

Школа Инженерная школа природных ресурсов
Направление подготовки (специальность) 18.04.01 «Химическая технология»
Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Анализ контрольных точек получения первичного инсулина гларгина в ООО «ГЕРОФАРМ»

УДК 615.252.349.7

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна		

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Чернова Анна Павловна	к.х.н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ ПО РАЗДЕЛАМ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Былкова Татьяна Васильевна	к.э.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ООД	Сечин Андрей Александрович	к.т.н.		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор ОХИ	Короткова Елена Ивановна	д.х.н.		

ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОСВОЕНИЯ

ООП «Анализ и контроль в химических и фармацевтических производствах»

Код компетенции	Наименование компетенции
Универсальные компетенции	
УК(У)-1	Способен осуществлять критический анализ проблемных ситуаций на основе системного подхода, вырабатывать стратегию действий
УК(У)-2	Способен управлять проектом на всех этапах его жизненного цикла
УК(У)-3	Способен организовывать и руководить работой команды, вырабатывая командную стратегию для достижения поставленной цели
УК(У)-4	Способен применять современные коммуникативные технологии, в том числе на иностранном (-ых) языке (-ах), для академического и профессионального взаимодействия
УК(У)-5	Способен анализировать и учитывать разнообразие культур в процессе межкультурного взаимодействия
УК(У)-6	Способен определять и реализовывать приоритеты собственной деятельности и способы ее совершенствования на основе самооценки
Общепрофессиональные компетенции	
ОПК(У)-1	Готовность к коммуникации в устной и письменной формах на русском и иностранном языках для решения задач профессиональной деятельности
ОПК(У)-2	Готовность руководить коллективом в сфере своей профессиональной деятельности, толерантно воспринимая социальные, этнические, конфессиональные и культурные различия
ОПК(У)-3	Способность к профессиональной эксплуатации современного оборудования и приборов в соответствии с направлением и профилем подготовки
ОПК(У)-4	Готовность к использованию методов математического моделирования материалов и технологических процессов, к теоретическому анализу и экспериментальной проверке теоретических гипотез
ОПК(У)-5	Готовность к защите объектов интеллектуальной собственности и коммерциализации прав на объекты интеллектуальной собственности
Профессиональные компетенции	
ПК(У)-1	Способность организовывать самостоятельную и коллективную научно-исследовательскую работу, разрабатывать планы и программы проведения научных исследований и технических разработок, разрабатывать задания для исполнителей
ПК(У)-2	Готовность к поиску, обработке, анализу и систематизации научно-технической информации по теме исследования, выбору методик и средств решения задачи
ПК(У)-3	Способность использовать современные приборы и методики, организовывать проведение экспериментов и испытаний, проводить их обработку и анализировать их результаты
ДПК(У)-1	Готовность к решению профессиональных производственных задач - контролю технологического процесса, технологических нормативов на расход материалов, к выбору оборудования
ДПК(У)-2	Способность строить и использовать математические модели для описания и прогнозирования различных явлений, осуществлять их качественный и количественный анализ
ДПК(У)-3	Способность разрабатывать методические и нормативные документы, техническую документацию
ДПК(У)-4	Готовность к разработке учебно-методической документации для реализации образовательных программ

Школа Инженерная школа природных ресурсов
 Направление подготовки (специальность) 18.04.01 «Химическая технология»
 Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии
 Период выполнения (осенний / весенний семестр 2021 /2022 учебного года)

Форма представления работы:

ВКР магистра
(ВКР бакалавра/ ВКР специалиста/ ВКР магистра)

Студент

**КАЛЕНДАРНЫЙ РЕЙТИНГ-ПЛАН
выполнения выпускной квалификационной работы**

Обучающегося:

Группа	ФИО
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна

Тема работы:

Анализ контрольных точек получения первичного инсулина гларгина в ООО «ГЕРОФАРМ»
--

Срок сдачи студентом выполненной работы:	
--	--

Дата контроля	Название раздела (модуля) / вид работы (исследования)	Максимальный балл раздела (модуля)
02.02.2022	Обзор литературных данных по теме	10
15.03.2022	Выполнение экспериментальной части	10
30.04.2022	Анализ, обобщение и оценка результатов	10
01.05.2022	Подведение итогов и формирование выводов	10
30.05.2022	Разработка разделов «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение», «Социальная ответственность» и раздела ВКР на иностранном языке	10
05.06.2022	Оформление ВКР	10
17.06.2022	Представление ВКР	40

СОСТАВИЛ:

Руководитель ВКР

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Чернова Анна Павловна	к.х.н.		

