.N., Al-Hejin A.M., Bora R.S., Ahmed M.M., Ramadan H.A., Saini K.S., Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015; 25 (7) : 953-62.
44. Kildegaard J., Buckley S.T., Nielsen R.H., Povlsen G.K., Seested T., Ribel U., Elucidating the mechanism of absorption of fast-acting insulin aspart: the role of niacinamide. *Pharmaceutical Research*. 2019; 36 (3) : 49.

45. Landgraf W., Sandow J., Recombinant human insulins clinical efficacy and safety in diabetes therapy. *European Endocrinology*. 2016; 12 (1) : 12-7.
46. Borowicz P., Bocian W., Sitkowski J., Bednarek E., Mikiewicz-Syguła D., Kurzynoga D., Biosynthetic engineered B28(K)-B29(P) human insulin monomer structure in water and in water/acetonitrile solutions. *Journal of Biomolecular NMR*. 2013; 55 (3) : 303-9.
47. Schillberg S., Raven N., Spiegel H., Rasche S., Buntru M., Critical analysis of the commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. *Frontiers in Plant Science*. 2019; 10 : 720.
48. Khan A.H., Bayat H., Rajabibazl M., Sabri S., Rahimpour A., Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2017; 33 (1) : 4.
49. Damerum A., Chapman M.A., Taylor G., Innovative breeding technologies in lettuce for improved post-harvest quality. *Postharvest Biology and Technology*. 2020; 168 : 111266.
50. Sun H., Sun X., Wang H., Ma X., Advances in salt tolerance molecular mechanism in tobacco plants. *Hereditas*. 2020; 157 (1) : 5.
51. Baby B., Antony P., Vijayan R., Antioxidant and anticancer properties of berries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018; 58 (15) : 2491-507.
52. Tavizi A., Javaran M.J., Moieni A., Mohammadi-Dehcheshmeh M., Mohebodini M., Ebrahimie E., Root and shoot parts of strawberry: factories for production of functional human pro-insulin. *Molecular Biology Reports*. 2015; 42 (5) : 1013-23.
53. Dong O.X., Ronald P.C., Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives. *Plant Physiology*. 2019; 180 (1) : 26-38.
54. Kazmi A., Kazmi A., Shams S., Sajid A., Khan K., Therapeutic role of bone marrow-derived stem cells and zinc sulfate for reduction of liver fibrosis. *Progress in Stem Cell*. 2019; 6 (2) : 269-78.

55. Jiang W., Shi Y., Zhao D., Chen S., Yong J., Zhang J., In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Research*. 2007; 17 (4) : 333-44.
56. Shahjalal H.M., Dayem A. Abdal, Lim K.M., Jeon T.I., Cho S.G., Generation of pancreatic  $\beta$  cells for treatment of diabetes: advances and challenges. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018; 9 (1) : 355.
57. Bhartiya D., Stem cells to replace or regenerate the diabetic pancreas: huge potential & existing hurdles. *The Indian Journal of Medical Research*. 2016; 143 (3) : 267-74.
58. Negi N., Griffin M.D., Effects of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells: current understanding and clinical relevance. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2020; 38 (5) : 596-605.
59. Nemati M., Omrani G. Ranjbar, Ebrahimi B., Alizadeh A., Efficiency of Stem Cell (SC) Differentiation into Insulin-Producing Cells for Treating Diabetes: a Systematic Review. *Stem cells international*. 2021; 2021 (2021) : 6652915.
60. Solis M.A., Velásquez I. Moreno, Correa R., Huang L.L., Stem cells as a potential therapy for diabetes mellitus: a call-to-action in Latin America. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2019; 11 (1) : 20.
61. Karbalaee M., Rezaee S.A., Farsiani H., *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*. 2020; 235 (9) : 5867-81.
62. Wang J., Wang X., Shi L., Qi F., Zhang P., Zhang Y., Methanol-independent protein expression by AOX1 promoter with trans-acting elements engineering and glucose-glycerol-shift induction in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1) : 41850.
63. Ghag S.B., Adki V.S., Ganapathi T.R., Bapat V.A., Plant Platforms for Efficient Heterologous Protein Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2021; 2021 : 1-22.

64. Kollu L., Stem Cell Research-Ethico-Legal Perspectives: Protection of Human Embryos. *International Journal of Current Research and Review*. 2021; 13 (7) : 216-222.

65. Beghini D.G., Horita S.I., Cascabulho C.M., Alves L.A., Henriques-Pons A., Induced pluripotent stem cells: hope in the treatment of diseases, including muscular dystrophies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21 (15) : 5467.

