

ГУРКОВСЬКА ОЛЕНА

Київський національний університет технологій та дизайну

e-mail: [13lena14@ukr.net](mailto:13lena14@ukr.net)

АНДРЕЄВА ОЛЬГА

Київський національний університет технологій та дизайну

<https://orcid.org/0000-0001-8374-2306>e-mail: [wayfarer14@ukr.net](mailto:wayfarer14@ukr.net)

## ПОРІВНЯЛЬНЕ ОЦІНЮВАННЯ СИСТЕМ ЕКСПРЕСІЇ У ВИРОБНИЦТВІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНСУЛІНУ

Після серцево-судинної та онкологічної патології одним із найбільш поширених неінфекційних захворювань людини сьогодення є цукровий діабет, який призводить до інвалідності, а іноді і до летальних наслідків. Лікування інсуліном переслідує завдання максимально можливої компенсації вуглеводного обміну, запобігання гіпо- і гіперглікемії та профілактики ускладнень цього захворювання. Ефективність дії інсуліну значною мірою залежить від того, у який спосіб його виготовили. На підставі аналізу літератури встановлено, що одним із основних напрямів удосконалення технології виробництва інсуліну є використання високопродуктивних штамів рекомбінантних мікроорганізмів. В результаті порівняльного оцінювання різних продуцентів препарату рекомбінантного інсуліну людини встановлено, що найбільш перспективним з них є штам бактеріальної культури *E. coli* JM109.

Ключові слова: цукровий діабет, біотехнологія, рекомбінантний інсулін, системи експресії, продуцент.

HURKOVSKA OLENA, ANDREYEVA OLGA

Kyiv National University of Technologies and Design

## COMPARATIVE ASSESSMENT OF EXPRESSION SYSTEMS IN THE PRODUCTION OF RECOMBINANT INSULIN

Lack of insulin in the body due to acquired or inherited factors leads to diabetes. The main objectives in the treatment of this pathology are maintaining a normal level of glycemia, preventing the occurrence and development of late complications, as well as preventing hypoglycemia. For many years, the lives of millions of people with diabetes have been saved by insulin, a vital medicine that the World Health Organization recommends that countries with a population exceeding 50 million people produce independently. From 1923 to the 80s of the last century, insulin was produced exclusively from animal raw materials - the pancreas of pigs and cattle, and only in 1982 was it possible for the first time to produce human insulin using the method of genetic modification of microorganisms. Currently, the share of genetically engineered human insulin throughout the world is steadily growing and in 2004 it accounted for more than 70% of the total production of the hormone. The features of the biotechnological method, which uses genetic engineering technology, are that the gene responsible for the synthesis of insulin is inserted into the DNA of the producer and the resulting genetically modified microorganisms synthesize proinsulin (inactive form), which, after enzymatic cleavage of the C-peptide, is converted into active (recombinant) insulin. The advantage of the method is the ease of scaling the process. Taking into account the importance of choosing an expression system already at the beginning of obtaining a recombinant protein, a comparative assessment of possible producers of a human recombinant insulin preparation was carried out, providing characteristics of the most promising of them as a biological agent. The selection of the expression medium was made based on an assessment of the efficiency, productivity and acceptability of the system for the synthesis of the target protein. The advantages of *Escherichia coli* (*E. coli*) as a producer have been established: high productivity and high level of expression, low cost, simplicity of cultivation conditions, rapid growth, the ability to change many parameters to optimize expression, absence of endotoxins. The research of the genetic apparatus and the high productivity of the *E. coli* bacterium make it economically feasible and realistically possible to genetically engineer strains that would engage in insulin biosynthesis. This will help improve yield and purity of the final product, reduce cycle times and enable scalable solutions based on existing equipment. Consequently, it will have a positive impact on improving the production technology of this drug and more fully providing it to diabetic patients.

Keywords: diabetes, biotechnology, recombinant insulin, expression systems, producer.

### Постановка проблеми

У наш час цукровий діабет розглядають як протеїн-залежне захворювання людини, яке пов'язане з порушенням синтезу білка. Протягом багатьох років життя мільйонам людей із цукровим діабетом рятує інсулін.

Інсулін – біологічно активна сполука, поліпептидний гормон, що виробляється β-клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози і виконує в організмі важливі функції контролю метаболізму та гомеостазу глюкози. Молекула інсуліну побудована з двох поліпептидних ланцюгів: ланцюг А містить 21 амінокислотний залишок, ланцюг В – 30 залишків, які з'єднані між собою двома дисульфідними містками. В амінокислотному складі ланцюга А виявляється видова специфічність будови інсуліну [1].

Нестача інсуліну в організмі внаслідок придбаних або успадкованих факторів призводить до захворювання на цукровий діабет. Основні завдання в лікуванні даної патології – підтримання нормального рівня глікемії, запобігання виникненню та розвитку пізніх ускладнень, а також попередження гіпоглікемії. Створення та впровадження нових форм інсуліну, що володіють поліпшеними фармакокінетичними і фармакодинамічними властивостями, являє собою один із шляхів досягнення кращого контролю глікемії та попередження розвитку гіпоглікемічних станів [2].