СОГЛАСОВАНО:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Михеева Елена Валентиновна	к.х.н.		

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
 федеральное государственное автономное
 образовательное учреждение высшего образования
 «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (ТПУ)

Школа Инженерная школа природных ресурсов
 Направление подготовки (специальность) 18.04.01 «Химическая технология»
 Отделение школы (НОЦ) Отделение химической инженерии

УТВЕРЖДАЮ:
 Руководитель ООП

 (Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

магистерской диссертации (бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)
--

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна

Тема работы:

Анализ контрольных точек получения первичного инсулина гларгина в ООО «ГЕРОФАРМ»
Утверждена приказом директора (дата, номер)

Срок сдачи студентом выполненной работы:	
--	--

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе	Объектом исследования является инсулин гларгин – аналог инсулина длительного действия. Предметы исследования: – контрольные точки стадий получения первичного инсулин гларгина этапа апстрим; – контрольные точки стадий получения первичного инсулин гларгина этапа воунстрим;
---------------------------------	--

Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов	<ol style="list-style-type: none"> 1. проведение литературного обзора по теме магистерской диссертационной работы; 2. описание материалов и методов исследования; 3. анализ, обобщение и оценка полученных экспериментальных данных выполненной работы; 4. оценка финансовой части проекта, его ресурсоэффективности и ресурсосбережения; 5. рассмотрение рисков и опасностей проведения проекта, составление перечня нормативных требований для их регулирования; 6. формулировка выводов и заключения по работе; 7. подготовка раздела на иностранном языке.
Перечень графического материала	Графическое представление полученных результатов исследования.
Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы	
Раздел	Консультант
Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	Былкова Татьяна Васильевна
Социальная ответственность	Сечин Андрей Александрович
Раздел на иностранном языке	Коротченко Татьяна Валериевна

Дата выдачи задания для выполнения выпускной квалификационной работы по линейному графику	
--	--

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Чернова Анна Павловна	К.Х.Н		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна

Школа	Инженерная школа природных ресурсов	Отделение (НОЦ)	Отделение химической инженерии
Уровень образования	магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Анализ контрольных точек получения первичного инсулин гларгина в ООО «ГЕРОФАРМ»	
Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:	
1. Стоимость ресурсов НТИ: материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих	Стоимость выполняемых работ, материальных ресурсов в соответствии с применяемой техникой, технологиями и рыночными ценами; оклады в соответствии с окладами сотрудников организации.
2. Нормы и нормативы расходования ресурсов	Районный коэффициент равен 1,3; коэффициент доплат – 0,5; накладных расходов – 16 %
3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования	Ставка по отчислениям во внебюджетные фонды составляет 30,2 %
Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:	
1. Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ	Провести предпроектный анализ.
2. Разработка устава научно-технического проекта	Разработать Устав научного проекта магистерской работы
3. Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски и организация закупок	Составить план управления НТИ
4. Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности	Провести оценку сравнительной эффективности проекта.
Перечень графического материала:	
Оценочная карта сравнения конкурентных разработок; матрица SWOT; бланк оценки степени готовности проекта; иерархическая структура работ; календарный план-график проведения НИОКР; организационная структура проекта и матрица ответственности	

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	15.02.2022
---	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОСГН	Былкова Татьяна Васильевна	к.э.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна		

ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА «СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна

Школа	Инженерная школа природных ресурсов	Отделение (НОЦ)	Отделение химической инженерии
Уровень образования	магистратура	Направление/специальность	18.04.01 Химическая технология

Тема ВКР:

Анализ контрольных точек получения первичного инсулин гларгина в ООО «ГЕРОФАРМ»

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

<p>Введение</p> <ul style="list-style-type: none"> – характеристика объекта исследования (вещество, материал) и области его применения; – описание рабочей зоны (рабочего места) при эксплуатации. 	<p>Объект исследования: аналог человеческого инсулина длительного действия – инсулин гларгин.</p> <p>Область применения: биотехнологическая, фармацевтическая промышленность.</p> <p>Рабочая зона: лаборатория научно-исследовательского отдела ООО «ГЕРОФАРМ»</p> <p>Количество и наименование оборудования рабочей зоны: хроматограф жидкостный с спектрофотометрическим детектором (2), УФ-спектрофотометр (1), весы аналитические с точностью взвешивания $\pm 0,0002$ г (1), рН метр с точностью $\pm 0,02$ рН (1), мешалка магнитная с нагревом (1), шкаф вытяжной (1), термстат (1), камера для вертикального электрофореза с прилагающим источником питания (1), система подготовки воды очищенной (1).</p> <p>Рабочие процессы, связанные с объектом исследования, осуществляющиеся в рабочей зоне: выделение и очистка гибридного белка до получения первичного инсулин гларгина.</p>
---	--

