

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: «ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА РЕКОМБІНАНТНОГО
СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНУ»**

Виконав : здобувачка вищої освіти групи 162БТ620(3,10з)-01а
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
Ілона ГОЛУБНИЧА

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

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

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

У роботі розглядається організація виробництва рекомбінантного соматотропного гормону (рСТГ) із застосуванням сучасних біотехнологічних методів. Наведено повний технологічний процес від конструювання експресійного вектора до отримання ліофілізованого продукту. Запропонована технологія включає використання *E. coli* BL21(DE3) як продуцента, стадії ферментації, руйнування клітин, виділення тілець включень, солюбілізації, рефолдингу білка, ферментативного розщеплення MetAsp-рСТГ, хроматографічного очищення та ліофілізації. Підкреслено екологічну безпеку процесу, відсутність шкідливих органічних розчинників, високу чистоту продукту (98,5%) та ефективність методів очищення.

Ключові слова: рекомбінантний соматотропний гормон, система експресії, ферментація.

ANNOTATION

The paper considers the organization of recombinant somatotrophic hormone (rSTH) production using modern biotechnological methods. The complete technological process from the construction of the expression vector to the production of the lyophilized product is presented. The proposed technology includes the use of *E. coli* BL21(DE3) as a producer, the fermentation stage, cell disruption, isolation of inclusion bodies, solubilization, protein refolding, enzymatic cleavage of MetAsp-rSTH, chromatographic purification and lyophilization. The ecological safety of the process, the absence of harmful organic solvents, high purity of the product (98.5%) and the efficiency of purification methods are emphasized.

Keywords: recombinant somatotrophic hormone, expression system, fermentation.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	5
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	21
2.1 Характеристика готового продукту.....	21
2.2 Характеристика сировини.....	29
2.3 Характеристика біологічного об'єкта.....	31
2.4 Біосинтез цільового продукту.....	41
3 Технологічна частина.....	47
3.1 Розрахунок матеріального балансу та вибір обладнання.....	47
3.2 Обґрунтування технології виробництва та опис технологічного процесу.....	50
3.3 Схеми виробництва.....	57
3.4 Екологічні аспекти виробництва.....	63
Висновок.....	67
Список використаної літератури.....	68
Додатки.....	73

					162.01.03.00 000 ПЗ			
Змн..	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив	Голубнича				Організація виробництва рекомбінантного соматотропного гормону Пояснювальна записка	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевірів	Калюжная						2	67
.						НФаУ Кафедра біотехнології		
Н. контр.								
Затвердив	Хохленкова Н.В.							

ВСТУП

Актуальність теми. Виробництво рекомбінантного соматотропного гормону є важливим напрямком біотехнології через його широкий спектр застосування в медицині для лікування порушень росту та інших гормональних дисбалансів. Розробка технологій із зниженими витратами часу, мінімізацією утворення небажаних форм рСТГ та високою екологічною безпекою дозволяє вирішити сучасні виклики в галузі. Зокрема, запропонована технологія забезпечує отримання продукту з високим ступенем чистоти (98,5%) без використання шкідливих розчинників, що відповідає потребам медичної та фармацевтичної галузей.

Мета роботи. Метою роботи є розробка та впровадження ефективної технології виробництва рекомбінантного соматотропного гормону з використанням *E. coli* BL21(DE3) для отримання продукту з високою чистотою та мінімальним рівнем забруднень, придатного для медичного застосування.

Для досягнення мети було виокремлено наступні завдання:

1. Провести аналіз сучасних підходів до виробництва рекомбінантного соматотропного гормону (рСТГ) із використанням бактеріальної системи експресії.
2. Обґрунтувати вибір штаму *E. coli* BL21(DE3) як продуцента рСТГ, враховуючи його характеристики, переваги та можливості для оптимізації процесу.
3. Розробити технологічну схему виробництва рСТГ з акцентом на шляхи оптимізації експресії гена.
4. Обґрунтувати рецептури живильних середовищ для ферментації та розрахувати потреби у компонентах для здійснення стадій ферментації продуцента та підібрати параметри апаратів для проведення процесу

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		3

вирощування продуцента.

5. Визначити оптимальні параметри культивування штаму *E. coli* BL21(DE3), включаючи умови індукції, щоб досягти максимального рівня експресії рСТГ (1,75 г/л).

6. Обґрунтувати вибір методів очищення рСТГ, які забезпечують отримання продукту з чистотою не менше 98,5% та мінімальними втратами активної субстанції.

7. Розробити апаратурну схему виробництва рСТГ для цеху ферментації.

8. Проаналізувати можливість використання розробленої технології для промислового виробництва біосимілярів соматотропного гормону на вітчизняних підприємствах.

9. Надати рекомендації щодо екологічної безпеки процесу, зокрема мінімізації використання токсичних речовин та органічних розчинників.

Об'єкт роботи. Процес виробництва рекомбінантного соматотропного гормону з використанням трансформованих клітин *E. coli*.

Предмет роботи. Технологічні етапи виробництва рСТГ, включаючи ферментацію, виділення тілець включень, очищення білка, ферментативне розщеплення та хроматографічне очищення.

Методи. Використано аналітичні та порівняльні методи для написання пояснювальної записки, а також графічні для складання креслень.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблена технологія дозволяє отримувати рекомбінантний соматотропний гормон із високою чистотою (98,5%) та мінімальним утворенням небажаних продуктів. Запропоновані методи знижують витрати на очищення, мінімізують використання шкідливих розчинників, що забезпечує екологічну безпеку процесу. Технологія може бути впроваджена у промислове виробництво для медичного застосування рСТГ. Окремі результати роботи було представлено на науково-практичному заході з виступом та публікацією тезису (Додаток).

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		4

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1 Характеристика порушень синтезу соматотропного гормона

Соматотропний гормон (СТГ), гормон росту, соматотропин, пептидний гормон, що виділяється передньою часткою гіпофіза. Він стимулює ріст практично всіх тканин організму, включаючи кістки. СТГ синтезується і секретується клітинами передньої долі гіпофіза - соматотрофами, які вивільняють від одного до двох міліграмів гормону щодня. СТГ життєво важливий для нормального фізичного росту дітей; його рівні поступово зростають у дитинстві та досягають піку під час стрибка росту, який відбувається в період статевого дозрівання [21].

У біохімічному плані СТГ стимулює синтез білка та збільшує розщеплення жиру, щоб забезпечити енергію, необхідну для росту тканин. Він також протистоїть дії інсуліну. СТГ може впливати безпосередньо на тканини, але більша частина його ефекту опосередкована стимуляцією печінки та інших тканин для виробництва та вивільнення інсуліноподібних факторів росту, в першу чергу інсуліноподібного фактору росту 1 (ІПФР-1; раніше називався соматомедин). Термін «інсуліноподібний фактор росту» походить від здатності високих концентрацій цих факторів імітувати дію інсуліну, хоча їх основною дією є стимуляція росту. Концентрації ІПФР-1 у сироватці прогресивно зростають з віком у дітей, особливо під час пубертатного стрибка росту. Після статевого дозрівання концентрація ІПФР-1 поступово знижується з віком, як і концентрація СТГ [33].

Секреція СТГ стимулюється релізінг-гормоном росту і пригнічується соматостатином. Крім того, секреція СТГ є пульсуючою, зі сплесками секреції, що відбуваються після початку глибокого сну, що особливо помітно в період

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						5
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

статевого дозрівання. У здорових суб'єктів секреція СТГ збільшується у відповідь на зменшення споживання їжі та фізіологічний стрес і зменшується у відповідь на прийом їжі. Однак деякі люди страждають від аномалій секреції гормону росту, які включають дефіцит або надлишок цього гормону.

Дефіцит СТГ є однією з багатьох причин низького росту - карликовості. Це насамперед виникає внаслідок пошкодження гіпоталамуса або гіпофіза під час внутрішньоутробного розвитку (вроджений дефіцит СТГ) або після народження (набутий дефіцит СТГ). Дефіцит СТГ також може бути спричинений мутаціями в генах, які регулюють його синтез і секрецію. Мутації в цих генах також можуть спричинити зниження синтезу та секреції інших гормонів гіпофіза. У деяких випадках дефіцит СТГ є результатом дефіциту релізінг-гормону росту, і в цьому випадку секреція СТГ може стимулюватися його інфузією. В інших випадках самі соматотрофи не здатні виробляти СТГ, або сам гормон є структурно аномальним і має незначну активність, що сприяє росту. Крім того, низький зріст і дефіцит СТГ часто виявляються у дітей з діагнозом психосоціальної карликовості, яка виникає внаслідок важкої емоційної депривації. Коли дітей з цим розладом вилучають із стресового середовища, їхня ендокринна функція та швидкість росту нормалізуються [21].

Діти з ізольованим дефіцитом СТГ мають нормальний розмір при народженні, але затримка росту стає очевидною протягом перших двох років життя. Рентгенограми епіфізів кісток показують затримку росту по відношенню до хронологічного віку пацієнта. Хоча статеве дозрівання часто затримується, фертильність і народження нормальних дітей можливі у хворих жінок [31].

Дефіцит СТГ найчастіше лікують ін'єкціями гормону. Концепція гіпофізарної субстанції, пов'язаної з ростом, була висунута у 1886 р., коли французький невролог П'єр Марі описав акромегалію. Пізніше з'явилося більше розуміння того, як порушення роботи гіпофіза можуть призвести до

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						6
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

акромегалії, гігантизму та надзвичайно низького зросту, і в 1909 р. американський нейрохірург Гарві Кушинг ввів термін «гормон росту». У 1921 р. Еванс і Лонг опублікували новаторське дослідження, яке встановило ефект стимуляції росту внутрішньоочеревинним введенням «дрібно подрібненої» свіжої передньої частки гіпофіза яловичини щурам. Через два десятиліття Еванс і Лі виділили речовину, яка сприяла росту у тварин з гіпофізектомією, з передньої частки гіпофіза биків [26].

Лікування гормоном росту людини почалося наприкінці 1950-х років, а рекомбінантна форма використовується з середини 1980-х років. Спроби лікувати крайній низький ріст бичачим гормоном росту почалися у 1930-х роках, але з невтішними результатами. Було висловлено припущення, що гормон росту є видоспецифічним гормоном, і ще один доказ надали Кнобіл і Гріп у відомому дослідженні, яке показало, що мавпи-резус реагували лише на гормон росту приматів. Пізніше дослідження показало, як ця специфічність була пов'язана з однією зміною в амінокислотному ланцюгу білка СТГ, що обмежувало людський рецептор гормону лише для взаємодії з СТГ людини або інших приматів [10].

Протягом 1950-х і 1960-х років вилучення та очищення СТГ з гіпофізів людських трупів було дуже дорогим і трудомістким, але поступові вдосконалення розширили доступ до цього гормону. Проте протягом десятиліть доступність цього гормону була обмежена, оскільки його отримували виключно з трупних гіпофізів людини. Біохімічна структура гормону була ідентифікована у 1970-х роках, ген СТГ був клонований в 1979 р., а розробка синтетично отриманого СТГ за допомогою технології рекомбінантної ДНК почалася на початку 1980-х років. У 1985 р. використання природного гормону росту було припинено в Сполучених Штатах та кількох інших країнах через ймовірність того, що гормон був забруднений типом патогенного агента, відомого як пріон, який викликає смертельний стан, який називається хвороба Крейтцфельда-Якоба. На

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		7

сьогоднішній день у всьому світі зареєстровано понад 200 пацієнтів, пов'язаних із зараженими препаратами трупного походження. На щастя, приблизно в той самий час став доступним рекомбінантний людський СТГ, і будь-яке використання гіпофізарного гормону практично припинилося. Це був не тільки великий прорив у забезпеченні «чистої» субстанції для пацієнтів із важким дефіцитом гормону росту, але й створив можливості для необмеженого постачання гормону, дозволяючи розширити показання до лікування для більшої кількості груп пацієнтів [25].

Діти з дефіцитом гормону росту добре реагують на ін'єкції рекомбінантного СТГ, часто досягаючи майже нормального росту. Однак у деяких дітей, насамперед із спадковою нездатністю синтезувати гормон, виробляються антитіла у відповідь на ін'єкції гормону. Діти з низьким зростом, не пов'язаним з дефіцитом СТГ, також можуть рости у відповідь на ін'єкції гормонів, хоча часто потрібні великі дози.

Існує рідкісна форма низького зросту спричинена спадковою нечутливістю до дії СТГ. Цей розлад відомий як карликовість Ларона і характеризується аномальними рецепторами СТГ, що призводить до зниження стимульованого СТГ виробництва ІПФР-1 і уповільнення росту. Сироваткові концентрації СТГ є високими через відсутність інгібуючої дії ІПФР-1 на секрецію гормону. Карликовість також може бути спричинена нечутливістю кісткової тканини та інших тканин до ІПФР-1, що є результатом зниження функції рецепторів ІПФР-1.

Дефіцит СТГ часто зберігається в зрілому віці, хоча деякі люди, уражені в дитинстві, мають нормальну секрецію СТГ у дорослому віці. Дефіцит СТГ у дорослих пов'язаний із втомою, зниженням енергії, депресивним настроєм, зниженням м'язової сили, зменшенням м'язової маси, тонкою та сухою шкірою, збільшенням жирової тканини та зменшенням щільності кісток. Лікування СТГ усуває деякі з цих аномалій, але може спричинити затримку рідини, цукровий діабет і високий кров'яний тиск [21].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		8

Надмірна продукція СТГ найчастіше викликана доброякісною пухлиною (аденомою) соматотрофних клітин гіпофіза. У деяких випадках пухлина легенів або панкреатичних острівців Лангерганса виробляє рилізінг-гормон росту, який стимулює соматотрофи виробляти велику кількість СТГ. У рідкісних випадках ектопічна продукція СТГ (виробництво пухлинними клітинами в тканинах, які зазвичай не синтезують СТГ) викликає надлишок гормону. Соматотрофні пухлини у дітей зустрічаються дуже рідко і викликають надмірний ріст, що може призвести до надзвичайного росту (гігантизму) та особливостей акромегалії [21].

Акромегалія означає збільшення дистальних (акральних) частин тіла, включаючи руки, ноги, підборіддя та ніс. Збільшення пов'язане з надмірним розростанням хряща, м'язів, підшкірної клітковини та шкіри. Таким чином, пацієнти з акромегалією мають виступаючу щелепу, великий ніс, великі кисті та ноги, а також збільшення більшості інших тканин, включаючи язик, серце, печінку та нирки. На додаток до впливу надлишку СТГ, сама пухлина гіпофіза може спричинити сильний головний біль, а тиск пухлини на перехрестя зорового нерва може спричинити дефекти зору [21].

Оскільки метаболічні дії СТГ є антагоністичними (протилежними) дії інсуліну, у деяких пацієнтів з акромегалією розвивається цукровий діабет. Інші проблеми, пов'язані з акромегалією, включають високий кров'яний тиск, серцево-судинні захворювання та артрит. Пацієнти з акромегалією також мають підвищений ризик розвитку злоякісних пухлин товстого кишечника. Деякі соматотрофні пухлини також виробляють пролактин, що може спричинити порушення лактації (галакторея). Пацієнтів з акромегалією зазвичай лікують шляхом хірургічної резекції пухлини гіпофіза. Їх також можна лікувати за допомогою променевої терапії або таких препаратів, як пегвісомант, який блокує зв'язування гормону росту з його рецепторами, і синтетичних аналогів соматостатину тривалої дії, які пригнічують секрецію СТГ [21, 25].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		9

1.2 Будова соматотропного гормону

Людський гормон росту існує у двох формах: пре-білок СТГ (попередник) і зрілий СТГ. Пре-білок містить сигнальний пептид із 26 залишків, розташований на N-кінці білка, який відщеплюється для створення зрілого білка.

Сигнальний пептид діє як якір, щоб утримувати пре-білок зв'язаним з мембраною ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР). Після належної передачі сигналу пов'язана з мембраною ЕПР сигнальна І пептидаза розщеплює пре-білок довжиною 217 амінокислот між залишками 26 і 27, у результаті чого утворюється зрілий секреторний СТГ довжиною 191 залишок (рис. 1.1). Цей активний білок вивільняється з мембрани в просвіт ЕПР і експортується з клітини [10].

Виявлено, що мутації залишків у сигнальному пептиді впливають на секрецію СТГ з клітини. Зокрема, варіант Lys16Pro асоціюється зі зниженими рівнями СТГ через пригнічену секрецію, що призводить до ізолюваного дефіциту гормону росту типу 1В.

Первинна структура. Ідентифіковано чотири природні варіанти сплайсингу або ізоформи людського гормону росту. Різні ізоформи утворюються, коли сплайсинг п'яти екзонів відбувається в різних положеннях. У всіх чотирьох ізоформах перші 26 амінокислот на N-кінці присутні лише у формі попередника і не є частиною активного гормону. 22KD GH (22 K-GH) є найбільш поширеним варіантом і вважається канонічною послідовністю, що означає, що вона служить посиленням на інші ізоформи з точки зору розташування ознак. За ним йдуть 20KD GH (20 K-GH) та інші рідкісні ізоформи. Однією з ключових відмінностей інших ізоформ є те, що оскільки в них відсутні певні ділянки амінокислот, то одноточкові мутації, які природним чином виникають у цих областях, не впливатимуть на функцію чи активність

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						10
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

білків ізоформ. Наприклад, існує кілька одноточкових мутацій, які відбуваються в діапазоні амінокислот з 58 по 72. Ця ділянка відсутня в ізоформі 2, і тому цей варіант білка не сприйнятливий до таких змін. Подібним чином існують одноточкові мутації в діапазоні амінокислот 111-148 і 117-162, які призводять до зниження секреції і втраті активності. Отже, оскільки ізоформи 2 і 3 не мають цих ділянок, вони не схильні до цих різних впливів на активність [21].