### Аналіз останніх джерел

Сучасне лікування цукрового діабету спрямовано на усунення симптомів захворювання і залежить

від його тяжкості. Легка форма хвороби (перший ступінь) нерідко вимагає лише чіткого дотримання дієти без прийому будь-яких медикаментів. Середня тяжкість (другий ступінь) зумовлює, крім дієти, введення інсуліну або ж прийом інших препаратів, які знижують рівень цукру [3, 4].

Інсулін відноситься до життєво важливих лікарських засобів, які Всесвітня організація охорони здоров'я рекомендує самостійно виробляти тим країнам, чие населення перевищує 50 млн чоловік. З 1923 р. до 80-х років минулого століття інсулін вироблявся винятково із тваринної сировини, а саме із підшлункової залози свиней і великої рогатої худоби, і лише у 1982 р. вперше була створена можливість виробництва інсуліну людини методом генетичної зміни мікроорганізмів. У наш час частка генно-інженерного інсуліну людини в усьому світі неухильно зростає і у 2004 р. склала понад 70 % від загального обсягу виробництва гормону [1].

Інсулін людини (Insulin Human) являє собою дрібнокристалічний порошок білого або майже білого кольору, з формулою  $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ . Під час його виробництва розрізняють стадії виробничого біосинтезу, дезінтеграції біомаси, відмивання тілець включення, рефолдингу (відновлення нативної структури білка), катіоно- та аніонообмінного хроматографічного очищення, гідролізу, іонообмінного хроматографічного очищення «сирого» інсуліну з наступною кристалізацією, фільтрацією та висушуванням одержаних кристалів, в результаті чого і отримують інсулін людини у вигляді нестерильної порошкоподібної субстанції [5].

У роботі [6] проаналізовано особливості біотехнологічного методу, у якому використовується генно-інженерна технологія: ген, відповідальний за синтез інсуліну, вбудовується в ДНК продуцента, отримані генно-модифіковані мікроорганізми синтезують проінсулін (неактивна форма), який після ферментативного відщеплення С-пептиду перетворюється на активний (рекомбінантний) інсулін. Перевага методу полягає у простоті масштабування процесу.

Використання рекомбінантних білків дає змогу ліквідувати дефіцит протеїнів і досягти рівня звичайних функціональних концентрацій за відсутності відповідних процедур генної терапії [7, 8]. Їх застосовують з метою заміни або поповнення природного пулу білків в організмі людини за умови, що рівень певного білка знижений або наявне захворювання, яке характеризується відсутністю продукції білка. Рекомбінантні білки, які є різновидами власних білків організму людини або мають аналогічний вплив на організм, представляють особливий інтерес для проведення наукових досліджень та практичних розробок.

На основі рекомбінантних білків виготовлено та затверджено в якості біофармацевтичних препаратів понад 400 продуктів. На фармацевтичному ринку представлені лікарські засоби на основі рекомбінантних білків, які призначені для лікування порушень обміну речовин (діабет типу 1 і типу 2, ожиріння або гіпоглікемія), гематологічних розладів (ниркові анемії, гемофілія А), онкологічних захворювань (меланома, рак молочної залози, рак товстої кишки) [8].

В процесі одержання рекомбінантного білка умовно виділяють наступні три стадії [7]:

- вибір системи експресії та введення чужорідного гену до носія за допомогою вектора експресії;
- апстрім процеси – вирощування культури клітин, накопичення цільового білка;
- даунстрім процеси – виділення та очищення цільового білка.

З урахуванням непересічної ролі вибору системи експресії вже на початку одержання рекомбінантного білка сформульовано *мету роботи* – порівняльне оцінювання можливих продуцентів препарату рекомбінантного інсуліну людини з наданням характеристики найбільш перспективного з них як біологічного агента. За *об'єкт дослідження* обрано системи експресії рекомбінантних білків у виробництві інсуліну. Під час проведення дослідження застосовано загальнонаукові *методи* пізнання у вигляді аналізу, синтезу, порівняння, збору та оброблення інформації.

#### Виклад основного матеріалу

Замісна інсулінотерапія є стандартом лікування хворих на цукровий діабет першого та другого типу. За тривалістю ефекту і часом його настання препарати інсуліну ділять на три основні групи: швидкодіючі (короткої дії), середньої тривалості дії і довготривалої дії. З розвитком технології рекомбінантної ДНК став доступним рекомбінантний (біосинтетичний) людський інсулін [9], чистота та фармацевтична якість якого перевершують тваринний і напівсинтетичний інсулін [10].

Рекомбінантними називаються білки, одержані за допомогою генної інженерії: в результаті впровадження гену (фрагменту ДНК, що несе інформацію про будову одного білка) людини, тварини або рослини в генетичний матеріал бактерій, ссавців чи дріжджових клітин; ці мікроорганізми можуть бути використані у якості продуцентів протеїнів у промислових масштабах для терапевтичних, наукових та дослідницьких цілей [7].