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<p>1. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности при эксплуатации:</p> <ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны. 	<ul style="list-style-type: none"> – трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (ред. от 25.02.2022); – Федеральный закон №184-ФЗ от 27.12.2002 «О техническом регулировании» (ред. от 02.07.2021); – Федеральный закон № 426 от 28.12.2013 «О специальной оценке условий труда» (ред. от 30.12.2020); – ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности; – ГОСТ 12.2.033-78 ССБТ. Рабочее место при выполнении работ стоя. Общие эргономические требования;
---	---

	– ПНД Ф 12.13.1-03 от 04.09.2003 «Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения)».
2. Производственная безопасность при эксплуатации: – анализ выявленных вредных и опасных производственных факторов; – расчет уровня опасного или вредного производственного фактора.	Вредные производственные факторы: – параметры микроклимата, не соответствующие нормативным требованиям; – недостаток или отсутствие света рабочей зоны; – высокий уровень локальной вибрации; – повышенный уровень шума. Опасные производственные факторы: – опасность поражения током от токоведущих частей электрического оборудования; – реактивы 2 и 4 классов опасности; – легковоспламеняющиеся жидкости. Средства защиты: костюм для персонала чистых помещений классов 8 ISO и ниже или лабораторный халат, перчатки технические кислотоустойчивые, очки защитные, респиратор, вентиляция, знаки и символы опасности. Расчет: система искусственного освещения.
3. Экологическая безопасность при эксплуатации	Воздействие на селитебную зону: отсутствует. Воздействие на литосферу: жидкие отходы (сливы), содержащие вредные и ядовитые вещества; твёрдые отходы расходного материала (расходники). Воздействие на гидросферу: жидкие отходы органической и не органической природы. Воздействие на атмосферу: вещества, способные попадать в воздух через вентиляционную систему рабочей зоны.
4. Безопасность в чрезвычайных ситуациях при эксплуатации:	Возможные ЧС: возгорания, пожары, взрыв при работе с электрооборудованием и взрывоопасными веществами; проливы опасных химических веществ, аварии систем электроэнергетики, а также ЧС природного и биолого-социального характера. Наиболее типичная ЧС: проливы опасных химических веществ.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	15.02.2022
---	------------

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ООД	Сечин Андрей Александрович	к.т.н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна		

РЕФЕРАТ

Выпускная магистерская диссертация содержит 165 страницы, 33 рисунка, 42 таблицы и 97 источников литературы.

Ключевые слова: инсулиновые биоаналоги, инсулин гларгин, downstream process, upstream process, технология рекомбинантного белка.

В качестве объекта исследования выступает инсулин гларгин – аналог инсулина длительного действия.

Цель работы – провести анализ контрольных точек получения первичного инсулин гларгина на этапах апстим и даунстрим процессов для разработки модуля 3 «Качество» раздела «3.2.S.2.6 Разработка производственного процесса» Общего Технического документа.

В рамках магистерской диссертационной работы были изучены и оптимизированы параметры процессов на стадиях подготовки питательных сред и добавок, выращивания посевных культур и их культивирования, а также на этапе наращивания продуцента и биосинтеза гибридного белка. Подобраны оптимальные диапазоны температур, значений рН растворов, оптической плотности и пр.

Путем исследования процессов солюбилизации и ренатурации были найдены наиболее благоприятные условия денатурации нерастворимых агрегатов целевого белка, а именно концентрация хаотропного агента и восстановителя, рН раствора и время контакта белок/денатурирующий буфер, а также условия, способствующие продуктивной укладке целевого белка, к которым относится: концентрация окислительно-восстановительной пары, значения рН раствора, температура и длительность протекания процесса. Определили наиболее подходящий метод концентрирования и условия ферментативной конвенции.

В ходе выполнения работы были подобраны оптимальные значения параметров на стадиях получения первичного инсулин гларгина этапов апстим и даунстрим по технологии рекомбинантной ДНК.