66. Sandow J., Landgraf W., Becker R., Seipke G., Equivalent recombinant human insulin preparations and their place in therapy. *European Endocrinology*. 2015; 11 (1) : 10-6.

67. Jing J., Chen Y., Sheng L., Wu M., Optimized production of insulin variant, a recombinant platelet aggregation inhibitor, by high cell-density fermentation of recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2018; 152 : 7-12.

68. Liu F., Zaykov A.N., Levy J.J., DiMarchi R.D., Mayer J.P., Chemical synthesis of peptides within the insulin superfamily. *Journal of Peptide Science*. 2016; 22 (5) : 260-70.

69. Govender K., Naicker T., Lin J., Baijnath S., Chuturgoon A.A., Abdul N.S., A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in *Escherichia coli* (*E. coli*). *AMB Express*. 2020; 10 (1) : 43.

70. Yuan J., Zhou H., Yang Y., Li W., Wan Y., Wang L., Refolding and simultaneous purification of recombinant human proinsulin from inclusion bodies on protein-folding liquid-chromatography columns. *Biomedical Chromatography*. 2015; 29 (5) : 777-82.

71. Slattery D., Amiel S.A., Choudhary P., Optimal prandial timing of bolus insulin in diabetes management: a review. *Diabetic Medicine*. 2018; 35 (3) : 306-16.

72. Akbarian M., Yousefi R., Human  $\alpha$ B-crystallin as fusion protein and molecular chaperone increases the expression and folding efficiency of recombinant insulin. *PLoS One*. 2018; 13 (10) : e0206169.

## ДОДАТОК

### Публікації за темою роботи



Міністерство  
охорони здоров'я  
України

Національний  
фармацевтичний  
університет

## ГРАМОТА

нагороджується

**Борисюк  
Павло**

у секційному засіданні студентського  
наукового товариства кафедри  
біотехнології

IV Всеукраїнська науково-практична  
конференція з міжнародною участю

## YOUTH PHARMACY SCIENCE

Ректор НФаУ  
д. фарм. н., проф



Алла КОТВИЦЬКА

6-7 грудня, 2023 р.,  
м. Харків, Україна





Міністерство  
охорони здоров'я  
України

Національний  
фармацевтичний  
університет



СЕРТИФІКАТ

Цим засвідчується, що

**Борисюк П.А.**

**Науковий керівник:  
Калюжная О.С.**

брав(ла) участь у роботі IV Всеукраїнської  
науково-практичної конференції  
з міжнародною участю

**YOUTH  
PHARMACY  
SCIENCE**

Ректор НФаУ,  
д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

6-7 грудня 2023 р.  
м. Харків,  
Україна

**Національний фармацевтичний університет**

Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту

Кафедра біотехнології

Ступінь вищої освіти другий магістерський

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Промислова біотехнологія

**ЗАТВЕРДЖУЮ**

**Завідувачка кафедри**

**біотехнології**

**Наталя ХОХЛЕНКОВА**

«03» жовтня 2023 року

**ЗАВДАННЯ  
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ**

Павлу БОРИСЮКУ

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Аналіз технологій отримання рекомбінантних інсулінів»,

керівник кваліфікаційної роботи: Ольга КАЛЮЖНАЯ, к.фарм.н., доц.

(Ім'я, ПРИЗВИЩЕ, науковий ступінь, вчене звання)

затверджений наказом НФаУ від «16» жовтня 2023 року № 229

2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: 05.02.2024 р.

3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: об'єкт дослідження – системи експресії інсуліну; мета – аналіз технологій виробництва рекомбінантних інсулінів

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): вступ; огляд літератури; об'єкти і методи досліджень; експериментальна частина; висновки

6. Дата видачі завдання: «03» жовтня 2023 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1	Формування напряму наукового дослідження, постановка проблеми	жовтень 2023	виконано
2	Аналітичний огляд літератури	жовтень 2023	виконано
3	Вибір об'єктів та методів дослідження	листопад 2023	виконано
4	Проведення досліджень	листопад 2023	виконано
6	Обробка результатів та оформлення кваліфікаційної роботи	грудень 2023 – січень 2024	виконано
8	Здача роботи до Екзаменаційної комісії	05 лютого 2024	виконано

**Здобувач вищої освіти**

\_\_\_\_\_  
(підпис) Павло БОРИСЮК  
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

**Керівник кваліфікаційної роботи**

\_\_\_\_\_  
(підпис) Ольга КАЛЮЖНАЯ  
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)