Виробництво рекомбінантних білків вимагає оптимального вибору відповідного «господаря» з ефективним механізмом біосинтезу, здійснення посттрансляційних модифікацій та рефолдингу цільового білка. Відповідно до традиційної стратегії в експресії рекомбінантного білка ген, що кодує білок, вводять в ДНК-вектор, який вноситься до клітини обраного продуцента, з подальшим культивуванням в умовах, прийнятних для трансляції протеїну [11]. При внутрішньоклітинній експресії клітини піддаються лізису, після чого цільовий білок екстрагують і піддають подальшому очищенню.

У промислових умовах рекомбінантний інсулін людини отримують за допомогою транспептидації. У якості систем експресії широко застосовують прокаріотичні (рекомбінантний штам *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) та еукаріотичні клітини (дріжджі *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*) [8, 12, 13]; продуцентами можуть також виступати трансгенні клітини тварин і рослин, клітини комах [13, 14]. Вибір системи експресії

залежить від типу та структури білка. Необхідно також врахувати вимоги до функціональної активності і бажаного виходу цільового продукту [7].

Значне поширення на практиці одержали бактеріальні системи експресії рекомбінантних білків на основі грам-негативної **бактерії** *Escherichia coli* (*E. Coli*, кишкова паличка), в геном яких включена послідовність ДНК інсуліну людини [15, 16]. Це пов'язано з детальним вивченням даного мікроорганізму на молекулярному рівні, повним розшифруванням його генетичного коду, дешевиною культивування у промислових масштабах, швидким ростом культури та відносно легкою можливістю зміни параметрів культивування для оптимізації експресії білка [12, 14]. Даний продуцент має ряд переваг: високий вихід цільового продукту, потенційно високий рівень експресії, низьку вартість ростового середовища ферментації, простоту умов культивування, швидкий ріст, простоту маніпуляцій з геномом порівняно з іншими мікроорганізмами, відсутність ендотоксинів [16].

Необхідно зауважити, що кишкова паличка є прокаріотичним мікроорганізмом, тому складні еукаріотичні білки не завжди синтезуються функціонально придатними через відсутність посттрансляційних модифікацій або молекулярний фолдинг у клітині *E. coli*. Внаслідок надекспресії білки агрегуються в тільця включення, які у подальшому підлягають відновленню багатоетапними процесами денатурації, рефолдингу та очищення з метою отримання високоєфективного чистого білка. Завдяки дослідженням з оптимізації ДНК-вектору штамів *E. coli*, покращенню умов культивування за рахунок зміни фізичних параметрів і додавання певних речовин до поживного середовища досягнуто значне підвищення рівня експресії протеїнів у розчиненому вигляді у необхідній конформації [14].

*E. coli* стала улюбленим об'єктом біотехнологічних досліджень завдяки своїй здатності розмножуватися простим поділом на середовищах, що містять лише іони, мікроелементи та джерело вуглецю, наприклад, глюкозу. При культивуванні на збагачених рідких середовищах тривалість генерації (час між утворенням та поділом бактерії) у логарифмічній фазі росту за стандартних умов становить 22 хв. На даний час *E. coli* є економічно ефективною і найбільш поширеною серед бактеріальних систем експресії при виробництві препаратів рекомбінантних інсулінів [14, 17]. Недоліком даного продуценту є те, що у більшості випадків цільовий білок напрацьовується у вигляді тілець включень у хаотично розгорнутій формі, що потребує додаткових технологічних етапів.

Синтезований бактеріальною клітиною еукаріотичний білок часто доводиться піддавати ферментативній модифікації, приєднуючи до білкової молекули низькомолекулярні сполуки, що у багатьох випадках є обов'язковим для правильного функціонування білка. *E. coli* та інші прокаріоти не здатні здійснювати ці модифікації, тому для отримання повноцінних еукаріотичних білків використовують **дріжджові культури**. Для них характерна простота вирощування та здатність виконувати багато посттрансляційних модифікацій (протеолітичний процесінг, фолдинг, утворення дисульфідних містків та глікозилювання) [13]. У якості систем експресії застосовують культури *S. cerevisiae* та *P. pastoris*. Рекомбінантні білки в дріжджах синтезуються у розчинній функціонально активній формі. Виробництво з використанням даної системи експресії економічно ефективно, піддається масштабуванню з використанням великих біореакторів.

**Дріжджі** *S. cerevisiae* характеризуються відносно швидким темпом росту культури (3-5 діб від початку засіву до закінчення індукції), високим виходом цільового продукту (до 40 г/л), надзвичайно низькою ціною ростового середовища та ферментації, можливістю експресії великих поліпептидів та глікозилювання. Добра вивченість та продуктивність цього біологічного агента роблять можливим його використання у якості продуцента інсуліну [6,18]. До недоліків культури *S. cerevisiae* належать схильність до гіперглікозилювання білка, підвищення імуногенності внаслідок глікозилювання високоманнозного типу та неможливість високощільного культивування. При застосуванні метилотрофних **дріжджів** *P. pastoris* вказані недоліки долаються, культура досягає високої щільності клітин за допомогою індукції метанолом. Основна перевага *P. pastoris* порівняно із *S. cerevisiae* полягає у відсутності гіперглікозилювання білків та більшій адаптованості секретованих глікопротеїнів до застосування людиною [6].