Степень внедрения:

Аликова В.Д., Герасимова Т.С., Гусаров Д.А., Чернова А.П. Исследование оптимальных условий солюбилизации гибридного белка гларгин-инсулина из культуры *Escherichia coli* // Химия и Химическая технология в XXI веке: Материалы XXIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера. В 2 томах. Том 1 (г. Томск, 16–19 мая 2022 г.). / Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2022 – 414 с.

Область применения: ООО «ГЕРОФАРМ», производители отечественных биохимических препаратов по принципу полного цикла; научно-исследовательские лаборатории и R&D-центры, исследовательские работы со схожей тематикой.

Магистерская работа выполнена в лаборатории научно-исследовательского отдела ООО «ГЕРОФАРМ».

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	15
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	18
1.1. Статистические данные по заболеваемости диабетом.....	18
1.2 История инсулина, значение и основная структура.....	20
1.3 Особенности инсулин гларгина.....	23
1.4 Нормативные требования и законодательство для биоаналогов.....	24
1.5 Производство рекомбинантного человеческого инсулина и аналогов инсулина.....	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1 Характеристика объекта исследования.....	30
2.2 Методика контроля рабочей посевной культуры штамма-продуцента.....	30
2.3 Методика определение подлинности, родственных примесей и чистоты электрофоретическим методом.....	35
2.4 Методика определение содержания гибридного белка методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	42
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	44
3.1 Анализ контрольных точек USP.....	45
3.2 Анализ контрольных точек DSP.....	74
4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ.....	93
4.1 Предпроектный анализ.....	94
4.2 Инициация проекта.....	101
4.3 Планирование управления научно-техническим проектом.....	103
4.4 Оценка сравнительной эффективности исследовательской работы.....	116
5 СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ.....	119
5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности.....	120
5.2 Производственная безопасность.....	124
5.3 Экологическая безопасность.....	136

5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях.....	139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	141
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СТУДЕНТА.....	144
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	145
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	155

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

BSI – N,N'-метилен-бис-акриламид;

CQA — критические атрибуты качества;

CTD – Общий технический документ;

E.coli – кишечная палочка (*escherichia coli*);

EMA – европейское агентство лекарственных средств;

ICH – Международная конференция по гармонизации;

IDF – International Diabetes Federation;

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration);

pI – изоэлектрическая точка;

AA – акриламид;

БК – биологическая концентрация, количество жизнеспособных клеток в 1 см³, КОЕ/см³;

ВДИ – вода для инъекций;

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДСН – додецилсульфат натрия;

ДТТ – дитиотреитол;

ГПК – главная посевная культура;

КОЕ – показатель количества образующих колонии бактерий в 1 см³ среды;

ООН – организация объединенных наций;

ОП₅₄₀ – значение оптической плотности образца при длине волны 540 нм;

ОТ – охрана труда;

ОФС – общая фармакопейная статья;

ПМФ – посторонняя микрофлора;

ПС – питательная среда;

ПС LB – питательная среда Лурия-Бертани;

ПТП – протокол технологического процесса;
ПСА – персульфат аммония;
РПК – рабочая посевная культура;
СД – сахарный диабет;
СИЗ - средства индивидуальной защиты;
СОП - стандартная операционная процедура;
СИЗ – средства индивидуальной защиты;
ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин;
УФ (UV) – ультрафиолет (ultra violet)

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день более 420 миллионов людей живут с диабетом, а к 2030 году, как ожидают, число больных возрастет до 578 миллионов. Хотя с открытия инсулина прошло более ста лет, половина людей с диабетом 2 типа до сих пор не имеют регулярного доступа к нему для поддержания лекарственной терапии. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в период с 2000 по 2016 годы преждевременная смертность от диабета увеличилась на 5 %, в то время как преждевременная смертность от всех других основных неинфекционных заболеваний снизилась. Кроме того, как показали исследования [82], люди, живущие с диабетом, имеют более высокий риск серьезно заболеть и умереть от COVID-19 (COronaVirus Diseases).

В апреле 2021 года ВОЗ объявила о глобальной инициативе, направленной на устойчивое улучшение профилактики и лечения диабета с особым акцентом на поддержку стран с низким и средним уровнем дохода. Соглашение объединяет национальные правительства, международную организацию объединенных наций (ООН), неправительственные организации и организации частного сектора, высшие учебные заведения и академические институты, благотворительные организации, людей с диабетом и международных доноров для разработки общего видения снижения риска диабета и обеспечения доступа для всех людей с диабетом к качественному лечению и услугам по уходу.