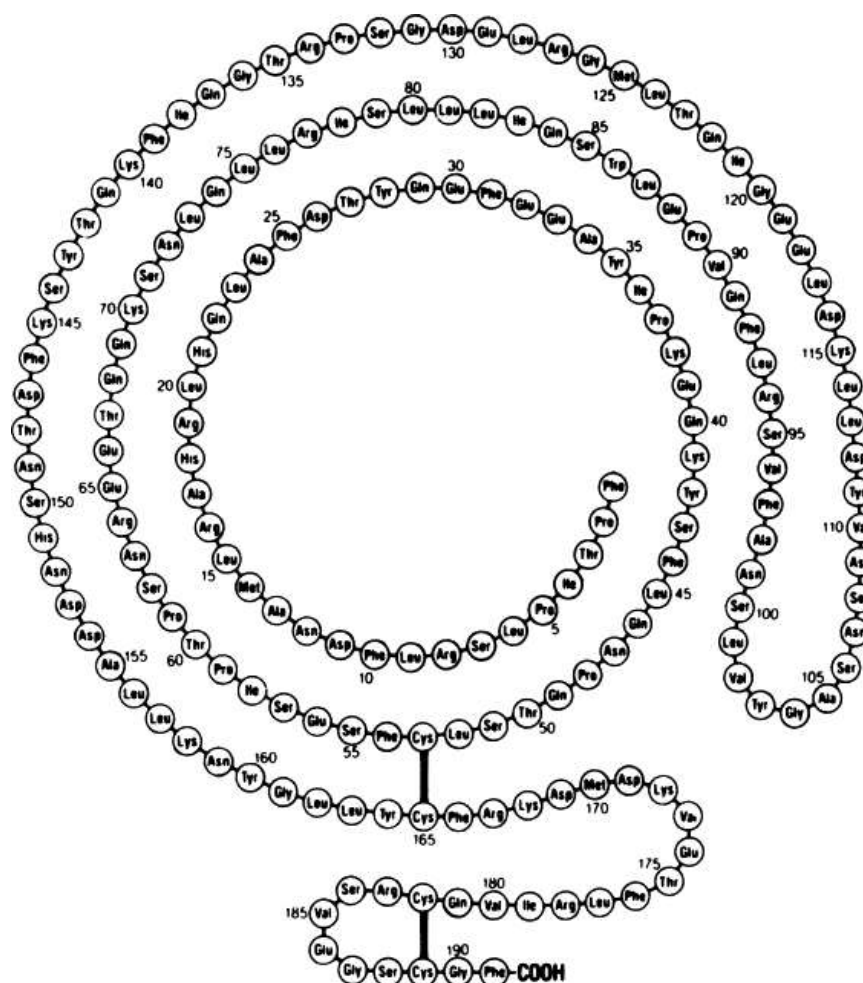


Рис. 1.1 – Первинна структура СТГ

(Джерело: Growth Hormone, Vivien S. Herman-Bonert, Shlomo Melmed, in The Pituitary, 2011)

Ізоформа 1 (СТГ 1) (191 амінокислота; молекулярна маса = 24 847 кДа)

СТГ 1 експресується головним чином у соматотропних клітинах гіпофіза. Ця молекула 22 К-ГН є основною ізоформою СТГ, що становить

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

понад 90% загального гормону в циркуляції. Його третинна структура являє собою 4-спіральний скручений пучок з незвичайною зв'язністю. Спіралі рухаються вгору-вниз-вниз замість більш звичайної форми вгору-вниз-вгору-вниз. СТГ 1 найбільш відомий завдяки своїй активності, що стимулює ріст у дітей, але також має важливу біологічну активність у дорослих. До них відносяться ліполіз, метаболізм глюкози, кальцію і фосфору, а також лактогенез і імунна функція.

Ізоформа 2 (176 амінокислот; молекулярна маса = 22 992 кДа; відсутні амінокислоти 58-72)

Другою за поширеністю ізоформою СТГ є молекула 20 К-ГН. Походить від СТГ-1 шляхом альтернативного сплайсингу пре-месенджерної рибонуклеїнової кислоти (пре-мРНК) екзона 3. Структура подібна до 22 К-ГН, за винятком делеції внутрішніх залишків 32–46. Таким чином, 20 К-ГН складається лише з 176 амінокислот.

Ізоформа 3 (153 амінокислоти; молекулярна маса = 20 561 кДа; відсутні амінокислоти 111-148).

Ізоформа 4 (145 амінокислот; молекулярна маса = 19 802 кДа; відсутні амінокислоти 117-162).

Вторинна структура. СТГ є одноланцюговим пептидом, який на 45% складається зі спіралі з 8 α -спіралями.

Третинна структура (рис. 1.2). Кристалічна структура СТГ показує, що ядро білка є пучком з чотирьох спіралей. Спіралі 1 і 4 на кінцях NH₂ і COOH довші за спіралі 2 і 3. Коротка петля з'єднує спіралі 2 і 3, а два довгих перехресних з'єднання з'єднують спіралі 1 і 2 і спіралі 3 і 4. Спіралі йдуть вгору-вниз-вниз. Це незвично, тому що зазвичай чотири пучки спіралі демонструють орієнтацію вгору-вниз-вгору-вниз.

Додаткові три набагато менші спіралі існують у сполучних петлях: одна на початку з'єднання між спіралями 1 і 2, одна в кінці з'єднання між спіралями 1 і 2 і одна в короткому петлевому з'єднанні між спіралями 2 і 3.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						12
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

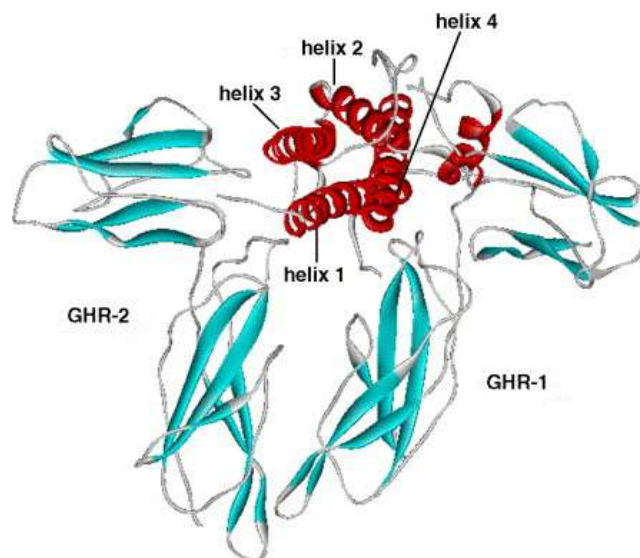


Рис. 1.2 – Третина структура СТГ:
петлі 1-4 (helix 1-4), Ізоформи GHR-1, 2 – СТГ-1, 2
(Джерело: Growth hormone isoforms and segments/fragments: Molecular structure and
laboratory measurement, Elio F. De Palo et al, 2006)

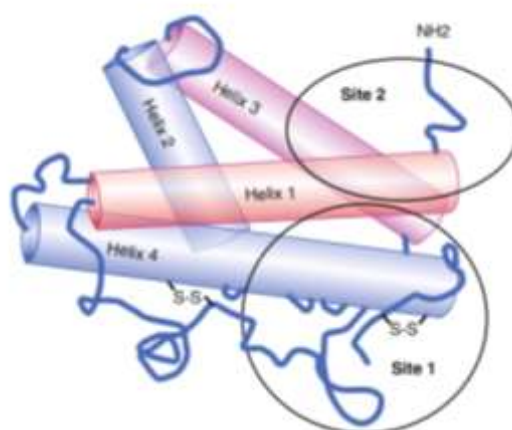


Рис. 1.3 - Схематична тривимірна структура СТГ, що демонструє
чотири антипаралельні α -спіралі, сайти зв'язування рецепторів 1 і 2, та
розташування двох дисульфідних містків (S-S)

(Джерело: Pharmaceutical Biotechnology. Fundamentals and Applications. Fourth
Edition, Daan J.A. Crommelin et al., 2013)

Посттрансляційні модифікації: фосфорилювання, глікозилювання.

Фосфорилювання. Гормон росту фосфорилюється за залишками Ser 132
і 176. Також можливе фосфорилювання залишків Tyr 35 і 42. Однак ці

фосфорилування досліджувалися лише в клітинах карциноми з конститутивно активною тирозинкіназою, стимульованою епідермальним фактором росту. Загальний вплив цих посттрансляційних модифікацій на активність гормону вивчається.

Глікозилювання допомагає розрізняти різні варіанти та ізоформи, оскільки воно працює як ідентифікаційна картка для білків. Ці вуглеводи є специфічними для кожної форми і розпізнаються пов'язаними рецепторами.

1.3 Загальні підходи до виробництва рекомбінантного гормону росту

Після заборони використання гормону росту, отриманого з гіпофізу трупів, соматотропін почали застосовувати тільки рекомбінантний. Його отримання базується на технології рекомбінантної ДНК, яка дозволяє синтезувати гормон у мікроорганізмах, таких як *E. coli*, дріжджі або клітини ссавців. Після успіху з інсуліном вчені Genentech намагалися створити рекомбінантні процеси для виробництва складніших гормонів, таких як людський гормон росту, біохімічну структуру якого було відкрито в 1972 р [25].

Але в той час як інсулін містить загалом 51 амінокислоту, людський гормон росту має 191. Вчені з Genentech зрозуміли, що ген буде занадто великим, щоб вони могли синтезувати його повністю, як це було з інсуліном, тому вони синтезували частину гена безпосередньо, літ. буквою, але створив іншу частину за допомогою кДНК, яка є ДНК, створеною за допомогою месенджерної РНК, що кодує білок як шаблон [31].

Команді Genentech вдалося створити перший рекомбінантний людський гормон росту в 1981 р., який був швидко схвалений FDA після скандалу з

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						14
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

інфікуванням пріонними агентами і представлений як терапія для серйозного дефіциту гормону росту в 1985 р. [27, 31].

У той час як використання людського гормону росту було суворо обмежено до введення рекомбінантної версії в 1985 р., його розробка та необмежена доступність призвели до його використання при кількох додаткових захворюваннях, зокрема у дітей з хронічною хворобою нирок, синдромом Тернера та синдромом Прадера-Віллі. Після появи рекомбінантного людського гормону росту цей перелік показань значно розширився. Тепер він включає такі стани, як «ідіопатичний низький зріст», що означає, що людина не має основних проблем зі здоров'ям, але менш ніж на два стандартних відхилення нижче середнього зросту для свого віку.

Останніми роками виникла суперечка щодо широкого використання людського гормону росту та щодо того, чи просто низький ріст без супутніх захворювань потребує дорогого лікування, такого як людський гормон росту, особливо, оскільки це лікування дітей. Нещодавні аналізи також показали, що гормон росту людини збільшує ріст незначно, і вчені припускають, що переваги не варті частих ін'єкцій або ціни приблизно в 52 000 доларів за дюйм додаткового зросту.

Хоча людський гормон росту відповідає за ріст дітей, він також допомагає підтримувати тканини та органи у дорослих. Однак, коли ми досягаємо середнього віку, кількість людського гормону росту, який ми виробляємо, починає падати. Це падіння змусило деяких людей задуматися, чи може підтримка високого рівня людського гормону росту в зрілому віці допомогти зменшити деякі наслідки старіння, як-от зменшення кісткової та м'язової маси. В результаті цих теорій рекомбінантний людський гормон росту був популярним, але незаконним препаратом для підвищення працездатності з 1980-х років [21].

Дослідження показали, що людський гормон росту може збільшити м'язову масу та зменшити жирові відкладення, але він також супроводжується

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						15
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

побічними ефектами, включаючи підвищений ризик діабету, болю в суглобах, м'язах, затримки рідини та високого кров'яного тиску. Більше того, клінічні випробування не показали, що людський гормон росту підвищує спортивні результати [21].

Незважаючи на це, успіхи соматостатину, інсуліну та людського гормону росту дали поштовх біотехнологічній промисловості, і список терапій рекомбінантними протеїнами продовжував збільшуватися протягом десятиліть [1, 8].

Лікування, схвалені FDA, тепер включають фолікулостимулюючий гормон, жіночий статевий гормон, який колись був виділений із сечі, фактори згортання крові, які колись збирали з крові, і багато іншого.

У 1978 р. американська компанія Genentech розробила перший рекомбінантний гормон росту (Protropin®), використовуючи технологію рекомбінантної ДНК на основі класичної вже системи експресії *E.coli*. У 1985 р. FDA схвалила його для клінічного застосування. Подальший розвиток технологій включав створення більш ефективних систем експресії, таких як клітини ссавців (CHO) і дріжджі, які дозволяють отримувати гормон, ідентичний натуральному [10].

Основними етапами виробництва є: конструювання вектора, трансформація вектора до продуцента, культивування продуцента, індукція експресії, руйнування клітин, відділення біомаси, виділення та очищення гормону [12].

На першому етапі ген відповідальний за виробництво гормону росту клонують у плазмідний вектор, наприклад, PTrcHis-ТОРО. Вектор містить промотор (*lac*, *trc* або T7), маркер резистентності до антибіотика, His-тег для подальшого очищення та ген, що кодує гормон росту.

Вектор вводять у клітини господаря, такі як: *E. coli* (бактеріальні системи), дріжджі (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*), клітини ссавців (CHO) [14].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

Перевагами бактеріальних систем є висока швидкість росту та низька вартість, але білки накопичуються у вигляді тілець включення, тому необхідне додаткове очищення. Перевагами використання дріжджових системи є наявність посттрансляційних модифікацій, якої немає у прокаріотів, і яка забезпечує необхідне згортання білків, при цьому дріжджі також просто та швидко виростити, але серед недоліків утворення глікозильованих залишків. Максимально ідентичний людському гормон отримують за допомогою клітин ссавців, але, незважаючи на багаторічні дослідження багатьох біотехнологічних компаній в цьому напрямку, реалізація технологічного процесу в промисловому масштабі залишається дороговартісною [6].

Трансформація проводиться за допомогою хімічного або електропораційного методу.

Трансформовані клітини вирощують у ферментерах, забезпечуючи оптимальні умови (температура, рН, поживні речовини). Для бактеріальних систем зазвичай використовують середовище LB або M9. Для клітин ссавців – спеціалізовані поживні середовища.

Ген СТГ активують за допомогою індукторів, наприклад, IPTG для бактерій або метанолу для дріжджів.

Після досягнення пікової експресії клітини руйнують (хімічно, механічно або ультразвуком), щоб вивільнити білок.

Очищення гормону проводять методами афінної хроматографії (His-тег, нікелева колонка), гель-фільтрації, іонообмінної хроматографії. Чистота продукту досягає 99%.

Гормон стерильно фільтрують, ліофілізують або формують як рідкий препарат. Додають стабілізатори (гліцин, манітол) для тривалого зберігання.

Основними торговими марками рекомбінантного СТГ у світі є: Генотропін Genotropin, Гуматроп Humatrope, Нордітропін НордіФлекс Norditropin NordiFlex, Нордітропін Флекспро Norditropin Flexpro, Nutropin Aq

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

Nutropin Aq, Омнітроп Omnitrope, Сайзен Saizen. У табл. 1.1 наведена характеристика цих препаратів [27, 31].

Таблиця 1.1 – Основні препарати рекомбінантного СТГ, схвалені FDA та ЕМА

Компанія	Бренд	Форма випуску	Сила дози (мг)
Pfizer	Genotropin®	Ручка-картридж	5.3 мг і 12.0 мг
	GoQuick®	Попередньо заповнена багатодозова ручка	5.3 мг і 12.0 мг
	MiniQuick®	Одноразовий шприц	Від 0.2 мг до 2 мг (з кроком 0.2 мг)
Sandoz	Omnitrope®	Ручка -картридж Surepal	5 мг, 10 мг і 15 мг
Eli Lilly	Humatrope®	Ручка -картридж	6 мг, 12 мг і 24 мг
Ipsen	Nutropin Aq®	Ручка -картридж	10 мг
Novo Nordisk	Norditropin®	Попередньо заповнена багатодозова ручка	5 мг, 10 мг і 15 мг
	Flexpro®	Попередньо заповнена багатодозова ручка	5 мг, 10 мг і 15 мг
	Nordiflex®	Попередньо заповнена багатодозова ручка	5 мг, 10 мг і 15 мг
Merck Sereno	Saizen®	Ручка -картридж	6 мг, 12 мг і 20 мг

Усі рекомбінантні гормони росту, за винятком Serostim®/Saizen®/Zorbtive®, виробляються у бактеріях (*E. coli*) або дріжджів (*S. cerevisiae*). Serostim®/Saizen®/Zorbtive® виробляються у клітинах ссавців (клітини миші C127) [31].

Гормон росту, вироблений у цитоплазмі *E. coli*, може містити залишок метіоніну на N-кінці. Природна послідовність СТГ виробляється або шляхом ферментативного видалення метіонінового залишку під час процесу очищення, або через секрецію СТГ у периплазматичний простір, де клітина видаляє сигнальний пептид, розкриваючи природний N-кінцевий кінець гормону. СТГ може бути вироблений у периплазмі у розчинній, правильно складеній формі або у вигляді включних тілець, які вимагають виділення нерозчинного СТГ, його денатурації та повторного згортання. СТГ вивільняється з клітин шляхом осмотичного шоку (периплазма) або

механічного лізису (цитоплазма і периплазма), після чого білок вилучають і очищають [25].

СТГ, синтезований у дріжджах і клітинах ссавців, транспортується через ендоплазматичний ретикулум і секретується безпосередньо в культуральне середовище, з якого він вилучається і очищується.

Історично активність продуктів hGH виражалася в міжнародних одиницях на мг (МО/мг, IU/mg). Початковий стандарт, встановлений у 1982 р. для препаратів СТГ з гіпофіза, становив 2 МО/мг. Стандарт для продуктів рекомбінантного СТГ (рСТГ) становив 2,6 МО/мг до вересня 1994 р. Нинішній стандарт ВООЗ, встановлений у вересні 1994 року, становить 3,0 МО/мг. Проте на сьогоднішній день використання дозування в МО більше не є необхідним через високий рівень чистоти та стабільної активності продуктів rhGH, тому дози зазвичай виражаються в МО/кг або МО/м² в Європі та Японії і в мг/кг у США [10].

Усі сучасні препарати рСТГ доступні у вигляді ліофілізованих або рідких форм. Ліофілізовані формули зазвичай містять 5 або 10 мг білка в гліциново-манітоловому або сахарозному фосфатному буферному ексципієнті. Матеріали зазвичай розчиняють стерильною водою для ін'єкцій (для одноразового використання) або стерильними водою чи фізіологічним розчином (для багаторазового використання) [27, 31].

Рідкі форми рСТГ (Nutropin AQ®, Omnitrope®, Norditropin® SimpleXx®) містять ексципієнти, такі як манітол або хлорид натрію, гістидин або цитратний буфер, полоксамер 188 або полісорбат 20, а також фенол або бензиловий спирт. Стабільність продукту є дуже високою, з терміном придатності 2 роки при температурі 2–8 °С.

Omnitrope® (США/ЄС) та Valtropin (лише ЄС), ліофілізовані препарати рСТГ, були схвалені для продажу як перші «біосиміляри» rhGH у 2006 р. Дві концентрації Omnitrope® (5 і 10 мг у картриджах) були схвалені для продажу

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

в 2008 р. для використання у ручках (пен-пристроях) (Omnitrope Pen® 5 та Omnitrope Pen® 10) [27, 31].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						20
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Готовий продукт – рекомбінантний гормон росту, отриманий за допомогою бактеріальної системи експресії. Первинна структура гормону наведена на рис. 2.1.