При застосуванні систем експресії на основі **клітин ссавців** одержують білок у нативній конформації за рахунок правильного фолдингу та посттрансляційних модифікацій. Недоліком є висока вартість клітин ссавців і довготривале культивування. В якості основних продуцентів біофармацевтичних білкових продуктів використовують різні культури клітин ссавців: **лінії клітин NSO** (клітини мієломи миші), **BNK** (клітини нирок дитинчат хом'яка), **CHO** (клітини яєчників китайського хом'яка), **HEK-293** (ембріональні клітини нирок людини). Такі системи експресії забезпечують високий рівень продукції функціональних рекомбінантних білків з коректним N-глікозилюванням та іншими посттрансляційними модифікаціями [19, 20, 21].

Ще одними відомими системами експресії є **клітини комах, інфіковані бакуловірусами**. Бакуловіруси – група вірусів, що вражають лише членистоногих та перебудовують експресію генів клітини-господаря таким чином, що вона починає синтезувати білок вірусної оболонки – поліедрин. Промотор гена поліедрину дуже сильний, заміна цього гена на ген чужорідного білка з наступною інокуляцією отриманого рекомбінантного бакуловірусу культури клітин комах приводить до біосинтезу великої кількості гетерологічного білка, який завдяки подібності систем внесення посттрансляційних модифікацій у комах і ссавців буде близький до нативної форми цільового рекомбінантного білка. На основі бакуловірусів сконструйовані вектори для експресії генів, які кодують білки ссавців і вірусів тварин [11]. Зазначеним системам притаманні високі рівні експресії білка з посттрансляційними модифікаціями, наближеними до

клітин ссавців, легкість масштабування і спрощене зростання клітин, які адаптовані до високої щільності суспензії культури для великомасштабного вираження.

Використання **клітин рослин** у якості систем експресії для отримання рекомбінантних фармацевтичних білків обумовлено тим, що у рослинних тканин відсутній ризик забруднення рекомбінантного білка патогенами тваринного походження (вірусами та пріонами). Трансгенні клітини рослин використовуються для отримання рекомбінантних білків у зв'язку з такими їх перевагами, як економічна ефективність, висока якість процесингу білків, простота виробництва, наявність еукаріотичного механізму посттрансляційних модифікацій [18]. Рекомбінантний людський попередник інсуліну продукується та накопичується у насінні трансгенних рослин і потім ферментативно обробляється *in vitro*. З трансгенної рослини тютюну вперше був екстрагований гормон росту людини як рекомбінантний білковий продукт. Але трансгенні клітини рослин є небезпечним контамінантом навколишнього середовища.

Вибір експресивного середовища у промислових масштабах здійснювали на основі оцінювання показників економічності, продуктивності та прийнятності системи для синтезу цільового білка. Для кожного конкретного протеїну параметри культивування та індукції експресії є індивідуальними і вимагають детального розроблення процесу у лабораторних умовах з його подальшим масштабуванням у біореакторах. На підставі порівняльного аналізу систем експресії (Табл. 1) можна зробити висновок про те, що, незважаючи на всі свої недоліки, *E. Coli* в цілому є одним з найкращих продуцентів для виробництва рекомбінантного інсуліну.