Резолюция, принятая на сегодняшний день Всемирной ассамблеей здравоохранения, призывает государства-члены повысить приоритетность профилактики, диагностики и борьбы с диабетом. Доступность биоаналогов инсулина может дать преимущества, которые позволят снизить затраты на лечение, расширить доступ к инсулину и вариантам лечения.

В настоящее время производители инсулиновых лекарств все чаще выходят за пределы своей страны, выполняя поставки лекарств разных форм выпуска иностранным потребителям. Люди с сахарным диабетом во всех

странах имеют одинаковые потребности в эффективности и безопасности лекарственных средств, поэтому содействие сближению и гармонизации нормативных требований к инсулину и другим лекарственным средствам и товарам медицинского назначения для лечения больных диабетом является одним из важнейших решений по обеспечению инсулиновыми биоаналогами нуждающихся по всему миру.

Международная конференция по гармонизации (ICH) разработала формат подачи нормативных документов CTD (Common Technical Document) в сотрудничестве с Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) и Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения. Соглашение в рамках ICH по Общему техническому документу стало важным шагом при стандартизации и упрощении процесса подачи заявки в соответствующий региональный регулирующий орган страны-партнера.

Общеизвестно, что одной из целей при разработке лекарственного продукта является демонстрация качества, безопасности и эффективности. Во время разработки продукта безопасность лекарственного препарата (т. е. отсутствие или сведение к минимуму нежелательных явлений, вызванных продуктом) и эффективность (т. е. способность продукта вызывать желаемый терапевтический ответ) рассматриваются в доклинических исследованиях и клинических испытаниях, отчеты по которым предоставляются в Общем техническом документе в модулях 4 и 5 соответственно. В то же время качество лекарственного средства демонстрируется посредством разработки определенного и контролируемого производственного процесса и связанных с ним аналитических процедур и процедур тестирования стабильности. Результатом этих мероприятий по повышению качества лекарственных средств можно считать спецификацию, определяемую набором характеристик, которые коррелируют с безопасным и эффективным лекарственным препаратом на выходе. В соответствии с этой нормативно-

правовой концепцией характеристики полупродуктов, продуктов и параметров процесса их получения служат критическими атрибутами качества лекарственного препарата.

Таким образом, целью выпускной магистерской диссертации является проведение анализа контрольных точек получения первичного инсулин гларгина на этапах upstream и downstream для разработки модуля 3 «Качество» раздела «3.2.S.2.6 Разработка производственного процесса» Общего Технического документа.

Для достижения поставленной цели необходимо было выполнить ряд задач:

- 1) изучить технологию и нормативную документацию производства рекомбинантных белков;
- 2) исследовать контрольные точки апстрим и даунстрим процессов, влияющие на качество продукта;
- 3) определить оптимальные параметры для синтеза и выделения гибридного белка;
- 4) оптимизировать процесс получения правильно свернутого гибридного белка;
- 5) обосновать критерии получения первичного инсулин гларгина;
- 6) предоставить полученные данные для написания модуля 3 «Качество» Общего технического документа.

Практическая значимость

Данные этапа разработки лекарственного средства будут представлены в регистрационном досье инсулин гларгина, представляемом в регулирующие органы зарубежных партнеров.

Результаты были представлены на XXIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера (г. Томск, 16–19 мая 2022 г.) и опубликованы в 1 томе сборника материалов (.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Статистические данные по заболеваемости диабетом

Сахарный диабет (СД) является серьезным эндокринным заболеванием, представляющим для здоровья общества глобальную медико-социальную угрозу, темпы роста распространенности которой приобретают масштаб мировой эпидемии [1]. По данным IDF (International Diabetes Federation) во всем мире насчитывается более трехсот пятидесяти миллионов людей больных сахарным диабетом [2], еще у двухсот восьмидесяти миллионов нарушена толерантность к глюкозе (нарушение метаболизма углеводов). При этом не учитываются больные, которые не знают о наличии у них СД, а их, как показывает практика, в 3-4 раза больше тех, у кого болезнь была диагностирована.

Согласно исследованиям, опубликованным в 1990-х годах, ожидаемая продолжительность жизни людей с диабетом обычно на 7,5 лет меньше, чем у людей, не страдающих диабетом [3]. На данный момент примерно два процента населения Земли страдают от данного вида заболевания, при этом количество больных, подверженных СД, неуклонно возрастает год от года в среднем на 2-6 % [4].