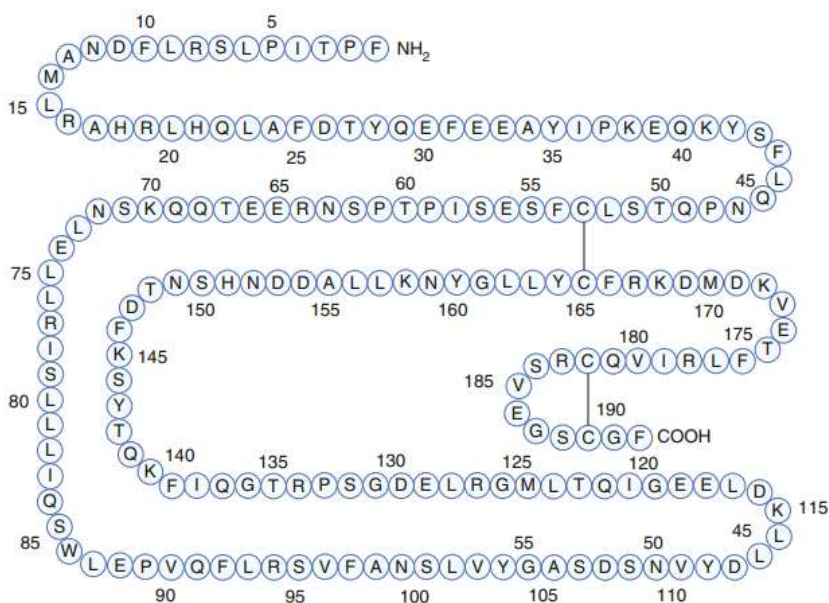


Рис. 2.1 – Первинна структура рекомбінантного СТГ

Через складність молекулярної формули в базі PubChem наданий опис окремих ділянок молекули рСТГ, окремих пептидів. На рис. 2.2 – 2.4 наведені приклади.

Соматотропін (1-43), hGH (1-43), гормон росту людини (1-43).

Молекулярна формула C₂₃₉H₃₅₄N₆₂O₆₇S

Молекулярна маса 5200 г/моль

Назва IUPAC L-фенілаланіл-L-проліл-L-треоніл-L-ізолейцил-L-проліл-L-лейцил-L-серил-L-аргініл-L-проліл-L-фенілаланіл-L-альфа-аспартил -L-

аспарагіл-L-аланіл-L-метіоніл-L-лейцил-L-аргініл-L-аланіл-L-гістидил-L-аргініл-L-лейцил-L-гістидил-L-глутамініл-L-лейцил-L-аланіл-L-фенілаланіл-L-альфа-аспартил-L-треоніл-L-тирозил-L-глутамініл-L-альфа-глутаміл-L-фенілаланіл-L-альфа-глутаміл-L-альфа-глутаміл-L-аланіл-L-тирозил-L-ізолейцил-L-пролін-L-лізил-L-альфа-глутаміл-L-глутамініл-L-лізил-L-тирозил-L-серин.

Ідентифікатор CAS 89800-63-5

Точна маса 5198,5987099 Да.

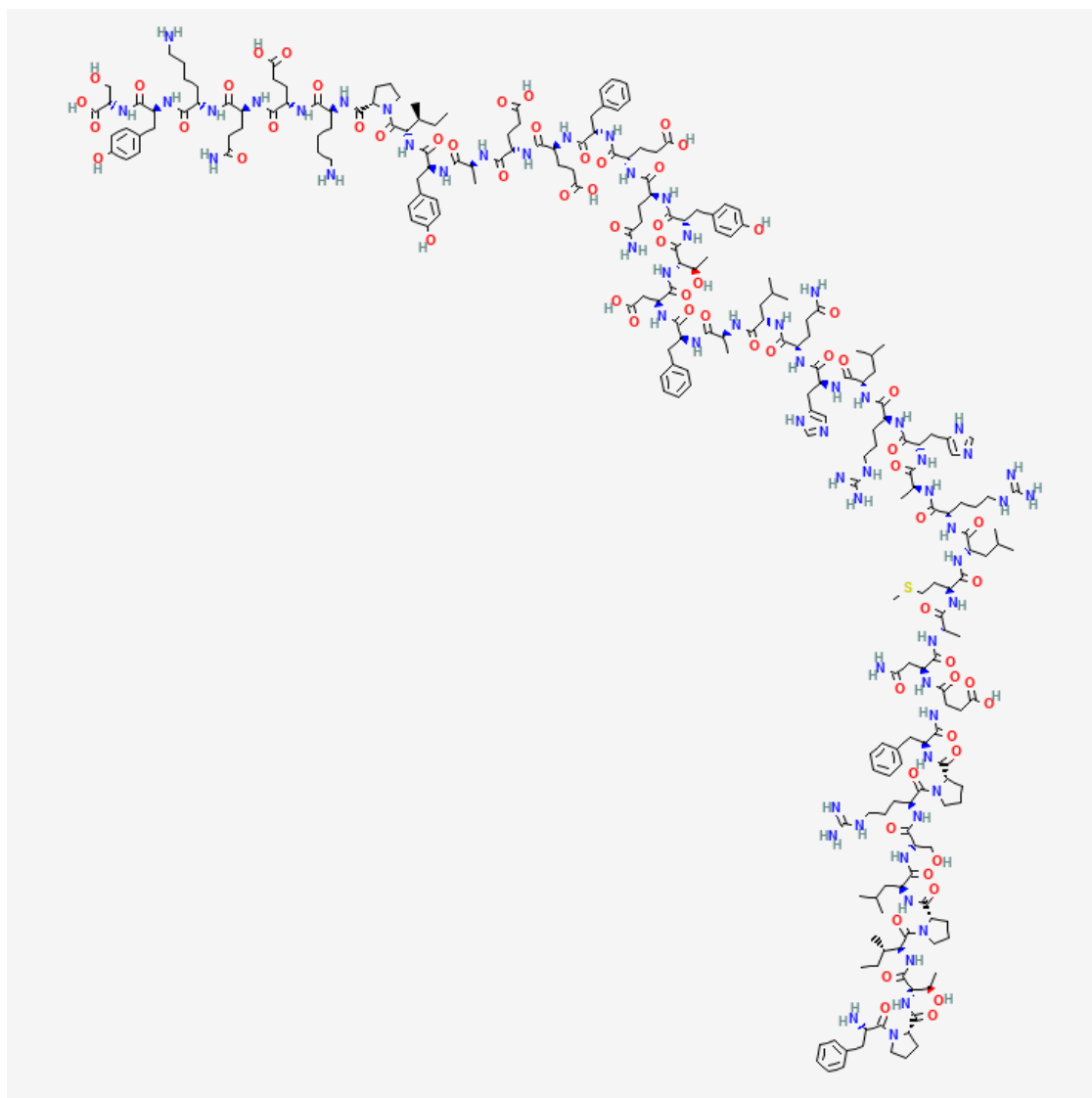


Рис. 2.2 – Первинна структура пептиди СТГ (1-43)

(Джерело: PubChem)

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

Соматотропін (6-13), hGH (6-13), гормон росту людини (6-13)

Молекулярна формула $C_{41}H_{66}N_{12}O_{13}$

Молекулярна маса 935,0 г/моль

Назва IUPAC L-лейцил-L-серил-L-аргініл-L-лейцил-L-фенілаланіл-L-альфа-аспартил-L-аспарагіл-L-аланін

Ідентифікатор CAS 55207-83-5

Точна маса 934,48723021 Да

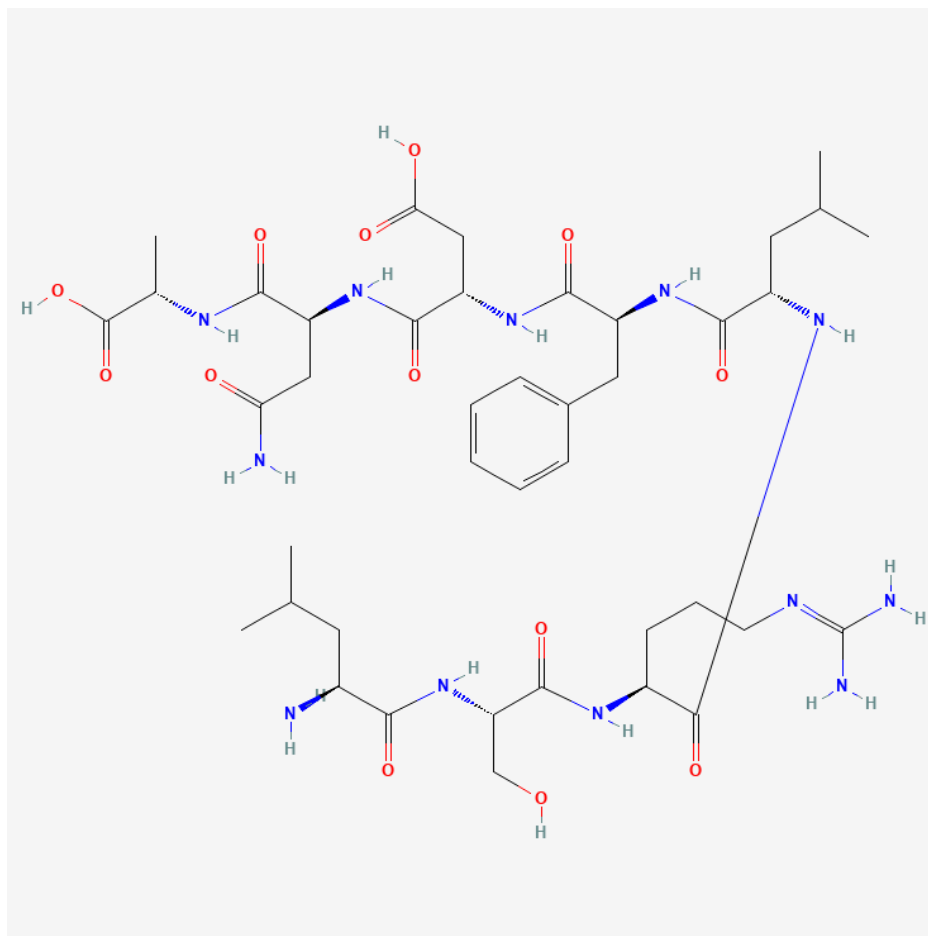


Рис. 2.3 – Первинна структура пептиди СТГ (6-13)

(Джерело: PubChem)

Соматотропін (177-191), hGH (177-191), гормон росту людини (177-191)

Молекулярна формула $C_{69}H_{114}N_{22}O_{21}S_2$

Молекулярна маса 1651,9 г/моль

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						23
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Назва IUPAC [(4S)-4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2R)-2-аміно-3-сульфаніліденпропаніл] аміно]-5-(діамінометиліденаміно)пентаноїл]аміно]-3-гідроксипропаноїл]аміно]-3-метилбутаноїл]аміно]-5-[[2-[[[(2 S)-1-[(2 S)-2-[[2-[[[(2R)-2-аміно-3-сульфанілпропаноїл]аміно]ацетил]аміно]-3-фенілпропаноїл]окси-3-гідрокси-1-оксопропан-2-іл]аміно]-2-оксоетил]аміно]-5-оксопентаноїл] (2S)-5-аміно-2-[[[(2 S)-2-[[[(2S, 3S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-аміно-4-метилпентаноїл]аміно]-5-(діамінометиліденаміно)пентаноїл] аміно]-3-метилпентаноїл]аміно]-3-метилбутаноїл]аміно]-5-оксопентаноат

Ідентифікатор CAS 66004-58-8

Точна маса 1650,79703108 Да

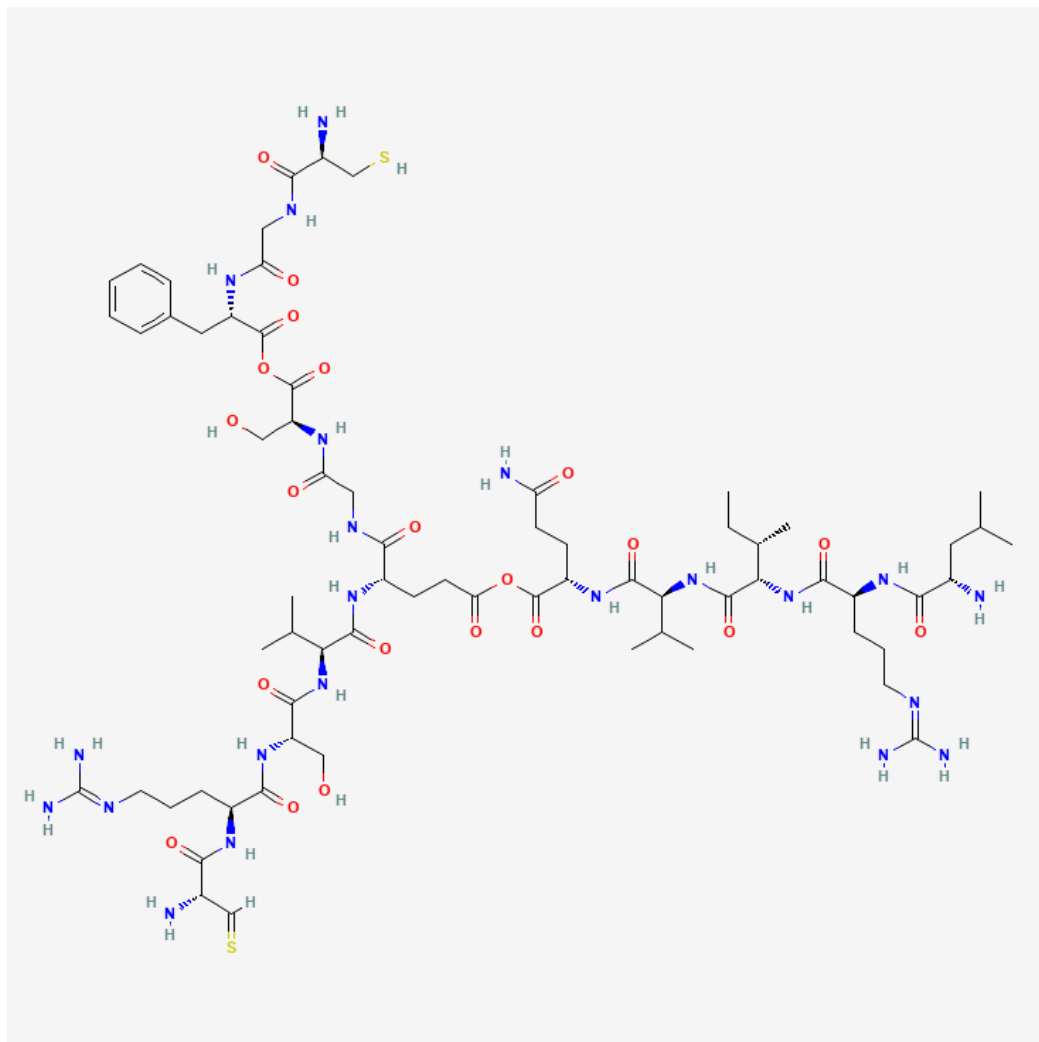


Рис. 2.4 – Первинна структура пептиди СТГ (177-191)

(Джерело: PubChem)

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

У роботі гормон пропонується вироблятися у вигляді ліофільно висушеного порошку для приготування розчину для внутрішньомязового використання, розчинник – вода для ін'єкцій.

Лікарська форма. Ліофілізований порошок та розчинник для приготування розчину для ін'єкцій.

Основні фізико-хімічні властивості. Порошок: гомогенна, ліофілізована речовина білого кольору. Розчинник: має бути практично без механічних домішок.

Склад препарату: рСТГ, активність (близька до генотропіну) 16 МО (5,3 мг). Стандартними допоміжними речовинами (стабілізаторами) є гліцин, маніт (Е 421), натрію дигідрофосфат безводний, натрію гідрофосфат (додекагідрат).

Фармакотерапевтична група. АТС-рівень класифікація:

Н Препарати гормонів для системного застосування за винятком статевих гормонів та інсулінів

H01 Гіпофізарні, гіпоталамічні гормони та їх аналоги

H01A Гормони передньої частки гіпофіза та їх аналоги

H01AC Соматропін та його аналоги

Показання для застосування (стандартні для препаратів соматотропіну та його аналогів).

Діти:

1. порушення росту через дефіцит гормону росту – недостатня секреція гормону росту.

2. порушення росту, пов'язані з синдромом Тернера або хронічною нирковою недостатністю.

3. Затримка росту у дітей низького зросту, народжених меншими за норму для свого гестаційного віку:

Стандартне відхилення поточного зросту менше -2,5.

Стандартне відхилення генетично зумовленого зросту менше -1.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

Стандартне відхилення у масі та/або довжині тіла при народженні менше -2.

4. Відсутність досягнення вікової норми зросту до 4 років або пізніше (стандартне відхилення швидкості росту менше 0 за останній рік).

5. Синдром Прадера-Віллі:

Для покращення росту та корекції будови тіла.

Діагноз підтверджується генетичними тестами.

6. Ідіопатична низькорослість (низький зріст без дефіциту гормону росту):

Коефіцієнт стандартного відхилення $< -2,25$.

Висока ймовірність неможливості досягнення нормального зросту у дорослому віці.

Відсутність інших причин низькорослості, які потребують іншого лікування.

Дорослі:

1. Замісна терапія при вираженому дефіциті гормону росту:

У дорослих із множинним гормональним дефіцитом через патологію гіпоталамуса чи гіпофіза.

Пацієнти, які мають дефіцит одного чи більше гормонів гіпофіза (окрім пролактину), потребують динамічного тесту для підтвердження дефіциту гормону росту.

2. Дефіцит гормону росту, що виник у дитинстві:

У пацієнтів із дефіцитом гормону росту через спадкові, генетичні, набуті або невідомі причини.

Після завершення поздовжнього росту слід провести повторний тест на здатність секреції гормону.

Для пацієнтів із високою ймовірністю постійного дефіциту (наприклад, через спадкові фактори чи гіпоталамо-гіпофізарні захворювання) достатньою підставою для діагностики вважається середнє відхилення інсуліноподібного

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

фактора росту типу 1 (ІФР-1) менше -2 без терапії гормоном росту протягом 4 тижнів.

В інших випадках потрібен аналіз ІФР-1 і один тест стимуляції гормону росту.