Таблиця 1

### Порівняльний аналіз основних систем експресії рекомбінантних білків

Системи експресії	Переваги	Недоліки
1	2	3
Бактеріальна культура <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Високий вихід цільового продукту;</li> <li>✓ висока продуктивність;</li> <li>✓ низька вартість ростового середовища ферментації;</li> <li>✓ швидкий ріст культури;</li> <li>✓ простота умов культивування;</li> <li>✓ відсутність ендотоксинів;</li> <li>✓ можливість зміни параметрів з метою оптимізації експресії</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Складність біосинтезу поліпептидів великого розміру (понад 50 кДа);</li> <li>✓ відсутність системи глікозилювання;</li> <li>✓ неефективне формування дисульфідних зв'язків;</li> <li>✓ можливість порушення формування білків у цитоплазмі, включаючи порушення конформації;</li> <li>✓ мінімальні посттрансляційні модифікації;</li> <li>✓ неефективність рефолдингу <i>in vitro</i>;</li> <li>✓ надекспресія, утворення нерозчинних тілець включення</li> </ul>
Культура дріжджів <i>S. cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Швидкий темп росту культури;</li> <li>✓ високий рівень експресії;</li> <li>✓ високий вихід цільового продукту;</li> <li>✓ низька ціна ростового середовища та ферментації, економічна доступність;</li> <li>✓ простота умов культивування;</li> <li>✓ здійснення багатьох посттрансляційних модифікацій;</li> <li>✓ ефективний фолдинг білка;</li> <li>✓ відсутність ендотоксинів;</li> <li>✓ можливість експресії великих поліпептидів та глікозилювання</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Схильність до гіперглікозилювання білка;</li> <li>✓ підвищення імуногенності внаслідок глікозилювання високоманнозного типу;</li> <li>✓ неможливість високощільного культивування</li> </ul>
Культура дріжджів <i>P. pastoris</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Відсутність гіперглікозилювання білків;</li> <li>✓ більша адаптованість секретованих глікопротеїнів до застосування людиною;</li> <li>✓ високий рівень експресії;</li> <li>✓ економічна доступність;</li> <li>✓ простота умов культивування;</li> <li>✓ швидкий ріст, висока щільність культивування;</li> <li>✓ ефективна секреція білка;</li> <li>✓ ефективний фолдинг білка;</li> <li>✓ здійснення багатьох посттрансляційних модифікацій;</li> <li>✓ відсутність ендотоксинів</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Використання метанолу для індукції експресії;</li> <li>✓ потреба у чіткому контролі параметрів культивування;</li> <li>✓ термолабільність</li> </ul>
Клітини ссавців <i>CHO, NSO, BNK, HEK-293</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Високий рівень експресії;</li> <li>✓ ефективний фолдинг білка;</li> <li>✓ посттрансляційні модифікації з одержанням нативного білка;</li> <li>✓ відсутність ендотоксинів</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Складні вимоги вирощування культури;</li> <li>✓ висока вартість культурального середовища;</li> <li>✓ ризик вірусної та онкогенної контамінації;</li> <li>✓ висока вартість цільового продукту;</li> <li>✓ довготривалість культивування</li> </ul>

Продовження Таблиці 1

1	2	3
	✓	✓
Клітини комах, інфіковані бакуловірусом	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Високий рівень експресії;</li> <li>✓ швидкий ріст;</li> <li>✓ здійснення багатьох посттрансляційних модифікацій;</li> <li>✓ відсутність ендотоксинів</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Висока вартість культурального середовища та кінцевого продукту;</li> <li>✓ лізис клітин внаслідок вірусної інфекції,</li> <li>✓ можливе погіршення властивостей експресивних білків</li> </ul>
Рослинні культури	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Великомасштабне культивування;</li> <li>✓ відносна дешевизна;</li> <li>✓ низький рівень контамінації патогенами тваринного походження;</li> <li>✓ ефективний фолдинг білка</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Можливість контамінації мікотоксинами, пестицидами та ендотоксинами;</li> <li>✓ алергічні реакції на рослинний протеїн глікан;</li> <li>✓ можливість контамінації навколишнього середовища трансгенними клітинами рослин</li> </ul>

Нижче наведено більш докладну характеристику мікроорганізму-продуценту *E. Coli*.

*Систематичне положення:* царство: *Bacteria*; тип: *Proteobacteria*; клас: *Gammaproteobacteria*; порядок: *Enterobacteriales*; родина: *Enterobacteriaceae*; рід: *Escherichia*; вид: *Escherichia coli*. За визначником Берджі *E. coli* відноситься до п'ятої групи (факультативно анаеробні грамнегативні палички), підгрупа 1 (родина: *Enterobacteriaceae*); рід: *Escherichia*; вид *Escherichia coli* [22, 23, 24].

*Морфолого-цитологічні ознаки.* *E. coli JM109* – це грамнегативні прямі короткі палички із заокругленими кінцями, розміром 1×3,50 мкм. Одиночні або розташовуються в парах. Рухливі (перитрихи), не утворюють капсул, спор та цист. Мають чітко помітні тільця включення після індукції синтезу гібридного білка [22, 25, 26]. При висиханні бактерій на твердій основі помітно сплюснення. Піднесення бактерій над пласкою поверхнею підкладки становить 0,2-0,4 мкм. Результати атомно-силової мікроскопії вказують на однотипну морфологію поверхні бактеріальних клітин, які мають характерні відростки (пілі) довжиною 1-2 мкм.

*Культуральні ознаки.* *E. coli* є факультативним анаеробом. На агаризованих середовищах вона утворює непрозорі опуклі тонкі S-колонії з дещо хвилястими, а іноді рівними краями, довжиною приблизно 3-5 мм. У рідких середовищах викликає утворення осаду та помутніння середовища, зрідка формуючи поверхневу плівку, що свідчить про дифузійний характер росту [23]. На диференційно-діагностичних середовищах (Ендо, ЕМС) ці бактерії накопичують молочну кислоту, розщеплюючи лактозу, що призводить до зниження показника рН, тому при додаванні індикаторів колонії мають яскраве забарвлення: на середовищі Ендо – малинове з металевим блиском або без нього; на середовищі ЕМС – темно-фіолетове. Колонії *E. coli JM109* при рості на агаризованому середовищі LB мають круглу форму, гладкі, напівпрозорі, блискуче-сірі. Діаметр колоній 1-3 мм, краї росту рівні, консистенція м'яка. Ріст у рідких середовищах характеризується рівним помутнінням.