При сахарном диабете происходит нарушение обмена веществ, сопровождающееся чрезмерно повышенным уровнем глюкозы в крови. Под сахарным диабетом первого типа (СД 1) подразумевают группу заболеваний, которые развиваются вследствие прогрессирующего разрушения бета-клеток поджелудочной железы, что приводит к дефициту синтеза проинсулина и гипергликемии. Сахарный диабет второго типа (СД 2) относится к заболеванию, развивающемуся у лиц с избыточным накоплением жировой ткани, имеющих инсулинорезистентность, из-за чего наблюдается избыточный синтез проинсулина, инсулина и амилина бета-клетками поджелудочной железы [5].

Подавляющее большинство случаев диабета в детском возрасте представляет собой диабет 1 типа, на который приходится более 90% всех случаев, и его заболеваемость сильно различается между разными странами, внутри стран и между разными этническими группами населения [8]. Во всем мире заболеваемость диабетом СД1 увеличивается примерно на 3–5% в год [9]. Однако темпы роста и временные тенденции различны, и недавно в некоторых странах было зарегистрировано замедление роста заболеваемости диабета данного типа.

В случае СД 1 поддержание базального уровня глюкозы становится задачей заместительной гормональной терапии. Для предотвращения критического гликемического уровня в крови, больной вынужден неоднократно в течение дня принимать препараты инсулина [6]. В основном подобная терапия заключается в назначении пациенту пролонгированного инсулина для снижения уровня сахара до базальных значений, а также периодических инъекций (чаще всего после каждого приема пищи) быстродействующих препаратов инсулина во избежание гипергликемии. Гормон вводится подкожно с помощью инсулинового шприца, шприц-ручки или специальной помпы-дозатора. В отсутствие должного лечения СД 1 быстро развивается и приводит к возникновению тяжёлых осложнений, таких как кетоацидоз и диабетическая кома [7].

Рост заболеваемости и распространенности диабета 2 типа наблюдается с начала 1990-х годов, что составляет значительную долю случаев диабета у молодых людей в определенных группах риска [10]. Риск развития повышается при избыточном весе/ожирении (60 % людей с диабетом имеют избыточный вес и 20 % страдают ожирением), нездоровом питании, низком уровне физической активности. По годам своего течения заболевание приводит к длительной инвалидности и значительному ухудшению качества жизни. При неуклонно растущем числе больных и высоком риске опасных осложнений сахарный диабет относят к заболеваниям образа жизни. Это одна из наиболее распространенных причин смерти в высокоразвитых странах, и

она признана одной из главных приоритетных задач общественного здравоохранения.

1.2 История инсулина, значение и основная структура

Впервые инсулин как активный компонент был выделен из островковых клеток поджелудочной железы собаки в 1921 году [11], а принадлежность к белковой природе инсулина доказали через пять лет [12]. В первой половине двадцатого века инсулин превратился в самый изучаемый гормон: показали, что инсулин обладает тремя дисульфидными связями, образованными остатками цистеина [13]; получили первые кристаллы гормона [14]; установили полную аминокислотную последовательность [15]; опубликовали рентгеновские снимки трехмерной структуры этого белка [16]. Помимо этого, был детально изучен метаболизм инсулина, в ходе которого биологически активный гормон образуется из одноцепочечного предшественника препроинсулина в островковых клетках поджелудочной железы [17]. Образующаяся в результате ферментативного расщепления предшественника инсулиновая молекула (pI 5,4), представленная на рисунке 1.1, состоит из двух цепей, причем в составе А-цепи 21 аминокислотный остаток, в составе Б-цепи 30 аминокислотных остатков [18]. Обе цепи гормона соединены посредством двух дисульфидных мостиков; также в А-цепи имеется третья, внутримолекулярная дисульфидная связь. А-цепь инсулина образует две антипараллельные α -спирали; в свою очередь в Б-цепи присутствует одна α -спираль и один β -складчатый лист [19].

При низких концентрациях молекула инсулина представлена мономерной формой; тем не менее, в большинстве фармацевтических препаратов гормон образует димер. При повышении концентрации белка и в присутствии катионов цинка три димера инсулина группируются в гексамер [20]. Образование гексамеров гарантирует эффективную упаковку белка в панкреатических везикулах-хранилищах, помогает обеспечивать эффективное

превращение препроинсулина в инсулин и может защитить белок от физических и химических денатураций [21].