Фармакологічні властивості (стандартні для препаратів соматотропину та його аналогів).

Фармакодинаміка:

Соматропін - це потужний метаболічний гормон, який регулює обмін ліпідів, вуглеводів і білків. Він отримується за допомогою технології рекомбінантної ДНК у клітинах *Escherichia coli*.

У дітей із дефіцитом гормону росту соматропін сприяє збільшенню лінійного росту кісток та прискорює швидкість росту.

Як у дітей, так і у дорослих, він підтримує нормальну будову тіла, сприяючи засвоєнню нітрогену, росту м'язів та мобілізації жирових запасів, зокрема у вісцеральній жировій тканині.

Соматропін стимулює ліполіз, знижує надходження тригліцеридів у жирові депо та підвищує рівень інсуліноподібного фактора росту (ІФР-1) та його зв'язуючого білка (ІФРЗБ-3).

Додаткові ефекти:

Ліпідний обмін: сприяє зниженню рівнів ЛПНЩ і аполіпопротеїну В, а також може знижувати загальний рівень холестерину.

Вуглеводний обмін: підвищує рівень інсуліну, не змінюючи рівень глюкози натще. У дітей з гіпопітуїтаризмом може коригувати гіпоглікемію натще.

Водно-сольовий обмін: збільшує об'єми плазми крові та тканинної рідини, сприяючи затримці натрію, калію та фосфору.

Кістковий обмін: стимулює оновлення кісткової тканини, підвищує щільність і мінеральний склад кісток у пацієнтів із дефіцитом гормону росту.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						27
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Фізична працездатність: покращує силу м'язів, витривалість і серцевий викид за рахунок зменшення периферичного судинного опору.

У клінічних дослідженнях застосування соматропіну у дітей із низьким зростом (народжених меншими для гестаційного віку) у дозах 0,033–0,067 мг/кг на добу забезпечувало значне збільшення росту.

Фармакокінетика:

Абсорбція: Біодоступність соматропіну після підшкірного введення становить близько 80%. Максимальна концентрація в крові (C_{max}) досягається через 3–6 годин.

Виведення: Після внутрішньовенного введення період напіввиведення становить 0,4 години, тоді як при підшкірному введенні - 2–3 години через повільну абсорбцію.

Субпопуляції: Біодоступність соматропіну не залежить від статі, але дані щодо пацієнтів літнього віку, дітей, а також осіб із порушеннями функцій печінки, нирок або серця є обмеженими.

Доклінічні дані з безпеки:

Дослідження не виявили клінічно значущої токсичності, генотоксичності чи мутагенності соматропіну. У рідкісних випадках було відзначено підвищену ламкість хромосом, але її клінічне значення залишається незрозумілим.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						28
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

2.2 Характеристика сировини

При виробництві рекомбінантних білків, зокрема і рСТГ, надважливими є питання оптимізації експресії білків, вирішення яких відбувається шляхом створення оптимальної експресійної плазмиди та інших питань технології рекомбінантної ДНК. Але при вирощуванні продуцента також важливими є питання умов проведення процесу та джерел харчових компонентів. Як і для будь-яких продуцентів основними джерелами побудови клітинного матеріалу є джерела карбону, нітрогену, фосфору та сірки та мікроелементи, які повинні міститись у достатній кількості та доступній формі, і які також впливають на вихід готового продукту. Зокрема, наявність певних мікроелементів впливає на утворення полімерних форм рСТГ, які впливають на чистоту кінцевого продукту. Тому у даній роботі ми обрали середовище, яке містить розчин мікроелементів, що забезпечують синтез рСТГ без утворення полімерних форм.

Мікроелементи уводяться у вигляді солей: марганець - моногідрату сульфату марганцю ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); цинк - гептагідрату сульфату цинку ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); кобальт - гексагідрату хлориду кобальту ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); молібден - дигідрат молібдату натрію ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); кальцій - дигідрат хлориду кальцію ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); мідь - пентагідрату сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); бор - борної кислоти (H_3BO_3). Оптимальним вмістом мікроелементів у розчині є:

	Мікроелемент	Діапазон (мкМ)	Обрана доза (мкМ)
1	Марганець	4,4-5,4	4,9
2	Цинк	7,2-8,8	8,0
3	Кобальт	6,3-7,7	7,0
4	Молібден	6,2-7,6	6,9
5	Кальцій	15.2-18.6	16,9
6	Мідь	5,5-6,7	6,1
7	Бор	6,0-7,4	6,7

Склад середовища для інокулятора:

Гідролізат казеїну	20	г/л
Дріжджовий екстракт	10	г/л
K_2HPO_4	2.5	г/л
NaCl	5	г/л
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	г/л
Піногасник (поліпропіленгліколь)	0,4	мл/л
Глюкоза	50	г/л
Розчин мікроелементів	0,83	мл/л

Склад розчину мікроелементів:

$MnSO_4 \cdot H_2O$	1	г/л
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,78	г/л
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2	г/л
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	2	г/л
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3	г/л
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,85	г/л
H_3BO_3	0,5	г/л
32% HCl	100	мл

Склад середовища для виробничого ферментеру:

Гідролізат казеїну	20	г/л
Дріжджовий екстракт	10	г/л
K_2HPO_4	2.5	г/л
NaCl	5	г/л
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	г/л
Піногасник (ППГ)	0,4	мл/л
Глюкоза	13	г/л
Розчин мікроелементів	0,83	мл/л

2.3 Характеристика біологічного об'єкта

2.3.1 Обґрунтування вибору системи експресії

Для реалізації технології виробництва рСТГ запропонована класична система експресії на основі *Escherichia coli*, робота з якою відпрацьована світовими біотехнологічними компаніями.

Основним компонентом системи експресії на основі *E. coli*, що постійно знаходиться в центрі уваги дослідників з метою оптимізації для збільшення експресії рекомбінантного білка, є сам вектор та його ділянки реплікон, промоутер, мітки [6, 10].

Кожен вектор повинен мати можливість самостійно реплікуватися всередині клітини-господаря для утворення копій рекомбінантної ДНК і перенесення їх до дочірніх клітин. Крім того, вектор для клонування має бути відносно малим (розміром менше 10 кб), оскільки більші молекули чутливі до руйнування під час екстракції, і ними важче маніпулювати. У бактеріальних клітинах можна знайти два типи молекул ДНК із такими характеристиками: плазміді та хромосоми бактеріофага [10, 12].

Для експресії рекомбінантних білків у *E. coli* були розроблені різні експресійні плазміді для подолання перешкод на шляху експресії рекомбінантного білка. Найпоширеніші експресійні плазміді мають кілька життєво важливих елементів, таких як початок реплікації, промотор, афінну мітку, кодуєчу послідовність для видалення міток, сайт множинного клонування (СМК), вибіркового маркерного ген (для скринінгу рекомбінантних бактерій) і послідовність термінатора (рис. 2.5) [10].

Сьогодні існує багато експресійних плазмід, і вибір робиться відповідно до мети експерименту. У більшості випадків використовується похідне плазміді рBR322 як плазміді експресії в *E. coli*. Елементи експресійних плазмід мають великий вплив на різні аспекти рекомбінантних білків, які експресуються в *E.coli* [12].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

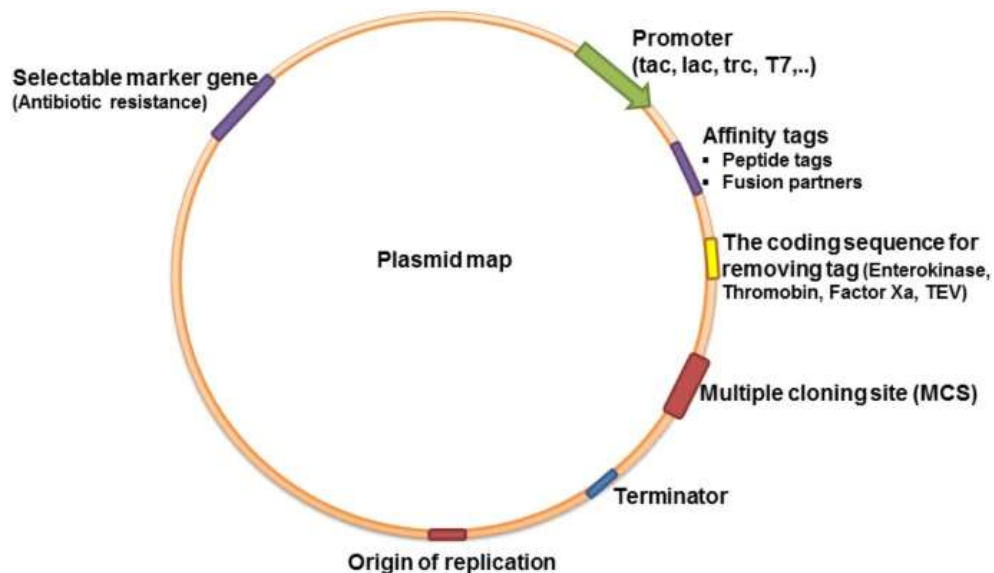


Рис. 2.5 – Будова експресійної плазмиди в бактеріях

(Джерело: Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host, Mahin Pouresmaeil, Shahnam Azizi-Dargahlou, 2023)

Реплікон - це повний сегмент ДНК, який може реплікуватися незалежно за допомогою одного джерела реплікації. Реплікон містить початок реплікації з пов'язаними з ним цис-контрольними. Одним із факторів вибору вектора для експресії білка є кількість копій плазмід, яка контролюється репліконом. Кількість копій плазмід, які зазвичай використовуються для конструювання векторів експресії в *E.coli*, для плазмід: pBR322 (реплікон - pMB1) – 15-60, colE1 (реплікон - colE1) – 15-20, pUC (реплікон - mod pMB1) – 500-700, pACYC (реплікон - p15A) – 18-22, pSC101 (реплікон - pSC101) - до 5 [12].

Слід зазначити, що збільшення числа копій плазмиди не завжди означає підвищення ефективності виробництва рекомбінантного білка. Взаємозв'язок між продукцією рекомбінантного білка та кількістю копій плазмиди є балансом, оскільки було встановлено, що метаболічне навантаження збільшується на 0,063% для кожної додаткової плазмиди, і необхідно підтримувати баланс між ростом хазяїна та виходом рекомбінантного білка. На додаток до числа копій плазмід, їх сумісність одна з одною є ще одним важливим фактором, який слід враховувати. Ця сумісність пов'язана з

механізмом реплікації плазмід. Неможливо підтримувати в одній клітині дві різні плазмиди, які використовують однаковий механізм для своєї реплікації. Коли дві плазмиди в одній групі несумісні, це означає, що вони не можуть реплікуватися разом в одній клітині, але конкурують одна з одною за рекрутування факторів реплікації. Наприклад, плазмиди pMB1 і colE1 належать до однієї групи і є несумісними [14].

Промоторні та енхансерні елементи є регуляторними послідовностями. Енхансери - це короткі нуклеотидні послідовності, які збільшують швидкість транскрипції. Промотори контролюють зв'язування РНК-полімерази з ДНК, тому промотор контролює, коли і де ген експресується в організмі. Для ефективного вектора експресії потрібен сильний промотор із високою спорідненістю до РНК-полімерази для збільшення транскрипції гетерологічного гена. Сильний і регульований промотор може контролювати транскрипцію цільового гена протягом певного періоду. Ці промотори регулюються за допомогою інгібіторів або активаторів. Промотор, який використовується у векторі експресії, повинен мати певні особливості для ідеальної експресії рекомбінантних білків. Вони повинні бути сильними та мати високу спорідненість до полімерази та продукувати рекомбінантні білки на рівні 10-30% або навіть більше від загальної кількості клітинних білків, а також індукція промотора має бути легкою та доступною [10].

Характеристики деяких промоторів, що використовуються в *E. coli*, наступні: Lac (індуктор - IPTG) - місце зв'язування РНК-полімерази, trc і tac (індуктор – IPTG, термінальний) - контроль та підвищення рівня експресії цільових генів, Trp (індуктор - індоліакрилова кислота, триптофанове голодування) - виробництво білків на високому рівні в малих і великих масштабах, T7 (індуктор – IPTG або лактоза) - популярний для експресії рекомбінантного білка, фаговий промотор pL (індуктор - термінальний) - область ініціації синтетичної трансляції і зручні сайти клонування, araP_{BAD} (індуктор – арабіноза) - підходить для експресії токсичного білка, rhaP_{BAD}

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

(індуктор - L-рамноза) - регулюється двома активаторами RhaS і RhaR, proU (індуктор – осмолярність) - кодує високоафінну транспортну систему гліцин-бетаїну, яка є осмотично індукованою, гесА (індуктор - налідиксова кислота) - може стимулювати релаксаційну активність топоізомерази, rhoA (індуктор - фосфатне голодування) - індукцйбельний промотор гена лужної фосфатази (rhoA), отриманого з *E. coli*, cadA (індуктор – рН) - чутливий до кадмію, Nag (індуктор - анаеробні умови, наявність нітратів) - промотор, залежний від розчиненого кисню [10, 12, 14].

Загалом сила промотора та кількість копій плазміди є важливими факторами у виході рекомбінантних білків, і регулювання цих двох факторів може обійти проблему метаболічного навантаження в *E.coli*, яка знижує вихід рекомбінантних білків.

Мітки - це молекули, що складаються з ланцюжка амінокислот, які можуть мати багаторазовий вплив на білки-мішені. Афінні мітки – це унікальні білки/пептиди, які додають до N- або С-кінця або обох кінців рекомбінантних білків, щоб насамперед допомогти очищенню цільових білків. Зазвичай корисніше розміщувати мітки на N-терміналі, ніж на С-терміналі. Коли мітки розміщуються на N-кінці, білок легше очищати, а також це сприяє ефективній ініціації трансляції. При розробці та розміщенні міток на N- або С-кінці цільових білків слід враховувати кілька факторів. Наприклад, додана мітка не повинна порушувати функцію цільового білка, також під час очищення білка ці мітки не повинні бути поза досяжністю. Загалом, мітки виконують численні важливі функції в експресії гетерологічних білків. Ці функції включають допомогу в оптимізації експресії білків, підвищення розчинності та стабільності білків, допомогу в очищенні білків і зниження токсичності рекомбінантних білків на клітини-господарів. Крім того, їх можна використовувати для підтвердження та кількісної оцінки експресії рекомбінантних генів у гетерологічних господарях [12].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		34

Афінні мітки існують у двох формах: пептидні мітки (FLAG, полі-His, полі-Arg, Stre-taq, c-Мус, S-taq), які менше впливають на цільовий білок через свій малий розмір. Іноді вони можуть негативно впливати на третинну структуру білка. Друга група афінних міток - у формі більших білків, які, окрім допомоги в очищенні цільового білка, можуть також підвищити їх розчинність.

Мітки, які відіграють важливу роль у збільшенні розчинності білка, включають білок, що зв'язує мальтозу (MBP), протеїн N-утилізації А, тіоредоксин, глутатіон s-трансфераза (GST), убіквітин, Fh8 і SUMO. Вважається, що мітка Fh8 є найкращим підсилювачем розчинності [12].

Видалення злитих тегів зазвичай необхідно, щоб отримати цілі та активні цільові білки. Для видалення міток можна використовувати ферментативне або хімічне розщеплення. Для ферментативного видалення міток кодууючу послідовність для видалення мітки вставляють у вектор експресії, який кодує сайт розщеплення протеазою. При виборі відповідної протеази для видалення міток слід враховувати такі фактори, як кількість небажаних амінокислотних залишків, що залишаються після розщеплення, легкість видалення протеази після ферментативного розщеплення, а також вартість і характеристики протеази. До таких протеаз відносяться: протеаза вірусу травлення тютюну (TEV), тромбін, ентерокиназа та фактор Ха. Для видалення міток розчинення використовується серія хімічних реагентів. Перевагою цього методу є дешевизна, але умови реакції суворі. Одним із хімічних речовин, які використовуються для видалення міток, є бромистий ціан (CNBr), який використовується для розщеплення на С-кінці залишку метіоніну. Присутність метіоніну в структурі міток не має значення, але він не повинен бути присутнім у структурі цільових білків, окрім їх початку. Оскільки білки збільшуються в розмірі, частота метіонінів зростає впродовж усієї білкової послідовності, тоді застосування цього методу до менших цільових білків, таких як антимікробні пептиди, буде більш доцільним. Для

розщеплення міток можна використовувати метали, зокрема нікель або паладій, які розщеплюють пептидні зв'язки. Для відділення злитих білків від загальних білків господарів використовують і фізико-хімічні методи, зокрема хроматографію.

Злиті мітки іноді спричиняють структурні зміни у функції білка, тому, коли метою виробництва рекомбінантного білка є біофармацевтичне застосування, видалення зливої мітки без залишку амінокислоти в цільовому білку є необхідним для забезпечення безпеки та ефективності білкової терапії.

Для збільшення експресії рекомбінантного білка в гетерологічних господарях залучено багато факторів. Відносна кількість різних тРНК для певної амінокислоти може сильно відрізнятися між видами, що призводить до видовоспецифічних переваг. На експресію гетерологічних білків у *E. coli* впливає зміщення у використанні кодонів. Модифікація кодонів є поширеним явищем серед організмів, і до цього можуть призвести відмінності в структурі кодонів для певної амінокислоти або відмінності в структурі кількості тРНК [12].

Для подолання цієї використовуються дві стратегії. У першому сценарії дослідники замінюють послідовність кодонів цільового гена бажаними кодонами в організмі хазяїна. У другому варіанті використовують генетично модифікований штам *E. coli*, який може добре транслювати всі кодони. Модифікація використання кодону може мати чіткий вплив на рівні експресії білка. Оптимізація кодонів збільшує експресію білка навіть більш ніж у 1000 разів. Оптимізація кодонів збільшує швидкість трансляції шляхом подолання обмежень, пов'язаних із специфічними для видів відмінностями у використанні кодонів і кількості тРНК та небажаним утворенням вторинної структури мРНК [10, 12, 14].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

2.3.2 Характеристика обраної системи експресії

Таким чином штами *E. coli* відіграють фундаментальну роль у експресії гетерологічних білків. Загалом серед штамів *E. coli*, які використовуються для виробництва рекомбінантних білків залежно від властивостей цільового білка є K12 і BL21 (DE3), на основі яких створено багато похідних.

Різні штами *E. coli* відрізняються залежно від специфічних характеристик, отриманих за допомогою генної інженерії їх геномів. Загалом вони були сконструйовані для набуття таких характеристик, як вища стабільність мРНК, здатність утворювати дисульфідні зв'язки в цитоплазмі, відсутність протеаз, придатність для експресії еукаріотичних генів, придатність для експресії токсичних генів, наявність стабільних плазмід, суворий контроль гетерологічної надекспресії, тощо.