*Фізіолого-біохімічні ознаки.* Клітини *E. coli JM109* ростуть при температурі 4-42 °С, оптимум температури 37 °С, оптимум рН 6,8-7,6. У якості джерела азоту використовують мінеральні солі амонію та органічні сполуки: амінокислоти, пептон, триптон, дріжджовий екстракт. У якості джерела вуглецю у бідних середовищах використовують за наявності амінокислоти, вуглеводи, інколи навіть гліцерин. Проводять розщеплення глюкози та інших моноцукрів з утворенням відповідної кислоти. Реакції на оксидазу та ліпазу не дають, але є каталазопозитивними та цитратнегативними. Фарбуються метиленовим червоним, реакція Фогеса-Проскауера негативна. Не гідролізують сечовину, відновлюють нітрати до нітритів. Зброджують L-арабінозу, D-ксилону, мальтозу, D-манітол, D-маннозу, L-рамнозу і трегалозу. Утворюють індол, не утворюють сірководень, не розріджують желатин [27]. Клітини штаму продуцента виявляють стійкість до ампіциліну (до 500 мкг/мл), обумовлену наявністю у плазміді гена β-лактамази (*bla*) [23, 27]. При витримуванні клітин протягом декількох місяців на агаризованому середовищі LB, що містить ампіцилін, не спостерігається втрати чи перебудови плазміді *pHINS11*, що відповідає за експресію гібридного білка.

Біосинтез цільового білка в *E. coli* відбувається за стандартним механізмом синтезу білка у клітинах бактерій. Культивування проводять у дві фази у ферментері при оптимальній температурі росту продуцента цільового білка, інтенсивному перемішуванні та аерації. У першій фазі відбувається накопичення біомаси, у другій – індукція та синтез рекомбінантного білка. Для запуску механізму біосинтезу цільового рекомбінантного білка у середовище додають індуктор.

**Висновки.** У наш час одним із поширених неінфекційних захворювань людини є цукровий діабет, який призводить до інвалідності, а іноді і до летальних наслідків. Лікування інсуліном переслідує завдання максимально можливої компенсації вуглеводного обміну, запобігання гіпо- і гіперглікемії та профілактики ускладнень цього захворювання. Ефективність дії інсуліну значною мірою залежить, від того, у який спосіб його виготовили. Першим лікарським засобом був інсулін тваринного походження, який і досі іноді використовується для лікування діабету. Наступним кроком був синтез людського інсуліну, який став справжнім рятівником багатьох людей з діабетом. Нині потужними супротивниками діабету все частіше

стають аналогові препарати – ліки на базі генетично модифікованого людського інсуліну, які діють більш швидко та природно порівняно зі своїми попередниками.

Виробництво рекомбінантного інсуліну людини вимагає оптимального вибору відповідного «господаря» з ефективним механізмом біосинтезу, здійснення посттрансляційних модифікацій та рефолдингу цільового білка. З урахуванням цього проаналізовано низку основних систем експресії рекомбінантних білків у виробництві інсуліну. Вибір експресивного середовища здійснено шляхом оцінювання показників економічності, продуктивності та прийнятності системи для синтезу цільового білка. Встановлено переваги *E. coli* як продуценту: висока продуктивність і високий рівень експресії, низька вартість, простота умов культивування, швидкий ріст, можливість зміни багатьох параметрів з метою оптимізації експресії, відсутність ендотоксинів. Дослідженість генетичного апарату і висока продуктивність бактерії *E. Coli* роблять економічно обґрунтованим та реально можливим генно-інженерне конструювання штамів, які б займалися біосинтезом інсуліну. Це сприятиме підвищенню виходу і чистоти кінцевого продукту, скороченню тривалості технологічного циклу і прийняттю масштабованих рішень на основі існуючого обладнання. Отже, позитивно позначиться на удосконаленні технології виробництва цього лікарського засобу та більш повному забезпеченні ним хворих на діабет.

