

КОМПЛЕКСНА ОПТИМІЗАЦІЯ ВІДМИВКИ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН ТА ТІЛЕЦЬ ВКЛЮЧЕННЯ У ВИРОБНИЦТВІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНСУЛІНУ ЛЮДИНИ

Хейломський Д. О., Майстренко Л. А., Мокроусова О. Р.
Київський національний університет технологій та дизайну, Київ
olenamokrousova@gmail.com

Процеси відмивки бактеріальних клітин штаму генно-модифікованого штаму-продуценту рекомбінантного інсуліну людини на основі *Escherichia coli* BL21 від компонентів культурального середовища, а також відмивки виділених в результаті руйнування зазначених бактеріальних клітин тілець включення (ТВ) від компонентів цитоплазми та клітинного дебрису, значною мірою визначають технологічність, вихід та якість очищення цільового продукту на наступних етапах даунстрім-процесу біотехнологічного виробництва рекомбінантного інсуліну людини. Зокрема, оптимізація режимів роботи відцентрового сепаратора в процесі відмивки бактеріальних клітин штаму-продуценту від компонентів культурального середовища, відмивки ТВ, виділених в результаті руйнування зазначених бактеріальних клітин, а також оптимізація складу середовища для відмивання ТВ, є важливими з огляду на підвищення якості відмивки, зменшення втрат цільового продукту та покращення технологічності проведення наступної стадії даунстрім-процесу (розчинення ТВ), що визначило мету даної роботи.

В результаті проведених досліджень показано, що діапазони швидкості подачі суспензії на відцентровий сепаратор з автоматичним вивантаженням 300 – 650 л/г та часу між вивантаженнями 250 – 350 С за максимальної швидкості обертання барабану 11 700 об/хв входять до простору дизайну оптимальних параметрів відцентрового розділення. В процесі оптимізації було також визначено ймовірну причину виникнення високих пускових струмів мішалок в реакторах під час відмивки та розчинення гібридного білку (ГБ) перед рефолдінгом (вміст нуклеїнових кислот), що в свою чергу може викликати їх аварійне відключення під час запуску. Було запропоновано альтернативні рішення зазначеної проблеми: використання ДНКазиди під час відмивки суспензії ТВ або використання нового, потужнішого обладнання, конструкція якого враховує можливість виникнення високих пускових струмів.

Отримані експериментальні залежності дозволили запропонувати кореляцію порядків величин нормалізованої відмінності між значеннями в'язкості суспензій та вмістом в них сухого залишку для впровадження в якості індикатору якості концентрування ТВ для поточного контролю технологічного процесу. Крім того, в модельних експериментах було досліджено вплив таких ПАР, як PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1500, ROKamin K15K, ROKwinol 80 та ROKanol CML10, під час відмивки ТВ на повноту видалення нуклеїнових кислот, відсутність втрат продукту при відмивці, та повноту розчинення ТВ перед рефолдінгом. Найкращий показник повноти розчинення (83,21%) знайдено після відмивки ТВ розчином ПАР ROKwinol (Твін або Полісорбат) 80. На жаль, жодний склад розчину для відмивки з досліджуваних не дозволяє досягнути повного видалення нуклеїнових кислот.

Загалом, результати проведених досліджень дозволили окреслити простір дизайну оптимальних параметрів відцентрового розділення, що вже використовується в процесі виробництва. Результати визначення параметрів в'язкості технологічних середовищ дозволили висунути гіпотезу та запропонувати можливі шляхи вирішення проблем експлуатації ємнісного обладнання, а також уточнити технічні вимоги до нього. Порівняльні дослідження доступних ПАР щодо їх використання у розчині для відмивки ТВ дозволили сформулювати перспективні напрямки подальших досліджень.