Досить типовими є наступні штами з такими характеристика:

а. на основі B834 - BL21, високий рівень експресії білка та легка індукція;

б. на основі BL21:

BL21 - мутація в гені *rne131* для підвищення стабільності мРНК;

BL21-pLys - придатний для експресії токсичних білків і стійкий до хлорамфеніколу;

Rosetta - підвищення експресії еукаріотичних генів, які містять кодони, які рідко використовуються в *E. coli*;

Rosetta-gami - підвищення експресії еукаріотичних білків, а також посилення утворення дисульфідних зв'язків у цільовому білку;

C41 та C43 - природний мутантний штам зі здатністю до надмірної експресії мембранних і токсичних білків;

Rosetta 2-pLys - посилення експресії еукаріотичних білків, які містять кодони, які рідко використовуються в *E. coli*;

Tuner - LacY-дефіцит пермеази лактози;

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

Lemo21 - підходить для білків з проблемами експресії (мембранні білки, токсичні білки, білки з проблемами розчинності);

SoluBL21 - експресія розчинного білка ссавців;

BLR - *recA*-дефіцитна похідна BL21(DE3).

в. на основі K-12:

Origami - мутація в генах *trxB* & *gor* для поліпшення утворення дисульфідних зв'язків у цитозолі;

Origami B - мутації в генах *trxB* і *gor* плюс мутація в гені *lacZY*;

W3110 - дикий лабораторний штам;

HMS174 - *recA* мутант для підвищення стабільності плазмід

г. похідні *E. coli* B (C3029) і *E. coli* K-12 (C3026):

Shuffle - допомога в правильному згортанні білків, що містять дисульфідні зв'язки у своїх структурах у цитоплазмі [10, 12, 14].

У системі експресії *E. coli* однією з проблем є відсутність отримання рекомбінантного білка з високим виходом, що зумовлено метаболічним навантаженням. Метаболічне навантаження призводить до уповільнення росту та зменшення щільності клітин *E. coli*, що призводить до зниження виходу рекомбінантного білка. Цей дисбаланс можна контролювати, регулюючи експресію гетерологічних генів, беручи до уваги кількість копій плазмід та коригування сили промотора. Експресійні плазмідні на основі рЕТ широко використовувалися для досліджень і комерційного виробництва. Ця плазміда має промотор T7, який керує гетерологічною експресією рекомбінантних білків. Промотор T7 був отриманий з профага λ , а ген РНК-полімерази T7 цього вірусу був інтегрований у геном штаму *E. coli* BL21 (DE3). Крім того, ген цієї РНК-полімерази існує в геномі інших штамів *E. coli*. Ця РНК-полімераза транскрибує гени у вісім разів більше, ніж нативні РНК-полімерази *E. coli*, але ця РНК-полімераза іноді знижує рівень рекомбінантних білків через метаболічне навантаження, та може викликати токсичні проблеми та низька щільність клітин-господарів. Для вирішення цих проблем

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		38

розроблено штами *E. coli*, які мають регульовані промотори для гена РНК-полімерази, які можуть жорстко контролювати його експресію. Шляхом редизайну деяких частин вектора pET28a підвищено його ефективність у виробництві рекомбінантних білків, та вилучено гени, пов'язані з блокуванням стресових реакцій у кишкової палички, що призвело до більшої експресії рекомбінантних білків порівняно з немутованими аналогами [6, 12].

У цій роботі для реалізації технології виробництва рСТГ запропонована класична система експресії на основі *Escherichia coli*, робота з якою відпрацьована світовими біотехнологічними компаніями, а саме стандартна *E. coli* BL21 (DE3) із виходом рСТГ на рівні 1,75 г/л.

Escherichia coli BL21(DE3) - це широко використовуваний штам бактерії *E. coli* для продукції білків. Цей штам поєднує кілька характеристик, які забезпечують високу експресію гетерологічних білків. Він походить від лінії В *E. coli*.

Клітини саме цього штаму підходять для експресії нетоксичних гетерологічних генів. Штам містить лямбда-DE3-профаг, який несе ген РНК-полімерази T7 під контролем промотора lacUV5, що дозволяє індукувати експресію РНК-полімерази T7 за допомогою IPTG. BL21 (DE3) є штамом *E. coli* В і не містить Lon-протеази. Характеристика: висока ефективність трансформації: $> 1 \times 10^7$ КОЄ/мкг ДНК pUC19, спеціально розроблений для високого рівня експресії рекомбінантних білків, генетичні маркери, які зводять до мінімуму деградацію РНК та білків [10].

Генотип цього штаму позначається як:

E. coli В F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λ S).

Характеристики штаму, що забезпечують його популярність, як системи експресії для білків:

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

1. Знижена протеолізна активність. Протеоліз білків, що експресуються гетерологічно, зменшений завдяки функціональній недостатності двох основних протеаз - Lon та OmpT.

Lon зазвичай знаходиться в цитоплазмі клітини, проте в усіх штаммах лінії В його синтез блокується через вставку у промоторну область.

OmpT, локалізований у зовнішній мембрані, відсутній у штаммах лінії В через делецію.

2. Індукція експресії. Хоча *E. coli* BL21(DE3) підтримує експресію генів під контролем конститутивних промоторів, він спеціально розроблений для індукції IPTG рекомбінантних генів під контролем T7-промотора. Сила індукції залежить від кількох факторів, включно з концентрацією IPTG та часом його додавання.

Ця функція забезпечується наявністю рекомбінантного λ -профага (DE3).

DE3 містить ген РНК-полімерази T7 (T7-RNAP), який знаходиться під контролем промотора lacUV5 (lacUV5-T7 gene 1).

T7-RNAP є високоспецифічною для T7-промотора і не взаємодіє з природними промоторами *E. coli*. Таким чином, T7-RNAP транскрибує лише гени, що регулюються T7-промотором.

Промотор lacUV5 є похідним від дикого типу lac-промотора *E. coli*, але має підвищену силу транскрипції через дві мутації, які покращують його взаємодію з σ -фактором РНК-полімерази *E. coli*.

Експресія T7-RNAP у *E. coli* BL21(DE3) блокується репресором LacI, який конститутивно синтезується. LacI зв'язується з lac-оператором, розташованим після промотора lacUV5, запобігаючи синтезу T7-RNAP. Додавання IPTG призводить до дисоціації репресора LacI з оператора, дозволяючи експресію T7-RNAP. Після цього T7-RNAP ініціює транскрипцію рекомбінантного гена, регульованого T7-промотором.

Інші модифікації DE3 (ind1, sam7, nin5) забезпечують стабільну інтеграцію профага в геном і запобігають переходу профага в лізогенний цикл.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

3. Полегшення клонування. *E. coli* BL21(DE3) позбавлений функціональної системи рестрикції-модифікації типу I, що позначається hsdS(rB⁻ mB⁻). Зокрема, як рестрикційний (hsdR), так і модифікаційний (hsdM) домени є неактивними. Це підвищує ефективність трансформації, оскільки введена неметильована ДНК залишається незачепленою системою рестрикції-модифікації.

Ген dcm також є неактивним, що запобігає метилуванню цитозину в обох ланцюгах у межах послідовності 5'-CC(A/T)GG-3'. Це полегшує подальшу обробку очищеної ДНК, оскільки метилування Dcm може перешкоджати розщепленню певними рестриктазами [10].

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

2.4 Біосинтез цільового продукту

У роботі цільовий продукт – рСТГ синтезується в клітинах рекомбінатного штаму *E. coli* BL21(DE3). Вище було розглянуто проблеми, які виникають при використанні бактеріальної системи експресії для біосинтезу цільового продукту. Одними з головних серед яких є: синтез цільового продукту у вигляді тілець включення, що призводить до застосування у процесі виробництва додаткових стадій, та уведення до системи експресії досить великого гену рСТГ, що має довжину 573 нуклеотиди. Розглянемо шляхи подолання цієї проблеми при біосинтезі рСТГ в клітинах *E. coli*.

Загалом за розташуванням синтезованих гетерологічних білків у *E. coli* їх можна класифікувати на різні групи. Гетерологічні білки можуть бути локалізовані в трьох різних просторах, включаючи цитоплазму, периплазму та позаклітинний простір (секреція в культуральне середовище) (рис. 2.6) [12].

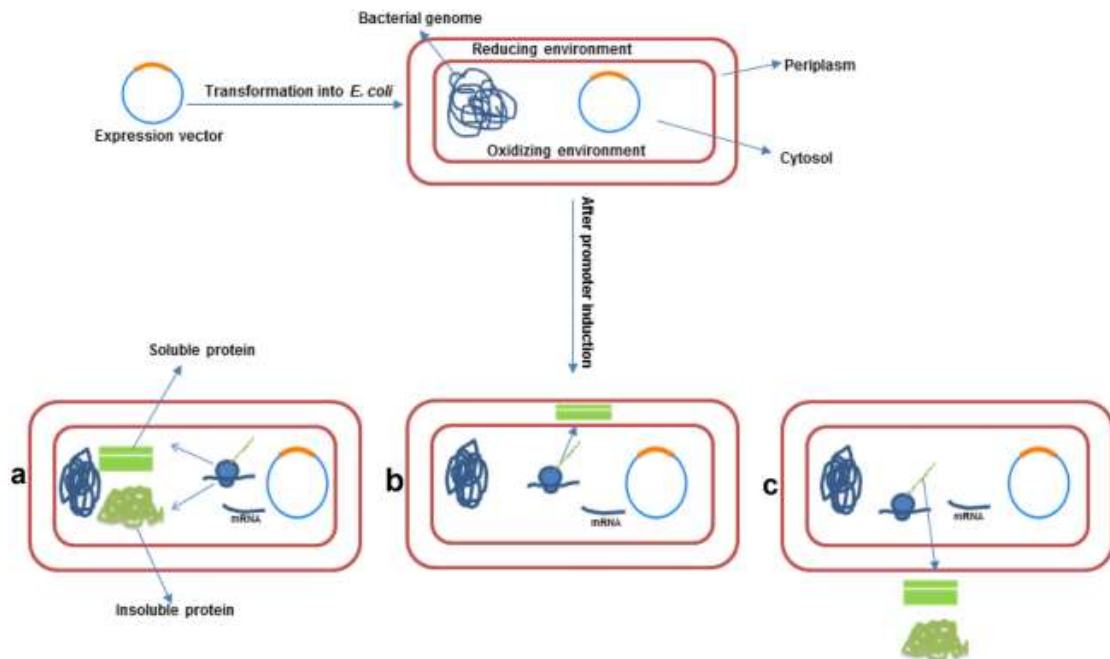


Рис. 2.6 - Транслокація рекомбінантних білків у *E. coli*:

- а. Рекомбінантні білки в цитоплазмі можуть бути розчинними або нерозчинними.
- б. Транслокація рекомбінантних білків у периплазматичний простір через сигнальні пептиди.
- с. Секреція рекомбінантних білків у позаклітинний простір

Накопичення рекомбінантних білків у цитоплазмі є найпоширенішою стратегією виробництва рекомбінантних білків у *E. coli*, яка вимагає найпростішої системи експресії та демонструє найвищий вихід. Але утворення тілець включення є одним із вузьких місць у накопиченні надекспресованих рекомбінантних білків у цитоплазмі. У цьому випадку існує потреба у розчиненні та повторному згортанні агрегованих білків і, як наслідок, зниженні виходу та біоактивності рекомбінантних білків. Цитозоль *E. coli* має відновне середовище і не є придатним середовищем для експресії рекомбінантних білків з дисульфідними містками, зокрема і для рСТГ. Периплазма *E.coli* є придатним простором для білків, які містять у своїх структурах дисульфідні зв'язки, що необхідні для згортання та активності білка. Секреція рекомбінантного білка в периплазму або культуральне середовище має багато переваг перед внутрішньоклітинним виробництвом рекомбінантних білків у формі тілець включення. Це сприяє природному згортанню та стабільності білків, а також допомагає у виробництві активних і розчинних білків [6, 10].

Для транслокації рекомбінантних білків у периплазму з цитозоллю запропоновано використання сигнальних пептидів. Також слід відмітити, що наявність невеликої кількості протеази та білка в периплазмі порівняно з цитоплазмою полегшує очищення рекомбінантних білків. Одним із найважливіших аспектів розподілу рекомбінантних білків у периплазмі є очищення білків без необхідності лізису клітин і через осмотичний шок. Загалом накопичення рекомбінантного білка в периплазматичному просторі має багато переваг перед цитоплазмою. Основною перевагою є простота очищення, але транслокація рекомбінантних білків у периплазматичний простір вимагає більш складної системи експресії, що створює обмеження для виробництва рекомбінантних білків. Крім того, периплазматичне середовище є більш окисним, і, отже, сприяє утворенню дисульфідних зв'язків, також

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

активність протеази в периплазмі нижча, і, як наслідок, підвищується ймовірність стабільності білка [10, 12, 14].

Оскільки ген, що кодує людський гормон росту, складається з 573 нуклеотидів, його розмір унеможлилював синтетичне виробництво для створення рекомбінантного гормону так, як це було зроблено для інсуліну чи соматостатину. Тому було розроблено два практичні підходи до отримання рСТГ (рис. 2.7).

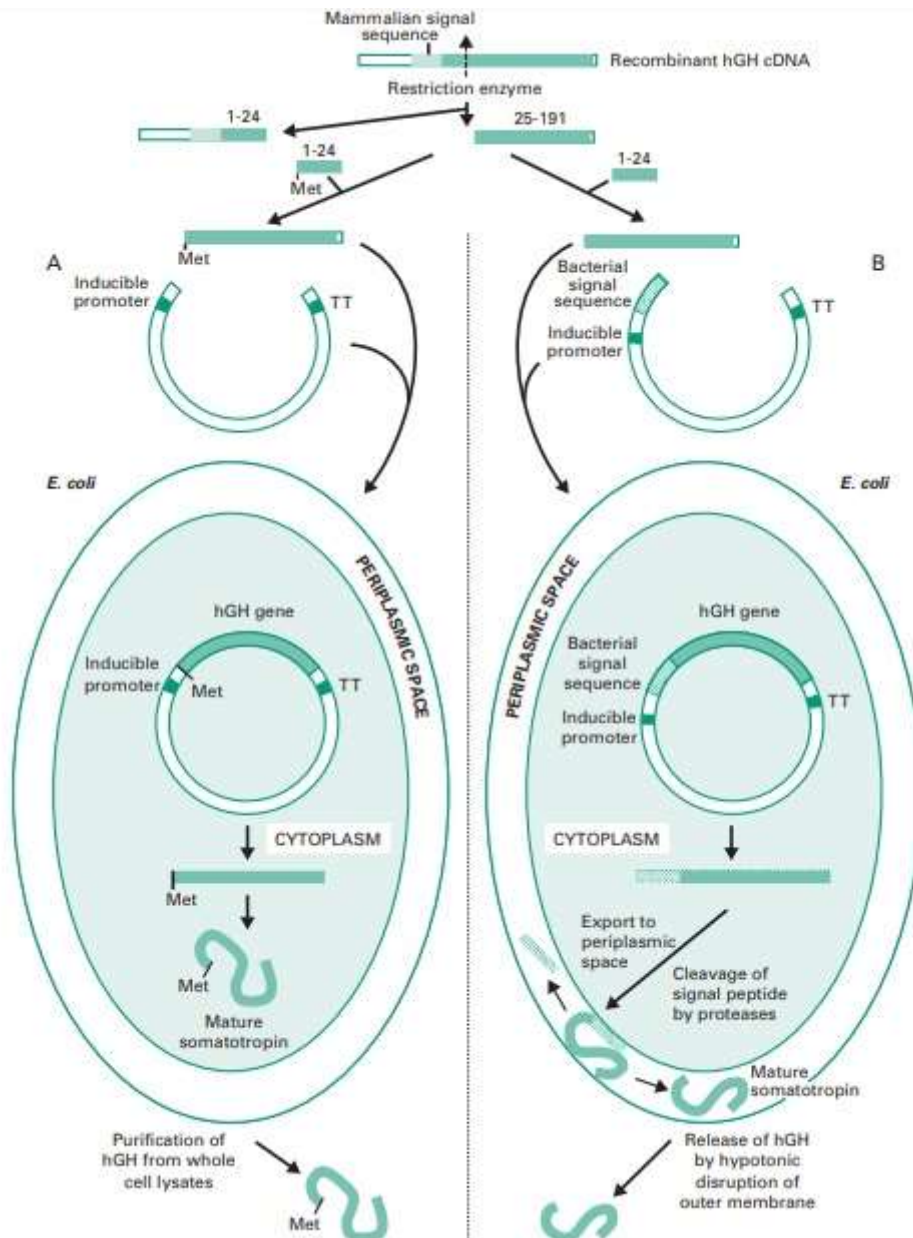


Рис. 2.7 – Стратегії біосинтезу цільового продукту рСТГ у цитоплазму та переплазматичний простір рекомбінантного штаму

Перша стратегія полягає в утворенні гормону з додатковим метіоніном на N-кінці. Спочатку кодуєчу область гена hGH виділяють з кДНК-бібліотеки. Фрагмент ДНК, що кодує ссавцевий сигнальний пептид, можна вирізати за допомогою рестриктази, яка одночасно видаляє перші 24 кодони зрілої білкової молекули. Потім до отриманого фрагмента ДНК, що кодує залишки амінокислот 25–191, приєднують хімічно синтезований фрагмент ДНК, який містить кодон метіоніну (для забезпечення трансляції в клітинах *E. coli*), а також перші 24 кодони зрілого рСТГ. Отриману ДНК-конструкцію клонують у вектор експресії та трансформують в *E. coli*, де рекомбінантний рСТГ накопичується в цитоплазмі. Рекомбінантний гормон виділяють з бактеріальних екстрактів, і, на відміну від природного білка, він містить залишок метіоніну на N-кінці [10, 12].

Інший метод передбачає заміну ссавцевого сигнального пептиду на сигнальний пептид, функціональний у бактеріях. Це дозволяє очищати рСТГ із периплазматичного простору бактеріальних клітин, зменшуючи труднощі, пов'язані з очищенням білків із цитоплазми. Для цього, після видалення ссавцевого сигнального пептиду, синтетична ДНК, що містить 24 відсутні кодони рСТГ (без додаткового метіонінового кодону), приєднується до фрагмента ДНК, що кодує залишки амінокислот 25–191. Отриману ДНК-конструкцію вводять у вектор експресії, який кодує бактеріальний сигнальний пептид, злитий із геном рСТГ. Після трансформації в *E. coli* рекомбінантний рСТГ синтезується, і сигнальна послідовність спрямовує білок до секреції в периплазматичний простір, де він накопичується. Периплазматичні протеази відщеплюють сигнальний пептид, залишаючи рСТГ без додаткових амінокислот. Білок можна легко очистити з периплазматичного простору після гіпотонічного руйнування зовнішньої мембрани [10, 12, 14].