### Література

1. Інсулін людини: структура, одержання та сучасне виробництво [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <https://osvita.ua/vnz/reports/biolog/23236/>.
2. Welsh M., Scherberg N., Gilmore R., Steiner D. Translational control of insulin biosynthesis. Evidence for regulation of elongation, initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose. *Biochem J.* 1986. Vol. 235 (2). P. 459–467.
3. Каджарян В. Г. Внутрішня медицина. Ендокринологія. Хвороби ендокринної системи: визначення, класифікації, діагностичні критерії : навч. посіб. / В. Г. Каджарян, О. О. Солов'юк, Н. І. Капшитар. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2020. – С. 13–27.
4. Ендокринологія : [підручник / Боднар П. М., Михальчишин Ю. І., Комісаренко Ю. І. та ін.]. – Вид. 3, переробл. та допов. – Вінниця : Нова книга, 2013. – С. 205–232.
5. Еквівалентні препарати рекомбінантного людського інсуліну та їх місце в терапії [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5819055/>
6. Коровка К. Аналіз технологій виробництва інсуліну людини / К. Коровка // Матеріали Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Тенденції та перспективи розвитку науки і освіти в умовах глобалізації» : зб. наук. праць. – Переяслав, 2021. – № 76. – С. 322–325.
7. Нечаєва Я. О. Рекомбінантні білки терапевтичного призначення: особливості отримання, вивчення безпеки та ефективності / Я. О. Нечаєва, С. М. Грабчук, Ю. В. Горшунов // Вісник Запорізького національного університету. – 2017. – № 2. – С. 85–93.
8. Akash M. S., Rehman K., Tariq M., Chen S. Development of therapeutic proteins: advances and challenges. *Turkish J. Biol.* 2015. № 39. P. 1–16.
9. Andersen D., Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Cur. Op. Biotechnol.* 2002. Vol. 13. P. 117–123.
10. Посилкіна О. В. Перспективи розробки і клінічного використання біосимілярів в Україні / О. В. Посилкіна, О. В. Літвінова // Клінічна фармація. – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 11–14.
11. Компанець Т. А. Віруси як векторні системи : курс лекцій / Т. А. Компанець. – Київ : Київський національний університет ім. Т. Шевченка. Видавництво Українського фітосоціологічного центру, 2007. – С. 56–62.
12. Chen J. Q., Zhang H. T., Hu M. H., Tang J. G. Production of human insulin in an *E. Coli* system with met-lys-human proinsulin as the expressed precursor. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2015. № 55. P. 5–15.
13. Cousens L. S., Shuster J. R., Gallegos C. High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 1987. Vol. 61, Issue 3. P. 265–275.
14. Коровка К. Характеристика рекомбінантного штаму *Escherichia coli* як продуцента інсуліну людини / К. Коровка // Матеріали ХІ Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Проблеми та перспективи розвитку сучасної науки в країнах Європи та Азії» : зб. наук. праць. – Переяслав, 2021. – С. 6–8.
15. Rosano G. L. Експресія рекомбінантного білка в *Escherichia coli*: досягнення та проблеми / G. L. Rosano, E. A. Seccarelli // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – С. 172.
16. Vincentelli R., Romier C. Expression in *Escherichia coli*: becoming faster and more complex. *Current Opinion in Structural Biology.* 2013. Vol. 23, Issue 3. P. 326–334.
17. Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of *E. Coli*. Review. Article Open Access Published: 04 February 2016. № 6. Article number: 44.
18. Клітинні фабрики для виробництва інсуліну [Електронний ресурс] / [Набіх А. Бешен, Мохаммед Н. Байшен, Абдулла Шейх та ін.]. – Режим доступу : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203937/>.
19. Chu L., Robinson D. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Structural Biology.* 2001. № 12. P. 180–187.
20. Makrides S. C. Components of Vectors for Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. *Protein*

Express Purif. 1999. № 17. Vol. 17, Issue 2. P. 183–202.

21. Colosimo A., Goncz K. K., Holmes A. R. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Bio Techniques*. 2000. Vol. 20. P. 314–331.

22. Родина кишкових бактерій : метод. вказівки з дисципліни «Мікробіологія, вірусологія та імунологія з мікробіологічною діагностикою» до практичних занять / упор. В. В. Мінухін, Н. І. Коваленко, Т. М. Замазій. – Харків : ХНМУ, 2014. – С. 4–5.

23. Кишкова паличка (*Escherichia coli*). Огляд [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <https://microbenotes.com/escherichia-coli-e-coli/>.

24. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Brenner D. J., Krieg N. R., Staley, J. T., Garrity G. M. New-York: Springer-Verlag, 2005. Vol. 20.

25. Thomas M. Schmidt. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Academic Press, 2019. 3199 p.

26. Краснопольський Ю. М. Фармацевтична біотехнологія / Ю. М. Краснопольський, А. С. Дудніченко, В. І. Швець. – Харків : НТУ «ХП», 2011. – 228 с.

27. Мікробіологія : підручник / [Л. І. Дикий, І. Ю. Холуп'як, Н. Ю. Шевельова та ін.]. – Харків : Професіонал, 2006. – 433 с.

#### References

1. Insulin liudyny: struktura, oderzhannia ta suchasne vyrobnytstvo [Elektronnyi resurs]. □ Rezhym dostupu : <https://osvita.ua/vnz/reports/biolog/23236/>.

2. Welsh M., Scherberg N., Gilmore R., Steiner D. Translational control of insulin biosynthesis. Evidence for regulation of elongation, initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose. *Biochem J.* 1986. Vol. 235 (2). R. 459–467.

3. Kadzharian V. H. Vnutrishnia medytsyna. Endokrynolohiia. Khvoroby endokrynoi systemy: vyznachennia, klasyfikatsii, diahnostychni kryterii : navch. posib. / V. H. Kadzharian, O. O. Soloviuk, N. I. Kapshytar. – Zaporizhzhia : ZDMU, 2020. – S. 13–27.

4. Endokrynolohiia : [pidruchnyk / Bodnar P. M., Mykhalchyshyn Yu. I., Komisarenko Yu. I. ta in.]. – Vyd. 3, pererobl. ta dopov. – Vinnytsia : Nova knyha, 2013. – S. 205–232.