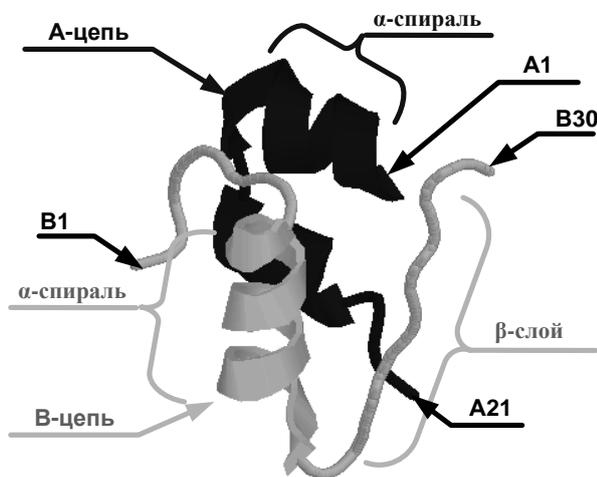


Рисунок 1.1 – Пространственное строение молекулы инсулина

Первый полный химический синтез человеческого инсулина был проведен в 1974 г. Зибером и его сотрудниками [22], где было показано, что он биологически эквивалентен природному гормону [23]. Прорывом, позволившим крупномасштабное производство инсулина человеческого, стало открытие того, что гидролитическую реакцию, выполняемую протеазами, можно обратить вспять, проводя реакцию в смеси воды и органического растворителя, что делает возможным образование пептидных связей [24].

Внедрение технологии рекомбинантной ДНК привело к тому, что к концу 1980-х годов большая часть человеческого инсулина производилась биосинтетически. Рекомбинантный инсулин получали с использованием либо кишечной палочки *Escherichia coli* (*E.coli*), либо дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В первом рекомбинантном человеческом инсулине цепи А и В продуцировались отдельно, а затем объединялись для получения инсулина. Впоследствии он также был получен путем биосинтетического производства

человеческого проинсулина, то есть внутри экспрессирующей клетки, который затем ферментативно превращается в человеческий инсулин [25], [26].

Когда инсулинотерапия получила широкое распространение и была впервые введена в клиническую практику, существовала проблема многократных ежедневных инъекций, поскольку вводимый препарат обладал коротким фармакологическим действием. С самого начала существовало стремление к разработке новых составов инсулина и изучению различных путей его введения.

Известно, что физическое состояние и размер инсулиновых кристаллов влияют на время действия гормона в организме человека [27]. Различные комбинации аморфного и кристаллического инсулинов позволяют получать препараты сверхбыстрого, быстрого, промежуточного и пролонгированного действия. Например, продемонстрировано, что увеличение концентрации цинка, размеров кристаллов инсулина, а также изменение содержания высоко основных полипептидов протаминов в препарате увеличивает длительность сахаропонижающего эффекта, что позволяет получать такие формы инсулина, как инсулин-НПХ среднего времени действия (NPH, neutral protamin Hagedorn; суспензия кристаллического цинк-инсулина в изофановом отношении к протаминным белкам) [28], более длительного действия Ленте и, наконец, Ультраленте, в котором высокая концентрация цинка приводит к сверхдлительному сахаропонижающему эффекту препарата [29].

Однако показано, что протаминовые полипептиды могут быть иммуногенными, и что их использование в медицинских целях может привести к образованию антител [30]. Более того, доказано, что протаминовый комплекс с инсулином сам по себе также вызывает образование антител при длительной терапии НПХ-инсулином [31].

Другим способом пролонгирования эффекта инсулина является использование растворимых форм, лишенных недостатка, связанного с иммуногенностью. Длительность действия такого препарата достигается за

счет того, что раствор инсулина имеет значение рН ниже физиологического. Поэтому после инъекции препарата, инсулин будет осаждаться при повышении рН и впоследствии растворяться.

1.3 Особенности инсулин гларгина

Гларгин представляет собой аналог инсулина пролонгированного действия, выпущенный на фармацевтический рынок компанией Aventis Pharmaceuticals под коммерческим названием «Lantus» [32]. Пролонгирование свойств препарата было достигнуто за счет замены аспарагина А21 на глицин и удлинение В-цепи на два аминокислотных остатка аргинина (рисунок 1.2) [33]. Это привело к тому, что молекула стала образовывать достаточно стабильные гексамеры, а значение изоэлектрической точки белка увеличилось до 6,7 (изоэлектрическая точка человеческого инсулина 5,4), то есть до значения близкому к рН крови.