Провівши аналіз різних підходів до оптимізації експресії в клітинах *E. coli*, для реалізації технології на вітчизняному підприємстві у цій роботі ми обрали використання штаму із можливістю синтезу цільового продукту у

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		45

вигляді гормону з додаванням метіоніну на N – кінці як найбільш описану у літературних джерелах технологію, за якими на сьогоднішній день відкриті патенти та виробляються біосиміляри.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок матеріального балансу та вибір обладнання

Згідно із завданням розрахуємо кількість компонентів необхідних для реалізації стадій вирощування продуцента, враховуючи, що з виробничого ферментера отримано 100 л культурального середовища, яке далі поступає із цеха ферментації до цеху виділення та очищення гормону. З кожного літра культурального середовища утворюється 22 г вологого осаду клітин, що містив 660 мг MetAsp-pСТГ, який далі йде на відщеплення та очищення. Згідно з технологією описаною нижче в результаті одного циклу процесу отримують рСТГ з чистотою 98,5 %. Розрахуємо кількість компонентів, необхідних для проведення 1 циклу процесу для ділянки ферментації.

У виробничому ферментері на виході маємо 100 л культуральної рідини (клітини продуцента + живильне середовище), яка далі йде на виділення та очищення гормону. При коефіцієнті заповнення ферментера $K_z = 0,5$ та втратах через краплевиніс $W = 10\%$ [3, 8], об'єм культуральної рідини у ферментері дорівнює:

$$V_{\text{ф к.р.}} = 100/0,5 \times 1,1 = 220 \text{ л} = 0,22 \text{ м}^3.$$

Обираємо стандартний ферментер об'ємом $V_{\text{ф}} = 0,25 \text{ м}^3$.

Стандартна посівна доза, що забезпечує ефективний ріст культури при глибинній періодичній ферментації, дорівнює 10 %. Тоді, об'єм живильного середовища та посівного матеріалу у цьому ферментері дорівнюють:

$$V_{\text{ф ж.с.}} = 220/1,1 = 200 \text{ л}$$

$$V_{\text{ф п.м.}} = 220 - 200 = 20 \text{ л}$$

Ці 20 л посівного матеріалу отримують під час масштабування на попередній стадії у посівному апараті (інокуляторі). Отже, об'єм посівного матеріалу у ферментері дорівнює об'єму утвореної культуральної рідини у

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

посівному апараті, але потрібно врахувати 10 % втрат на краплиніс у колектор:

$$V_{i \text{ к.р.}} = V_{\text{ф п.м.}} \times 1,1 = 20 \times 1,1 = 22 \text{ л.}$$

Об'єм інокулятора при $K_3 = 0,5$ дорівнює:

$$V_i = 22/0,5 = 44 \text{ л.}$$

Обираємо стандартний апарат на 50 л.

Об'єм живильного середовища та посівного матеріалу у такому інокуляторі дорівнюють:

$$V_{i \text{ ж.с.}} = 22/1,1 = 20 \text{ л}$$

$$V_{i \text{ п.м.}} = 22 - 20 = 2 \text{ л}$$

За стандартними підходами у біотехнологічному процесі для засіву інокулятора такою дозою на попередній стадії проводять вирощування у колбах стандартного об'єму 0,75 л.

Загальна кількість культуральної рідини у цих колбах при 1 % втрат:

$$V_{\text{к к.р.}} = 2 \times 1,01 = 2,02 \text{ л.}$$

$$V_{\text{к ж.с.}} = 2,02/1,1 = 1,84 \text{ л}$$

$$V_{\text{к п.м.}} = 2,02 - 1,84 = 0,18 \text{ л}$$

Кількість колб для отримання цієї кількості культуральної рідини дорівнює:

$$N_{\text{к}} = 2,02 / 0,75 = 3.$$

Для вирощування рекомбінантного продуцента у колбах та інокуляторі використовують середовище 1 (21,84 л), у ферментері – середовище 2 (200 л). Кожне середовище готують окремо у відповідних реакторах у цеху приготування робочих розчинів та живильних середовищ.

Розрахунок потреб у живильних середовищах для проведення вирощування продуцента за 1 технологічний цикл (1 серію) наведено у табл. 3.1. Витрати інших компонентів та реагентів на 1 технологічний цикл наведені в описі технологічного процесу.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						48
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 3.1 – Розрахунок компонентів живильного середовища на 1 технологічний цикл

Компонент	Витрати, г	
	на 1 л середовища	на 1 цикл
Середовище 1 (колби, посівний апарат) – 21,84 л		
Гідролізат казеїну	20	436,8
Дріжджовий екстракт	10	218,4
K ₂ HPO ₄	2,5	54,6
NaCl	5	109,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	21,84
Поліпропіленгліколь	0,4	8,736
Глюкоза	50	1092
Розчин мікроелементів	0,83	18,1272
Середовище 2 (виробничий ферментер) – 200 л		
Гідролізат казеїну	20	4000
Дріжджовий екстракт	10	2000
K ₂ HPO ₄	2,5	500
NaCl	5	1000
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	200
ППГ	0,4	80
Глюкоза	13	2600
Розчин мікроелементів	0,83	166
Розчин мікроелементів – 184,13 л		
MnSO ₄ ·H ₂ O	1	184,13
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,78	511,87
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2	368,26
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2	368,26
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3	552,39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,85	340,64
H ₃ BO ₃	0,5	92,07
32% HCl	100	18413

3.2 Обґрунтування технології виробництва та опис технологічного процесу

Дві форми рСТГ - це нативна форма із 191 амінокислотою (Somatropin®) і форма N-кінцевого метіоніну (met) із 192 амінокислот (Somatrem®). Синтетичні гормони росту включають Nutropin® (Genentech), Humatrope® (Lilly), Genotropin® (Pfizer), Norditropin® (Novo), Tev-Tropin® (Teva) і Saizen® (Merk Serano) та відрізняються складом та пристроями доставки. Наступною версією рСТГ є Onmitrope® (Sandoz) та форма пролонгованого вивільнення гормону росту Nutropin® Depot (Genentech і Alkermes).

Як і більшість великих білків, гормон росту схильний до різних хімічних та фізичних реакцій нестабільності. Основними деградаційними реакціями рСТГ є дезамінування, окиснення, деградація амінного кінця і фізична нестабільність, що призводить до утворення мультимерних (наприклад, димерів) і більш агрегованих форм рСТГ. Дезамінування є посттрансляційною модифікацією, що призводить до утворення дезамінованих варіантів рСТГ. Зокрема, при дезамінуванні Asn149/Asp149 або Asn152/Asp152 стають дезамінованими, і під впливом лужного середовища утворюється менш поширений дезамінований варіант глютамінової кислоти в позиції 137 (Glu137). Наприклад, в комерційному препараті Norditropin® зберігаються певні кількості дезамінованого рСТГ Asp152. Дезаміновані форми рСТГ мають змінені сайти протеолітичного розщеплення порівняно з недезамінованим рСТГ. Більш важливо те, що ці зміни можуть впливати на фізіологічну активність гормону *in vivo*.

Незважаючи на прогрес у виробництві рекомбінантного людського гормону росту та його замінників, все ще існує потреба в більш ефективних і економічно вигідних методах виробництва з меншим рівнем утворення потенційно забруднюючих нерекombінантних форм рСТГ та/або деградаційних продуктів. Необхідні технології, що забезпечують високі

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

виходи продукції з мінімальними етапами очищення, зниженням забруднення та зменшенням використання шкідливих для довкілля органічних розчинників. Зменшення або усунення утворення дезамінованих форм та інших нецільових продуктів у процесі виробництва знижує вартість і час виготовлення, що значно підвищує вихід корисної продукції.

У розділі 2 обґрунтовано вибір як системи експресії штаму *E. coli* BL21(DE3) із синтезом рСТГ у цитоплазмі у вигляді тілець включень з додаванням метіоніну на N – кінці з подальшим обробленням для отримання активної субстанції гормону та перспективність додавання розчину мікроелементів у культуральне середовище при вирощуванні продуцента для зниження кількості отримання мультимерних форм (наприклад, димерів) та, відповідно, збільшення чистоти продукту. Для мінімізації утворення мультимерних форм рСТГ у багатьох технологіях використовують на стадії іонообміну ацетонітрил, у розглянутій технології для попередження утворення дезамінованих форм, хроматографічне очищення відбувається без використання шкідливих органічних розчинників при сильно лужному середовищі, а розщеплення залишків гормону та перетворення його в активну форму відбувається шляхом ферментативного розщеплення.

Отже основними етапами пропонованої технології є: підготовка плазмиди зі специфічною послідовністю, яка кодує рСТГ з доданим дипептидом Met-Asp на N-кінці; вбудовування цієї послідовності у вектор для трансформації, який містить дипептид Met-Asp; трансформація клітин *E. coli* підготовленим вектором, що забезпечує синтез Met-Asp-hGH; культивування трансформованих клітин в поживному середовищі при оптимальному рН, температурі та аерації; індукція експресії рСТГ у ферментері; концентрування клітин *E. coli*, які містять послідовність Met-Asp-hGH, для отримання біомаси *E. coli*; виділення тілець включень, які містять Met-Asp-hGH, шляхом лізису клітин, обробки розчинами сечовини та детергентами, очищення і гомогенізації; рефолдинг рСТГ із використанням діалізу в буфері фосфатів

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

при рН 8,0 і температурі 2–10 °С; очищення рСТГ за допомогою катепсину С для видалення дипептиду Met-Asp, хроматографії (іонно-обмінної та реверсно-фазної), знесолювання і ліофілізації для отримання очищеного рекомбінантного рСТГ [10, 12, 14].

Препарати, отримані за описаною методикою, мають покращену стабільність і мінімальний вміст забруднень, містять менше 2% небажаних форм рСТГ (дезамінованих або мультимерів), цей метод дозволяє економічно виробляти рСТГ із високим виходом та зменшеними витратами часу і ресурсів на очищення, утворений рСТГ ідентичний природному гормону і містить 191 амінокислоту.

Попередніми стадіями технології, що було використано для отримання ефективного продуцента, є: конструювання вектора експресії рTrcHis2Kan, отримання трансформованої *E. coli*, отримання основного банку клітин рекомбінантного MetAsp-рСТГ. А вже з банку клітин клітини поступають на виробництво.

Підготовча стадія 1. Конструювання вектора експресії рTrcHis2Kan

На цьому етапі синтезували оптимізовану синтетичну послідовність гена *E. coli* для MetAsp-рСТГ, що має дипептид MetAsp, приєднаний до N-кінця. Ген для MetAsp-рСТГ був представлений у формі кільцевої плазмиди. Послідовність гена повної довжини включала сайти NcoI та EcoRI для лігування у вектор експресії рTrcHis2A/Kan. Експресійний вектор Kan R був отриманий шляхом модифікації комерційно доступного вектора рTrcHis2A, який був модифікований для видалення гена стійкості до амфіциліну та заміни в ньому гена стійкості до антибіотиків канаміцину. В результаті отримано вектор рTrcHis2/KAN. Послідовність MetAsp рСТГ лігували у вектор-реципієнт для отримання вектора експресії рTrcHis2A/Kan-MetAsp рСТГ.

Підготовча стадія 2. Отримання трансформованої *E. coli*

Отриманий експресійний вектор використовували для трансформації в клітини *E.coli* BL21BL21. Клони були відібрані шляхом позитивної

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

верифікації аналізом послідовності ДНК. Позитивні клони зберігають у гліцерину при -80°C .

Підготовча стадія 3. Приготування основного банку клітин рекомбінантного MetAsp-pCTT

Стартові інокуляти трансформованої *E. coli* вирощували в 0,25 л колбі для струшування, що містить ТВ/Kan Medium (рослинне джерело) при 37°C , швидкості перемішування 200 об/хв та аерації. Культуру клітин об'ємом 0,25 л збирали шляхом стерильної фільтрації та ресуспендували у 100 мл свіжого середовища, що містить кріопротектор (15% гліцерину). Визначали життєздатність клітин і потім розподіляли на аліквоти по 1 мл у мічені кріогенні ампули. Основний банк клітин зберігався при -80°C та використовувався на основних виробничих стадіях.

Стадія 4. Ферментація рекомбінантної *E. coli*

Вирощування продуцента здійснювали шляхом масштабування – спочатку у колбах на 0,75 л та в посівному апараті на 50 л із середовищем I при 37°C , швидкості перемішування 200 об/хв та аерації OD_{600} 10,0 протягом 6 год на кожному етапі. Культуральну рідину із клітинами продуцента передавали до виробничого ферментера на 250 л із середовищем II, культивували при тих же умовах, але на 6 год додавали індуктор для індукції транскрипції MetAsp-pCTT. Як індуктор використовували IPTG або ізопропіл β -D-1-тіогалактопіранозид, який є молекулярним аналогом алолактози, який видаляє репресор з *lac*-оперону для індукції експресії гена. Культивування у присутності індуктора тривало ще 3 год.

Стадія 5. Відділення біомаси *E. coli* від культуральної рідини

Клітини *E. coli* відділяли центрифугуванням на проточній центрифугі, отримували осад в кількості 2,2 кг вологої біомаси. Визначали кількість осаду та кількість MetAsp-pCTT. З кожного літра культуральної рідини утворюється 22 г вологого осаду клітин, що містить 660 мг MetAsp-pCTT. Зібраний вологий

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

осад можна заморозити та зберігати при -80°C , а можна відразу направити на стадії виділення та очищення гормону.

Стадія 6. Руйнування клітин *E. coli*

Руйнування клітин здійснювали хімічним та механічним методами. Клітинний осад (2,2 кг) повторно суспендували в охолоджену буфері для лізису клітин (50 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЕДТА, 0,2 М NaCl). Об'єм буфера для лізису клітин на 1 г клітинного осаду становив 5 мл (загалом 11 л). Клітинний осад перемішували в буфері для лізису міксером протягом 30 хв, для гомогенізації матеріалу до однорідної суспензії використовували гомогенізатор протягом 5 хв. Наприкінці процесу гомогенізації клітини двічі руйнували під тиском 1000-1200 бар за допомогою гідравлічного процесу.

Стадія 7. Збір осаду тілець включення

Зруйновані клітини центрифугували при 12 000 об/хв протягом 20 хв при $2-10^{\circ}\text{C}$. Осад, що містить тілця включення, збирали, повторно суспендували та гомогенізували протягом 4 хв в 11 л розчину (2 М сечовини / 1 М NaCl у 50мМ Трис-НСl при рН 8). Промивний розчин сечовини/солі центрифугували при 12000 об/хв протягом 20 хв при $2-10^{\circ}\text{C}$. Супернатант видаляли, а осад повторно суспендували (гомогенізували) в 11 л 50 мМ Tris рН 8 з 0,25% Triton X100 (буфер для промивання). Осад центрифугували при 12000 об/хв протягом 20 хв при $2-10^{\circ}\text{C}$. Супернатант видаляли, а осад клітин повторно суспендували (гомогенізували) в 11 л очищеної води для видалення більшої частини детергенту. Водну промивку центрифугували при 12000 об/хв протягом 30 хв. Супернатант видаляли, а осад тілець включення повторно суспендували в 50 мМ Трис-НСl рН 8 і гомогенізували до отримання гомогенної суспензії. Загальна волога маса тілець включення становила 656,4 г. Кінцевий об'єм суспензії становив 1,2 л у 50 мМ Трис-НСl рН 8,0. Суспензію розділяли на три рівні порції (0,4 л) і зберігали при -80°C .

Стадія 8. Солюбілізація тілець включень

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54

Тільця включення розморожували при 4°C при кімнатній температурі 8 год і розчиняли в 39 л деіонізованої 8 М сечовини в 50 мМ трис-НСІ рН 8,0, 5 мМ DTT і 10 мМ цистеїну на рівні приблизно 200-400 мкг/мл білка і перемішували при кімнатній температурі протягом 30 хв. Солюбілізовані гранули розсипали в серію з 12 000-14 000 мішків для діалізу (регенерована целюлоза MWCO).

Стадія 9. Рефолдинг MetAsp-pСТГ

Рефолдинг білка - це процес, під час якого денатурований (розгорнутий) білок відновлює свою природну тривимірну структуру (нативну конформацію). Цей процес є важливим для того, щоб білок міг знову виконувати свої біологічні функції, оскільки функціональність білка залежить від його правильної структури.

Солюбілізовані гранули MetAsp-pСТГ повторно згортали за допомогою трьох діалізних обмінів 1:4,625 протягом 12 год у 20 мМ фосфатного буфера при рН 8,0, що призвело до кінцевої концентрації сечовини приблизно 80 мМ при 2-10°C. Кінцевий об'єм повторно згорнутого MetAsp-pСТГ становив 47,5 л.

Стадія 10. Концентрування згорнутого MetAsp-pСТГ

Згорнутий MetAsp-pСТГ концентрували до кінцевого об'єму 3,5 л (15,5 мг/мл) за допомогою UF-картриджа Millipore PrepScale 10kD. Повторно згорнутий MetAsp-pСТГ було доведено до рН 6,8 титруванням фосфорною кислотою з утворенням осад. Осад видаляли центрифугуванням при 12 000 об/хв протягом 30 хв при 2-10 °C. Концентрація MetAsp-pСТГ дорівнювала 52 г.

Стадія 11. Ферментативне розщеплення MetAsp-pСТГ до рСТГ

Ферментативне розщеплення MetAsp-pСТГ до рСТГ (за структурою ідентичного природному) проводили з використанням діамінопептидази Катепсину С для видалення N-кінцевого MetAsp. Ферментативна реакційна суміш складається з 20 мМ фосфатного буфера, 2 мМ NaCl, 1 мкг/мл

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		55

лейпептину, 5 мМ 2-меркаптоетанолу та 140 одиниць катепсину С на 1 г MetAsp-pСТГ. Ферментативну суміш повільно перемішували при 37°C і контролювали за допомогою аналітичної ВЕРХ з обертовою поверхнею на предмет зменшення піку MetAsp-pСТГ і посилення природного піку рСТГ. Реакція завершується приблизно за 16-18 год. Розщеплений рСТГ доводили до рН 8,3 0,5 М NaOH і фільтрували перед проведенням хроматографії.