**ВИТЯГ З НАКАЗУ № 229**  
по Національному фармацевтичному університету  
від 16 жовтня 2023 року

**Про затвердження тем кваліфікаційних робіт**

**Затвердити теми кваліфікаційних робіт, керівників-консультантів та рецензентів здобувачам вищої освіти 2 курсу, спеціальність – 162 Біотехнології та біоінженерія, освітня програма – Промислова біотехнологія, ступінь вищої освіти – магістр, термін навчання – 1 р. 6 міс., денна форма здобуття освіти.**

Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
Борисюк Павло Андрійович	Аналіз технологій отримання рекомбінантних інсулінів	Analysis of technologies for obtaining recombinant insulins	Доцент закладу вищої освіти кафедри біотехнології, к.фарм.н, доцент Калюжная О.С.	Начальник відділу фармацевтично ї розробки ТОВ “БІОЛІК ФАРМА”, к.фарм.н., с.н.с. Назарова О.С.

**В.о. ректора**

**Алла КОТВИЦЬКА**

Вірно:  
**Декан факультету фармацевтичних технологій та менеджменту**



**Наталія ЖИВОРА**

Ф А2.8-47-110

**ВИСНОВОК****Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу  
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі  
здобувача вищої освіти**

№ 125734 від « 23 » січня 2024 р.

Проаналізувавши випускню кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Борисюка Павла Андрійовича, 2 курсу, \_\_\_\_\_ групи, спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія, промислова фармація, на тему: «Аналіз технологій отримання рекомбінантних інсулінів / Analysis of technologies for obtaining recombinant insulins», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копіляції).

**Голова комісії,  
професор**

**Інна ВЛАДИМИРОВА****2%****17%**

---

**ВІДГУК**

наукового керівника на кваліфікаційну роботу магістерського ступеня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія

Павла БОРИСЮКА

на тему: «Аналіз технологій отримання рекомбінантних інсулінів».

**Актуальність теми.** До відкриття інсуліну пацієнти з діабетом не жили довго. Найуспішнішою терапією було призначення хворим на цукровий діабет суворої дієти з обмеженням вуглеводів. Це могло забезпечити пацієнтам ще кілька років життя, але не могло повністю їх вилікувати. Пацієнти помирали від голоду внаслідок суворих дієт. Винахід клонування ДНК Стенлі Коеном і Гербертом Боєром ознаменував початок генної інженерії, що призвело до створення різноманітних рекомбінантних білків із медичним використанням, зокрема інсуліну. Збільшення хворих на діабет та, відповідно, ріст попиту на інсулін, призвело до розвитку технологій його виробництва та появі нових продуктів по всьому світу. Тому тема роботи присвячена аналізу технологій виробництва препаратів інсуліну є актуальною.

**Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість.** У роботі детально розглянуті технології виробництва рекомбінантних інсулінів, а саме проінсуліновий метод і дволанцюговий метод, та системи експресії, що використовуються у технологіях рекомбінантних ДНК. Наведено їхні переваги та недоліки та запропоновано для реалізації на вітчизняному підприємстві застосовувати проінсуліновий метод на основі бактеріальної системи експресії.

**Оцінка роботи.** У роботі розглянуто теоретичні питання та обґрунтовано актуальність досліджень, виконані заплановані дослідження з аналізу технологій виробництва інсулінів та систем експресії, проведений порівняльний аналіз даних. Зроблено висновки та запропоновано напрямки використання отриманих результатів.

**Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту.** Дана кваліфікаційна робота містить всі необхідні розділи, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт магістра та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії, а її автор заслуговує присвоєння кваліфікації «магістр з біотехнологій та біоінженерії».

Науковий керівник

\_\_\_\_\_ (підпис)

Ольга КАЛЮЖНАЯ

(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

« 31 » січня 2024 р .

## РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу \_\_\_\_\_Павла БОРИСЮКА

(Ім'я, ПРИЗВИЩЕ )

на тему: «Аналіз технологій отримання рекомбінантних інсулінів».

**Актуальність теми.** Дефіцит інсуліну або відсутність належної відповіді клітин на доступний інсулін може призвести до цукрового діабету. Оскільки діабет і ожиріння досягають масштабів епідемії в багатьох країнах резистентність до інсуліну та пов'язані з нею симптоми стають все більш поширеними. Тому, дослідження, спрямовані на аналіз технологій сучасних препаратів інсулінів з можливістю подальшого впровадження на вітчизняних підприємствах, є актуальними.

**Теоретичний рівень роботи.** У роботі на достатньому рівні проведено аналіз даних літератури з питання стану сучасного ринку виробництва інсулінів; типів препаратів інсулінів, що випускаються сучасними виробниками; систем експресії рекомбінантних білків та технологій виробництва інсуліну.