5. Ekvivalentni preparaty rekombinantnoho liudskoho insulinu ta yikh mistse v terapii [Elektronnyi resurs]. – Rezhym dostupu : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5819055/>

6. Korovka K. Analiz tekhnolohii vyrobnytstva insulinu liudyny / K. Korovka // Materialy Mizhnarodnoi naukovo-praktychnoi internet-konferentsii «Tendentsii ta perspektyvy rozvytku nauky i osvity v umovakh hlobalizatsii» : z6. nauk. prats. – Pereiaslav, 2021. – № 76. – S. 322–325.

7. Niechaieva Ya. O. Rekombinantni bilky terapevtychnoho pryznachennia: osoblyvosti otrymanna, vyvchennia bezpechnosti ta efektyvnosti / Ya. O. Niechaieva, S. M. Hrabchuk, Yu. V. Horshunov // Visnyk Zaporizkoho natsionalnoho universytetu. – 2017. – № 2. – S. 85–93.

8. Akash M. S., Rehman K., Tariq M., Chen S. Development of therapeutic proteins: advances and challenges. *Turkish J. Biol.* 2015. № 39. R. 1–16.

9. Andersen D., Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Cur. Op. Biotechnol.* 2002. Vol. 13. R. 117–123.

10. Posylkina O. V. Perspektivy rozrobky i klinichnoho vykorystannia biosymiliariv v Ukraini / O. V. Posylkina, O. V. Litvinova // Klinichna farmatsiia. – 2014. – T. 18, № 1. – S. 11–14.

11. Kompanets T. A. Virusy yak vektorni systemy : kurs lektsii / T. A. Kompanets. – Kyiv : Kyivskiy natsionalnyi universytet im. T. Shevchenka. Vydavnytstvo Ukrainkoho fitosotsiolohichnoho tsentru, 2007. – S. 56–62.

12. Chen J. Q., Zhang H. T., Hu M. H., Tang J. G. Production of human insulin in an E. Coli system with met-lys-human proinsulin as the expressed precursor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015. № 55. R. 5–15.

13. Cousens L. S., Shuster J. R., Gallegos C. High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 1987. Vol. 61, Issue 3. R. 265–275.

14. Korovka K. Kharakterystyka rekombinantnoho shtamu *Escherichia coli* yak produtsenta insulinu liudyny / K. Korovka // Materialy XLI Mizhnarodnoi naukovo-praktychnoi internet-konferentsii «Problemy ta perspektyvy rozvytku suchasnoi nauky v krainakh Yevropy ta Azii» : zb. nauk. prats. □ Pereiaslav, 2021. – S. 6–8.

15. Rosano G. L. Ekspresii rekombinantnoho bilka v *Escherichia coli*: dosiahnennia ta problemy / G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli // *Front Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – S. 172.

16. Vincentelli R., Romier C. Expression in *Escherichia coli*: becoming faster and more complex. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013. Vol. 23, Issue 3. R. 326–334.

17. Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of E. Coli. Review. Article Open Access Published: 04 February 2016. № 6. Article number: 44.

18. Klitynni fabryky dlia vyrobnytstva insulinu [Elektronnyi resurs] / [Nabikh A. Beshen, Mokhammed N. Baishen, Abdulla Sheikh ta in.]. – Rezhym dostupu : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4203937/>.

19. Chu L., Robinson D. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Structural Biology*. 2001. № 12. R. 180–187.

20. Makrides S. C. Components of Vectors for Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. *Protein Express Purif.* 1999. № 17. Vol. 17, Issue 2. R. 183–202.

21. Colosimo A., Goncz K. K., Holmes A. R. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Bio Techniques*. 2000. Vol. 20. P. 314–331.

22. Rodyna kyshkovykh bakterii : metod. vказivky z dystsypliny «Mikrobiolohiia, virusolohiia ta imunolohiia z mikrobiolohichnoiu diahnostykoiu» do praktychnykh zaniat / upor. V. V. Minukhin, N. I. Kovalenko, T. M. Zamazii. – Kharkiv : KhNMU, 2014. – S. 4–5.

23. Kyshkova palychka (*Escherichia coli*). Ohliad [Elektronnyi resurs]. □ Rezhym dostupu : <https://microbenotes.com/escherichia-coli-e-coli/>.

24. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Brenner D. J., Krieg N. R., Staley, J. T., Garrity G. M. New-York: Springer-Verlag, 2005. Vol. 20.

25. Thomas M. Schmidt. *Encyclopedia of Microbiology*. Oxford: Academic Press, 2019. 3199 p.

26. Krasnopolskyi Yu. M. Farmatsyevtychna biotekhnolohiia / Yu. M. Krasnopolskyi, A. S. Dudnichenko, V. I. Shvets. – Kharkiv : NTU «KhPI», 2011. – 228 s.

27. Mikrobiolohiia : pidruchnyk / [L. I. Dykyi, I. Yu. Kholup'iak, N. Yu. Shevelova ta in.]. – Kharkiv : Profesional, 2006. – 433 s.