Стадія 12. Хроматографічне очищення рСТГ

Підлужений розчин рСТГ хроматографували (аніонообмінна хроматографія) на смолі Q-Sepharose HP (8,8 л) у 50 мМ трис-HCl рН 8,3 та елюювали з колонки градієнтом об'єму 12 колонок 0-0,3 М NaCl. Фракції колонки контролювали за допомогою ОФ-ВЕРХ. Фракції, які містили нативний рСТГ як мінімум 98% чистоти, об'єднували. Іонообмінний пул доводили до 5% за допомогою N-пропанолу та доводили рН до рН 7,0 і додатково очищали на колонці з оберненою фазою C4, урівноваженою 50% сумішшю буфера А (50 мМ трис, 5% N-пропанол, рН 7,0) та В (50 мМ трис 47,5% N-пропанол, рН 7,0). Виконували градієнт об'єму 12 колонок від 50% - 90В%. Фракції, що містять нативний рСТГ, об'єднували аналітичними методами ОФ-ВЕРХ. Пул ОФ-ВЕРХ доводили до 30% ацетонітрилом, потім рН регулювали від 6,8 до 8,0.

Стадія 13. Знесолення рСТГ та заміна буфера

Відкоригований пул ОФ-ВЕРХ знесолювали ультрафільтрацією у воді доводячи до рН 8,0 за допомогою гідроксиду амонію.

Стадія 13. Ліофілізація рСТГ

Знесолений пул рСТГ ліофілізували. Отримана субстанція відповідає чистоті 98,5 %.

Вихід рСТГ на кожній стадії виділення та очищення рСТГ наведений у табл. 3.2.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		56

Таблиця 3.2 - Вихід та чистота рСТГ у процесі виробництва

Стадія процесу	СТГ (г)	ступінь втрати врожаю (%)	загальний врожай (%)	чистота (%)
Рефолдинг MetAsp-рСТГ	55		100	70
Ферментативне розщеплення MetAsp-рСТГ до рСТГ	52	9	91	70
Аніонообмінна хроматографія	29	44	53	95
ОВ-ВЕРХ хроматографія	25	14	45	98,5
Заміна буфера	24	5	44	98,5
Ліофілізація	22	8	40	98,5

3.3 Схеми виробництва

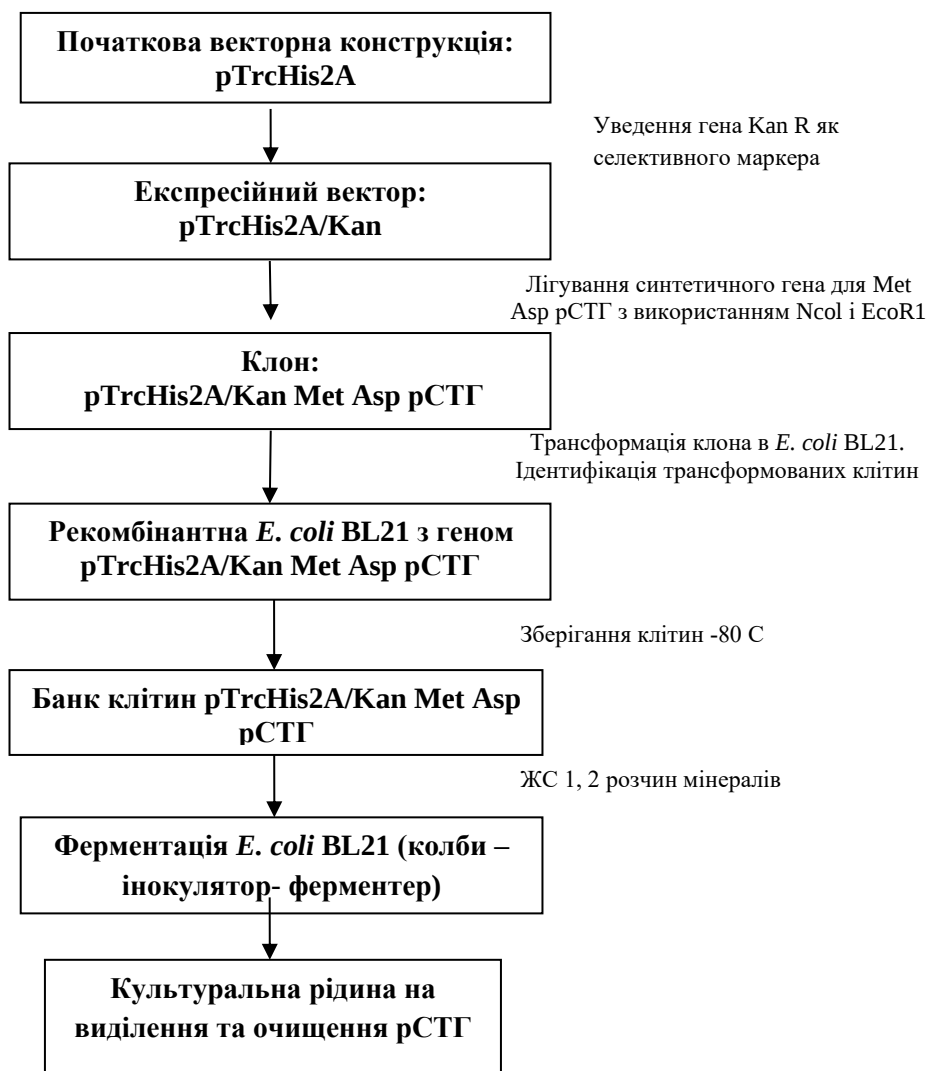
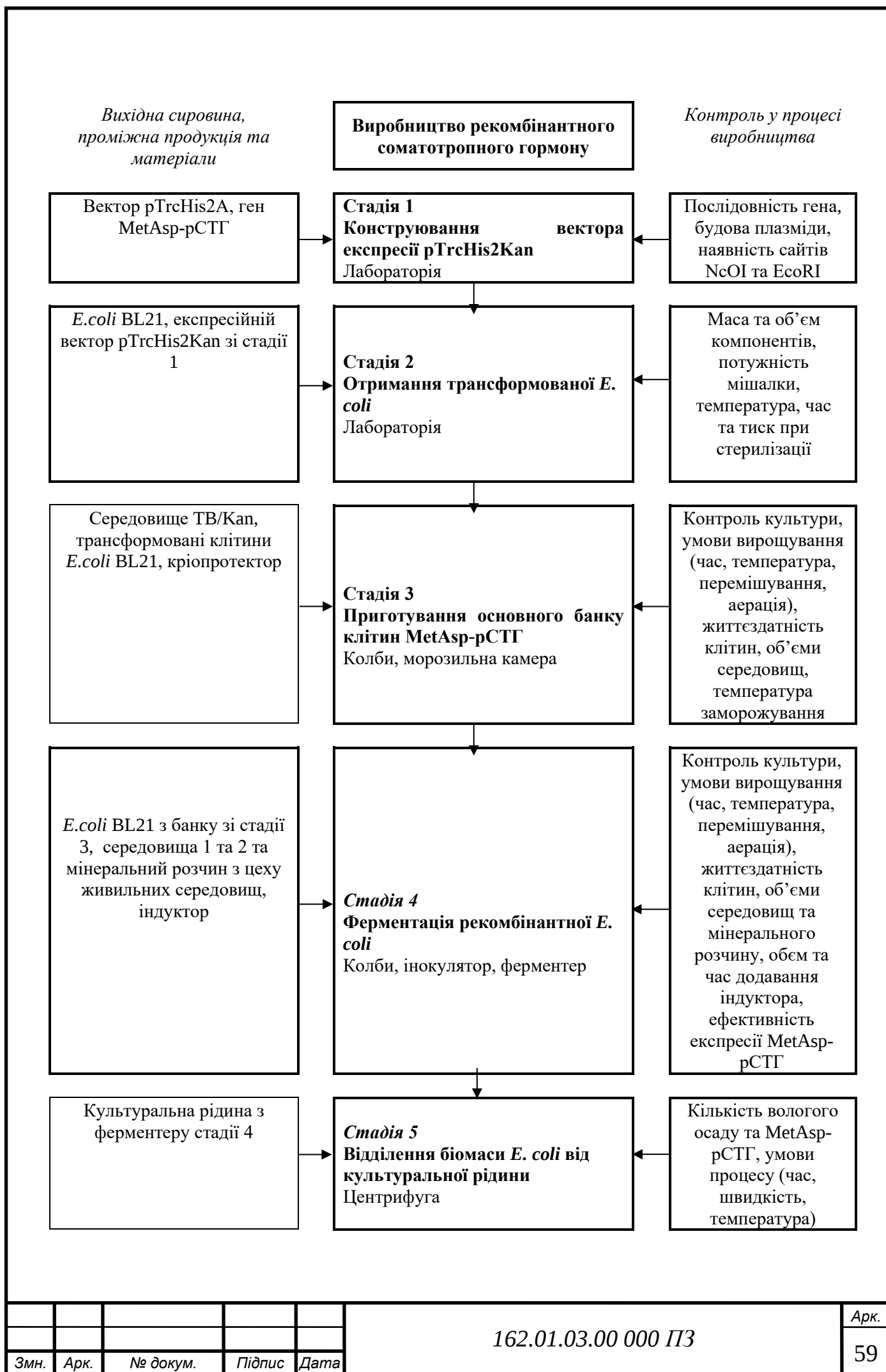
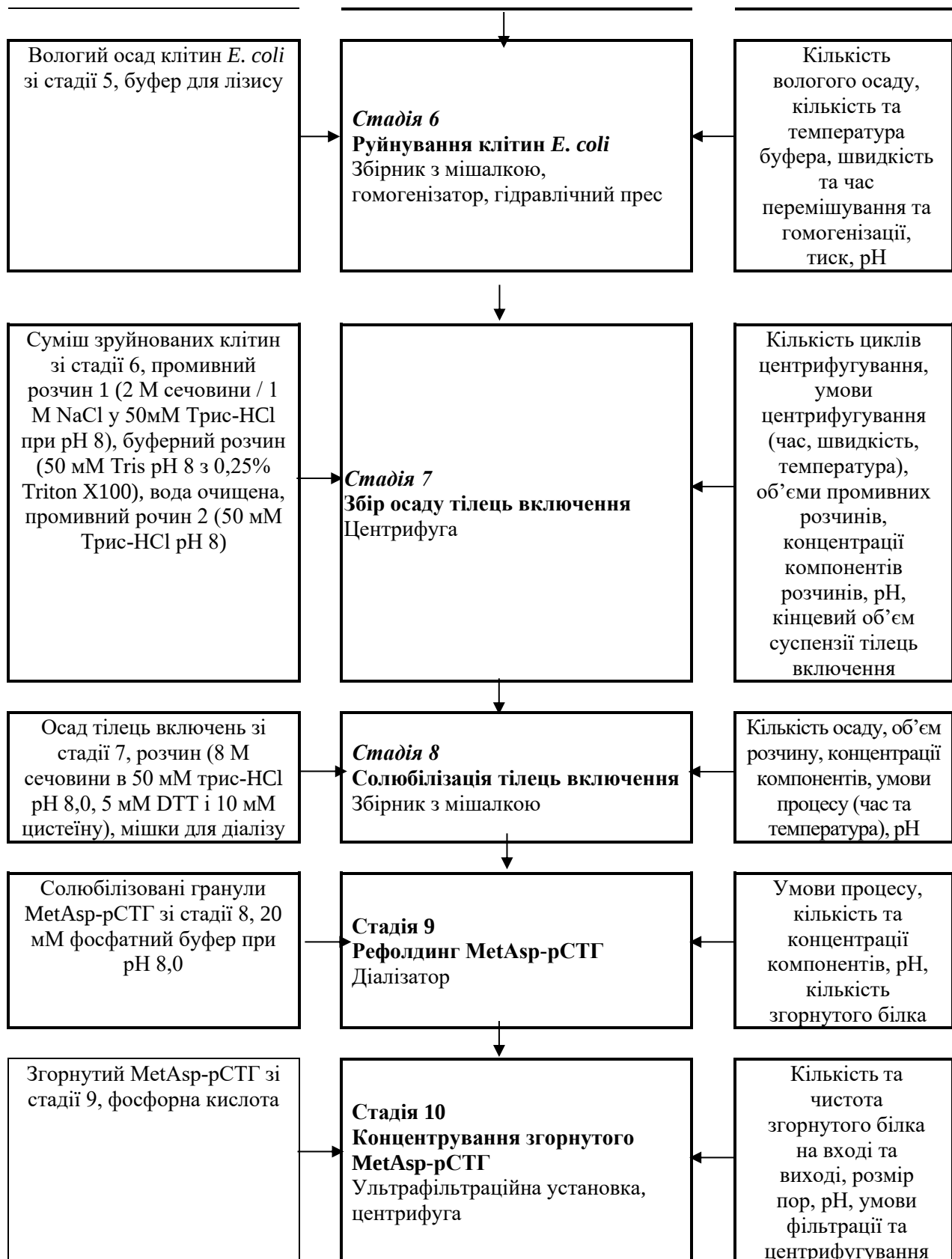


Рис. 3.1 – Біологічна схема pCTG





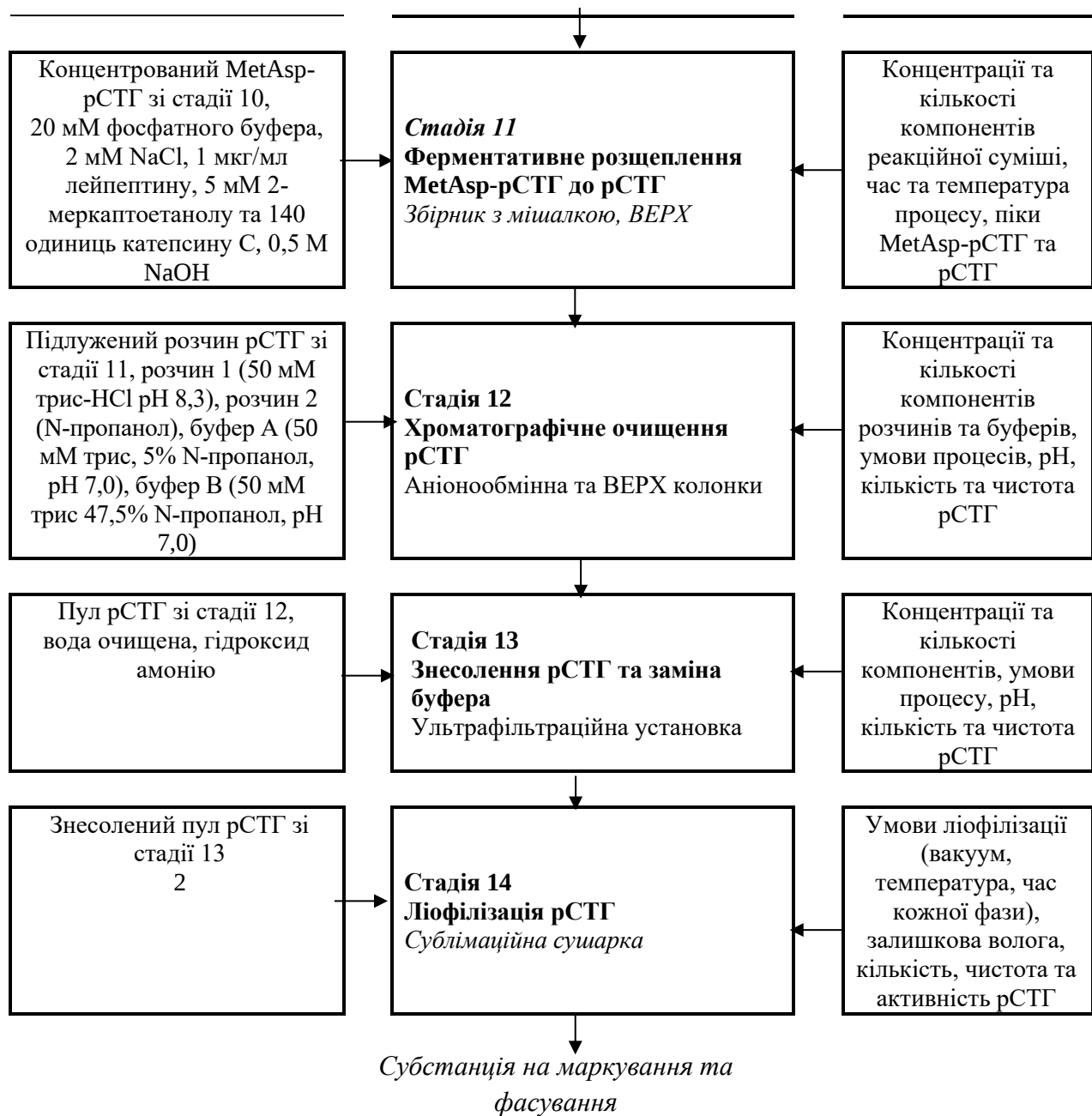


Рис. 3.2 – Технологічна схема виробництва рСТГ

3.4 Екологічні аспекти виробництва

Україна регулює діяльність підприємств із використанням рекомбінантних технологій через низку законів та підзаконних актів, які враховують екологічні, соціальні та етичні аспекти. Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» передбачає державний контроль за діяльністю, пов'язаною з використанням технологій рекомбінантних ДНК, зобов'язує здійснювати оцінку ризиків для здоров'я людей і довкілля перед початком будь-якої діяльності. Україна адаптує своє законодавство до вимог міжнародних організацій, таких як ООН, ВООЗ, а також норм ЄС, які регулюють генетично модифіковані організми і технології рекомбінантних ДНК [2, 5].

Генетично модифіковані організми, які використовуються для виробництва рекомбінантних білків, мають бути офіційно зареєстровані. Необхідно подати дані про безпечність, ефективність та результати досліджень. Також для таких підприємств обов'язковою є екологічна експертиза, яка містить проведення оцінки впливу на довкілля для кожного етапу діяльності, та ліцензування - підприємства, які працюють із технологіями рекомбінантних ДНК, повинні отримати ліцензію на здійснення відповідних видів діяльності [2, 13].

До екологічних проблем, які виникають при виробництві рекомбінантних білків, відносяться наступні ризика: біологічне забруднення; викиди токсичних речовин; високий рівень енергоспоживання; проблеми з утилізацією відходів.

При використанні генетично модифікованих організмів є ризик випадкового їхнього потрапляння в навколишнє середовище, що може призвести до екологічного дисбалансу. Рекомбінантні мікроорганізми можуть

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						63
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

взаємодіяти з природними екосистемами, змінюючи структуру популяцій або впливаючи на харчові ланцюги.