**Пропозиції автора з теми дослідження.** На сьогоднішній день у виробництві рекомбінантного інсуліну використовують дві технології: через синтез проінсуліну та через окремий синтез ланцюгів А та В інсуліну. Автором складено технологічну схему виробництва рекомбінантного інсуліну через проінсулін за допомогою бактеріальної системи експресії штаму *Escherichia coli*. Ця технологія і система експресії на сьогоднішній день найдослідженіша та найдоступніша і може бути реалізована на вітчизняних підприємствах.

**Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість.** Автором у роботі для реалізації на вітчизняному підприємстві, зокрема на АТ «Фармак», яке характеризується інноваційним обладнанням та необхідними ресурсами, запропонована технологічна схема виробництва рекомбінантного інсуліну лізпро на основі бактеріальної системи експресії. Рівень проведення досліджень та застосовані методи є достатніми для того, щоб результати можна було вважати обґрунтованими.

**Недоліки роботи.** В роботі є деякі невдалі вирази, деякі розділи можна було викласти менш докладно.

**Загальний висновок і оцінка роботи.** Робота містить всі необхідні розділи, розрахунки та дослідження, виконана якісно, відповідно до вимог до кваліфікаційних робіт ступеня вищої освіти «магістр» та може бути представлена до захисту на засіданні Екзаменаційної комісії НФаУ.

Рецензент,  
Начальник відділу фармацевтичної  
розробки ТОВ «БІОЛІК ФАРМА»,  
к.фарм.н., с.н.с.



Назарова О.С.

«02» лютого 2024 р.



**ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ № 8**

«05» лютого 2024 року

м. Харків

**Засідання кафедри біотехнології**

**Голова:** завідувачка кафедри, доктор фармацевтичних наук, професор  
Наталя ХОХЛЕНКОВА.

**Секретар:** асистент закладу вищої освіти Аліна СОЛОВЙОВА.

**ПРИСУТНІ:** завідувачка кафедри Наталя ХОХЛЕНКОВА, професор  
закладу вищої освіти Ольга ФІЛІПЦОВА, професор закладу вищої освіти  
Лідія КРИЧКІВСЬКА, доцент закладу вищої освіти Ольга КАЛЮЖНАЯ,  
доцент закладу вищої освіти Наталія ДВІНСЬКИХ, доцент закладу вищої  
освіти Ольга ШАПОВАЛОВА, асистент закладу вищої освіти Аліна  
СОЛОВЙОВА.

**ПОРЯДОК ДЕННИЙ:**

Про представлення до захисту до Екзаменаційної комісії випускних  
кваліфікаційних робіт.

**I. СЛУХАЛИ:**

Здобувача вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія»  
ОП «Промислова біотехнологія» денної форми 2 курсу 1 групи Павла  
БОРИСЮКА з доповіддю на тему «Аналіз технологій отримання  
рекомбінантних інсулінів» (керівник доцент закладу вищої освіти Ольга  
КАЛЮЖНАЯ).

**УХВАЛИЛИ:**

Рекомендувати до захисту кваліфікаційну роботу.

**Голова**

Завідувачка кафедри,  
доктор фармацевтичних наук,  
професор

\_\_\_\_\_ (підпис)

Наталя ХОХЛЕНКОВА

**Секретар**

асистент закладу вищої освіти

\_\_\_\_\_ (підпис)

Аліна СОЛОВЙОВА

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ****ПОДАННЯ  
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ  
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувач вищої освіти Павло БОРИСЮК  
(Ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

до захисту кваліфікаційної роботи

за галуззю знань 16 Хімічна та біоінженерія

спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія

освітньою програмою Промислова біотехнологія

на тему: «Аналіз технологій отримання рекомбінантних інсулінів»

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету \_\_\_\_\_ Наталія ЖИВОРА

**Висновок керівника кваліфікаційної роботи**

Здобувач вищої освіти Павло БОРИСЮК рекомендується до захисту в Екзаменаційній комісії з кваліфікаційною роботою на тему: «Аналіз технологій отримання рекомбінантних інсулінів».

Керівник кваліфікаційної роботи \_\_\_\_\_ Ольга КАЛЮЖНАЯ

«31» січня 2024 р.

**Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу**

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Павло БОРИСЮК допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри біотехнології \_\_\_\_\_ Наталя ХОХЛЕНКОВА

«05» лютого 2024 року

Кваліфікаційну роботу захищено  
у Екзаменаційній комісії

«12» лютого 2024 р.

З оцінкою \_\_\_\_\_

Голова Екзаменаційної комісії,  
кандидат сільськогосподарських наук

\_\_\_\_\_ / Олена ЩЕРБАК /