Виробничі процеси включають використання хімічних речовин, зокрема розчинників, реагентів, які забруднюють воду, ґрунт або атмосферу, та метаболічних продуктів або залишків клітин, які можуть впливати для довкілля.

Технології виробництва рекомбінантних білків часто вимагають значних ресурсів, включаючи електроенергію для підтримання стерильних умов, охолодження та інших виробничих процесів.

Виробничі процеси генерують біологічні та хімічні відходи, які потребують спеціальної утилізації, а неналежна утилізація може спричинити серйозне забруднення. Потрапляння модифікованих білків у середовище може викликати непередбачувані ефекти на місцеву флору і фауну, зокрема зміну генетичного складу популяцій.

До відходів, що утворюються на фармацевтичному підприємстві з виробництва рекомбінантних білків, відносяться біологічні, хімічні, тверді відходи, залишки пакування тощо.

До біологічних відходів відносяться: залишки клітинних ліній (бактерії, дріжджі, ссавцеві клітини), які використовуються для виробництва білків, залишки живильних середовищ, відходи, що містять рекомбінантну ДНК, наприклад, клітинні залишки, плазміди або середовища, матеріали, які контактували з біологічними речовинами, включаючи пробірки, шпателі, лабораторний посуд.

До хімічних відходів відносяться: реагенти для екстракції, очищення та аналізу білків (буферні розчини, детергенти, органічні розчинники), робочі розчини для коригування рН, піногасники тощо.

Твердим відходами є одноразові витратні матеріали (фільтри, мембрани, шприци, пробірки, рукавички, маски), упаковки від реагентів і матеріалів (контейнери, плівка, коробки).

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						64
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Також слід враховувати, що відпрацьована вода після очищення білків або миття обладнання та використані системи вентиляції можуть містити залишки від виробництва.

Основними правилами поводження з відходами є їхня класифікація, облік, збір, зберігання та утилізація. Усі відходи повинні бути класифіковані відповідно до їх типу (біологічні, хімічні, тверді, небезпечні), для кожної категорії відходів ведеться журнал обліку [2, 13].

Перед утилізацією біологічні відходи піддаються стерилізації (автоклавування, термічна обробка) для знищення живих мікроорганізмів. Заборонено викидати необроблені ГМО в навколишнє середовище. Відходи збираються в марковані контейнери відповідно до їх типу. Наприклад, червоні контейнери для біологічних відходів, жовті – для хімічних. Контейнери зберігаються в спеціально відведених місцях із доступом лише для уповноважених осіб. Хімічні речовини нейтралізуються або передаються спеціалізованим компаніям для утилізації. Відходи з небезпечними речовинами знищуються згідно з національними нормами екологічної безпеки. Відпрацьована вода очищається перед скиданням у каналізацію (механічна, хімічна або біологічна фільтрація). Небезпечні речовини (наприклад, розчинники) можуть бути відновлені для повторного використання через процес дистиляції. Нейтральні відходи, такі як упаковка, підлягають вторинній переробці. Ведеться облік усіх операцій із відходами: їх утворення, обробки, транспортування, утилізації. Підприємство регулярно проходить перевірки на відповідність екологічним нормам і правилам поводження з відходами.

Дотримання національного законодавства, зокрема закону України «Про відходи», який регулює поводження з відходами, включаючи небезпечні та закону «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів», який

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

стосується біологічних і ГМО-відходів, є критично важливим для захисту довкілля, здоров'я працівників і населення.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

ВИСНОВОК

Готовий продукт – рекомбінантний соматотропний гормон (рСТГ) – характеризується високим ступенем чистоти (98,5%), структурною ідентичністю до природного гормону росту людини та мінімальним вмістом небажаних домішок. Первинна структура рСТГ, що включає 191 амінокислоту, ідентична природному гормону, що забезпечує його фізіологічну активність *in vivo*.

Обґрунтоване використання бактеріальної системи експресії *E. coli* BL21(DE3) як продуцента, що забезпечує високу продуктивність процесу та можливість масштабування виробництва.

Використання специфічного середовища з мікроелементами (Mn, Zn, Co, Mo, Ca, Cu, B) дозволяє запобігти утворенню мультимерних форм білка, що значно підвищує вихід та чистоту кінцевого продукту. Запропоновані середовища для інокулятора та ферментера забезпечують оптимальні умови для експресії рСТГ, сприяючи зниженню затрат на процес вирощування та підвищенню ефективності виробництва.

Для реалізації технології виробництва рСТГ обрано класичну систему експресії на основі штаму *E. coli* BL21(DE3), що широко використовується у світовій біотехнології завдяки високій ефективності трансформації, зниженій протеолізній активності та можливості синтезу гетерологічних білків на високому рівні.

Штам *E. coli* BL21(DE3) забезпечує регульовану експресію генів за допомогою промотора T7 та індукції IPTG, що дозволяє контролювати рівень синтезу рекомбінантного білка та мінімізувати метаболічне навантаження на клітини-господарі.

У роботі обґрунтовано використання стратегії синтезу рСТГ у вигляді гормону з додатковим метіоніном на N-кінці. Ця стратегія є оптимальною для виробництва білка у цитоплазмі клітин *E. coli* у вигляді тілець включень із

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

подальшим очищенням та ферментативним відщепленням зайвих амінокислот. Аналіз літературних даних та виробничих патентів свідчить, що запропонований підхід забезпечує високу продуктивність процесу, полегшує його масштабування та дозволяє отримувати рСТГ із чистотою понад 98,5%. Використання сигнальних пептидів для транслокації рСТГ у периплазматичний простір, хоча й перспективне, ускладнює процес експресії та потребує розробки додаткових етапів очищення, тому для цієї роботи обрано накопичення білка у цитоплазмі.

Розглянута стратегія побудови експресійної системи враховує необхідність балансування сили промотора та кількості копій плазміди, що мінімізує метаболічне навантаження на клітини-господарі та забезпечує стабільний вихід білка.

Шляхом оптимізації кодонів у гені рСТГ забезпечено підвищення рівня експресії білка до 1,75 г/л у культуральній рідині, що є конкурентним показником для промислового виробництва.

Використання описаних методів і підходів дозволяє значно знизити витрати на процеси очищення та забезпечує можливість виробництва біосимілярів на вітчизняних підприємствах. Розроблена технологія виробництва рСТГ забезпечує отримання високочистого продукту з мінімальним рівнем забруднень.

Використання штаму *E. coli* BL21(DE3) дозволяє ефективно синтезувати MetAsp-рСТГ у вигляді тілець включень, що спрощує його подальше очищення. Застосування ферментативного розщеплення MetAsp-рСТГ до активної форми рСТГ дозволяє уникнути використання шкідливих органічних розчинників.

Технологія відповідає сучасним вимогам екологічної безпеки та економічної ефективності, що робить її перспективною для впровадження у фармацевтичну промисловість.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біотехнологія : підручник / В. Г. Герасименко та ін. Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
2. Біотехнологія з основами екології : навч. посіб. / І. М. Трохимчук та ін. Київ : КОНДОР, 2019. 304 с.
3. Данілов І. П., Самойленко С. І. Апарати мікробіологічної промисловості. Харків : НТУ «ХП», 2008. 272 с.
4. Державний реєстр лікарських засобів України : офіційний сайт. URL: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%F0%E8%F2%F3%EA%F1%E8%EC%E0%E1> (дата звернення: 20.11.2024).
5. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Допов. 6. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2023. 422 с.
6. Дудна Д., Стернберг С. Зламати ДНК. Редагування генома та контроль над еволюцією / пер. Г. Литвиненко. Київ : Наш формат, 2019. 296 с.
7. ДСТУ ГОСТ 2.612:2014. Єдина система конструкторської документації. Електронний формуляр. Загальні вимоги. (ГОСТ 2.612–2011, IDT). Офіц. вид. Вперше ; чинний від 2014–11–01. Київ : Мінекономрозвитку України, 2014. 47 с.
8. Капрельянц Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навч. посіб. Харків : Факт, 2020. 296 с.
9. Красінько В. О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв : конспект лекцій. Київ : НУХТ, 2019. 252 с.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

10. Краснопольський Ю. М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. для студентів біотехнологічних спец. Харків : Друкарня Мадрид, 2022. 151 с.

11. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи бакалавра для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ОП «Біотехнологія» / О. С. Калюжная та ін. Харків : НФаУ, 2024. 128 с.

12. Півень О. О., Скоробогатова З. М. Сучасні інструменти редагування геному з основами молекулярної генетики : навч. посіб. Київ : Біокомполіт, 2021. 178 с.

13. Пляцук Л. Д., Черниш Є. Ю. Екологічна біотехнологія : принципи створення біотехнологічних виробництв : навч. посіб. Суми : Сумський державний університет, 2018. 293 с.

14. Пономарьов П. Х., Притульська Н. В., Донцова І. В. Генетично модифіковані організми: трансгенні культури, ферментні препарати, харчові продукти : монографія. Київ : Київ. нац. торг.-екон. ун-т, 2014. 208 с.

15. Про лікарські засоби : закон України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2469-20#Text> (дата звернення: 01.12.2024).

16. Про охорону навколишнього природного середовища : Закон України від 25 черв.1991 р. № 1264–XII. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/1264-12> (дата звернення: 25.11.2024).

17. Северин Я. О. Біосинтез гормонів рекомбінантними мікроорганізмами : кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістр. Київ, 2021. 168 с.

18. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. І. Ферментація. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 240 с.

19. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

Ч. II. Обробка культуральних рідин. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 296 с.

20. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі.

Ч. III. Основи проектування мікробіологічних виробництв. Львів : Вид-во Львів. політехніка, 2004. 252 с.

21. Спринчук Н. А. Синдром біологічно неактивного гормону росту: клініка, особливості патогенезу, діагностика та лікування (довготривале спостереження) : дис. на здобуття наукового ступеня д-ра мед. наук. Київ, 2019. 398 с.

22. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ-2000, 2018. 410 с.

23. Технологія ліків промислового виробництва : підруч. для студентів вищ. навч. закл. : в 2-х ч. / В. І. Чуєшов та ін. 2-ге вид., перероб. і допов. Харків : НФаУ : Оригінал, 2013. Ч. 2. 638 с.

24. Шапран Ю. П. Біотехнологія, генна інженерія : навч.-метод. посіб. Переяслав-Хмельницький : Домбровська Я., 2019. 132 с.

25. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навчальний посібник. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с. URL: https://www.mnau.edu.ua/files/faculty/tvpptsb/kaf_ggtb/hyl/navch-pos-biotehn.pdf (дата звернення: 10.12.2024).

26. Юлевич О. І. Промислова біотехнологія : курс лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти. Миколаїв : МНАУ, 2024. 159 с.

27. Biologicals: finished product / European Medicines Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/biologicals/biologicals-finished-product> (Date of access: 01.12.2024).

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

28. Biotherapeutics: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. URL: <https://www.edqm.eu/en/biotherapeutics> (Date of access: 15.12.2024).

29. Adverse Events Associated with Childhood Vaccines: Evidence Bearing on Causality. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK236299/> (Date of access: 15.12.2024).

30. The FDA Just Approved The Most Expensive Drug in The World. URL: <https://www.sciencealert.com/the-fda-just-approved-the-most-expensive-drug-in-the-world> (Date of access: 15.12.2024).

31. U.S. Food and Drug Administration, FDA, USFDA : official site. URL: <https://www.fda.gov/> (Date of access: 15.12.2024).

32. World Health Organization. URL: <https://www.who.int/> (Date of access: 15.12.2024).

33. Shakweer W. M. EL-S. M. Use of recombinant bovine somatotropin (rbst) to enhance productive and reproductive performance of sheep under different dietary energy levels. Thesis Master of Science In Agricultural Sciences. Egypt, 2008. 108 p.

					162.01.03.00 000 ПЗ	Арк.
						72
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДОДАТКИ



National University of Pharmacy
Національний фармацевтичний університет

Industrial Technology of Medicines and Cosmetics
Кафедра промислової технології ліків та
косметичних засобів

CERTIFICATE № 146

СЕРТИФІКАТ

This is to certify that
Цим засвідчується, що

Голубнича Ілона

has participated in the XI International Scientific-Practical Conference
брав(ла) участь у XI Міжнародній науково-практичній конференції

"MODERN ACHIEVEMENTS OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY"
«СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ»

November 27, 2024, Kharkiv, Ukraine
27 листопада 2024 року, Харків, Україна

Vice-Rector for scientific and pedagogical
work NUPh, professor

Проректор з науково-педагогічної
роботи НФаУ, проф.



Inna VLADYMYROVA

Інна ВЛАДИМИРОВА

ШЛЯХИ РОЗВИТКУ ТЕХНОЛОГІЙ ВИРОБНИЦТВА РЕКОМБІНАНТНОГО ГОРМОНУ РОСТУ

Голубнича І.В., Калюжная О.С.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Вступ. Гормон росту, ГР (соматотропін) – це основний гормон, який стимулює лінійний ріст кісток. Але ендогенні та екзогенні ефекти ГР охоплюють не тільки лінійний ріст кісток, дія гормону спрямована на кістки, скелетні м'язи, жирову тканину, печінку та імунну систему. ГР також збільшує кісткову масу; діє на жирову тканину, посилюючи ліполіз, пригнічуючи ліпопротеїнову ліпазу, стимулюючи гормоночутливу ліпазу, зменшуючи транспорт глюкози та зменшуючи ліпогенез; діє на м'язи, збільшуючи транспорт амінокислот і може впливати на розподіл м'язових волокон. Таким чином, у пацієнтів із дефіцитом ГР терапія гормоном не тільки збільшує лінійну швидкість росту, але й сприяє підтримці здорової композиції тіла (збільшення м'язів і зменшення жирової маси), нормального рівня глюкози в крові та сприятливого ліпідного профілю.

На сьогоднішній день існує 11 станів, схвалених Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA), які показали користь від терапії ГР, серед яких, окрім дефіциту гормону росту у дітей та дорослих, синдромальна низькорослість (наприклад, синдроми Шерешевського-Тернера, Сільвера-Рассела, Прадера-Віллі, Де Груші), хронічна ниркова недостатність, тривала терапія глюкокортикоїдами в анамнезі, внутрішньоутробна затримка росту, ідіопатична низькорослість, ювенільний нейрофіброматоз, муковісцидоз та ін. Синдромальна низькорослість викликана не соматотропною недостатністю, для таких пацієнтів характерний дозозалежний характер ефективності ГР. Розрахункова частота поширеності соматотропної недостатності коливається від 1:4000 до 1:10000, при необхідності прийому препаратів для хворих пожиттєво. Це обумовлює актуальність вдосконалення підходів до виробництва препарату задля забезпечення його доступності для всіх категорій пацієнтів.

Мета дослідження. Аналіз сучасних тенденцій у виробництві гормону росту, зокрема рекомбінантного, з подальшою розробкою технологічної схеми виробництва, яка може бути реалізована вітчизняними підприємствами.

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

Основні результати. ГР – одноланцюговий поліпептид з двома поперечними дисульфідними зв'язками між цистеїновими групами, який секретується в клітинах передньої долі гіпофізу.

Ген, що відповідає за синтез ГР, кодує поліпептид, який містить 217 амінокислот. З цього поліпептида відщеплюється 26 амінокислот, утворюючи білок із молекулярною масою 22 кДа, що складається зі 191 амінокислотного залишку. Ця форма гормону є найбільш активною в організмі і становить понад 85% від загальної кількості гормону росту.

Вперше гормон був виділений і очищений у 1963 р. із гіпофіза, отриманого з трупного матеріалу. Гетерогенність отриманого гормону та передача хвороби Кройцфельда-Якоба у деяких пацієнтів після лікування призвели до заборони використання людського трупного ГР у 1985 р. Структуру ГР було визначено у 1972 р., що призвело до дослідження та розробки біосинтетичного препарату. У 1980 р. Genentech стала першою компанією, яка створила рекомбінантний людський ГР (рГР), і це був другий продукт, після людського інсуліну, отриманий за допомогою технологій рекомбінантних ДНК.

Перший доступний рГР, протропін, був поліпептидним гормоном, виробленим за технологією рекомбінантної ДНК у генетично сконструйованих клітинах *E. coli*. Протропін мав 192 амінокислоти і молекулярну масу 22 кДа. Ця молекула містила ідентичну послідовність із 191 амінокислоти, що міститься в нативному гормоні гіпофіза з додаванням метіоніну на N-кінці молекули. Наявність метіоніну викликало розвиток антитіл, хоча, як правило, не антитіл, що нейтралізують ріст. Сучасні форми рГР мають ідентичні 191 амінокислотну послідовність, що міститься в нативному гормоні гіпофіза.

На міжнародному фармацевтичному ринку випускаються різні препарати рГР, серед яких згідно Державного реєстру лікарських засобів (АТХ H01AC01) в Україні зареєстровані наступні торгові марки: Norditropin (Нордітропін Норділет, Novo Nordisk, Данія), Zomacton (Зомактон, Ferring, Німеччина), Genotropin (Генотропін, Pfizer Inc., США), Omnitrope (Омнітроп, Sandoz, Австрія), Saizen (Сайзен, Merck Serono S.p.A., Італія), Grouthropin (Гроутропін, Dong-A ST, Корея). Препарати виробляються технологіями рДНК за допомогою різних систем експресії – бактеріальних, дріжджових, клітинних ліній. Основними стадіями виробництва рГР на основі класичної системи експресії *E. coli* є: культивування рекомбінантного штаму з метою виділення клітинами цільового продукту у вигляді тілець включення, виділення тілець включення з подальшою ренатурацією білку, хроматографічне очищення рекомбінантного соматотропіну та відщеплення N-кінцевого метіоніну, подальше очищення білку, наприклад гідрофобною та гель-проникною хроматографією.

Але необхідність щоденного підшкірного введення рГР протягом багатьох років часто є на заваді оптимальному дотриманню режиму лікування. Багато років дослідники зосереджувалися на розробці препаратів тривалої дії з метою продовження періоду напіввиведення молекули гормону і зниження частоти введення. При цьому, на відміну від рГР, що являє собою один пептид масою 22 кДа, що виробляється аналогічним всіма фармакологічними компаніями, кожен із препаратів тривалої дії є окремим хімічним субстратом, зі своїм профілем фармакокінетики та фармакодинаміки.

Висновки. Сьогодні розвиток препаратів рГР забезпечується завдяки роботі виробників над оптимізацією систем експресії та стадій виробництва задля підвищення виходу та чистоти цільового продукту, створенню препаратів уповільненого вивільнення, подовженого періоду напіввиведення, нових пристроїв для ін'єкцій та розробці альтернативних шляхів доставки.