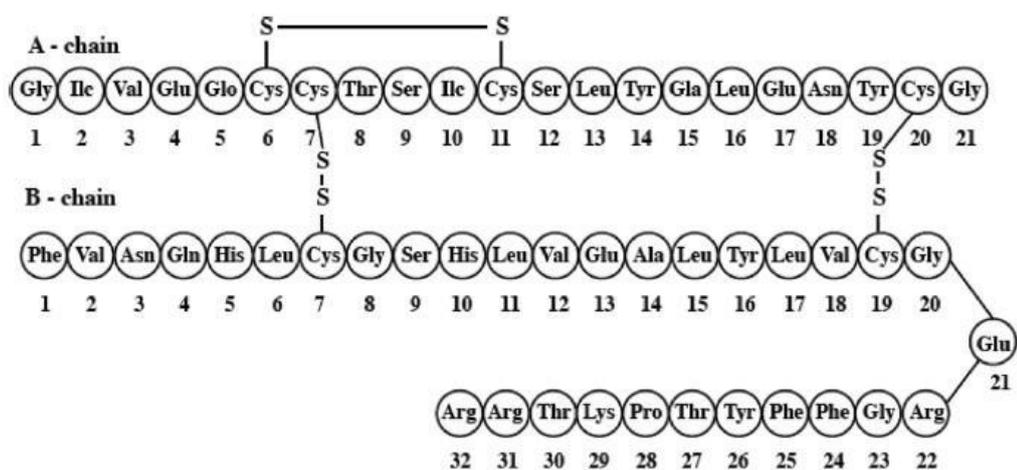


Рисунок 1.2 – Структура инсулина гларгина

Таким образом, для того, чтобы гексамер распался до мономерной формы, проявляющей биологическую активность, требуется время после введения препарата. Однако за счет значений кислотности крови, близких к изоэлектрической точке белка, замедляется абсорбция и как следствие

растворимость препарата снижается. Так же замедлению абсорбции способствует введение в препарат небольшого количества катионов цинка. Он имеет продолжительность действия 24 часа без пика и показывает хороший гликемический контроль, что снижает частоту ночных гипогликемий. Кроме того, дополнительная замена аспарагина B21 на глицин не позволяет протекать реакциям дезамидирования, что обеспечивает возможность длительного хранения препарата в растворе с низким значением pH [34].

Инсулин гларгин был одобрен для использования у пациентов с СД1 и СД2 европейским агентством по оценке лекарственных средств в июне 2000 г и управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США в апреле 2000 [35]. Срок действия патентной защиты инсулина гларгина истек в большинстве стран в 2015 г, а в США срок действия истекает 5 июля 2027 г [36].

1.4 Нормативные требования и законодательство для биоаналогов

Когда срок действия патентов на такой биологический препарат истекает, процесс утверждения биоаналога проходит посредством расширенных исследований физико-химической сопоставимости, на основании которой государственный регулятор разрешает регистрировать препарат. Поэтому от характера этих исследований и подтвержденного качества исследуемого биоаналога зависит его коммерческий успех.

Биофармацевтические препараты представляют собой крупные рекомбинантные белки, например, человеческий инсулин (5,8 кДа), филграстим (18,8 кДа) и ритуксимаб (145 кДа), по сравнению с большинством дженериков, которые обычно намного меньше, например, аспирин (180 Да), омепразол (345 Да). Следовательно, сложность биологического препарата определяется как природой самой молекулы лекарства, так и процессом производства. Производственные протоколы являются собственностью фармацевтической компании-оригинатора, поэтому производители

биосимиляров не могут дублировать процесс производства оригинального препарата. Незначительные изменения в производственных процессах могут изменить биологическую функцию продукта.

Общий технический документ (CTD) является частью программы ICH (Международная конференция по гармонизации) по разработке глобальных согласованных руководств по содержанию и формату заявок на новые лекарственные и биологические продукты, которые должны быть представлены в регулирующие органы в регионах ICH. CTD разделен на пять основных модулей, представленных на рисунке 1.3, три из которых содержат подробную информацию о качестве, безопасности и эффективности. Качество представляет модуль III, который содержит информацию о субстанции и лекарственной форме, разработке и передаче рецептуры, производстве, аналитических методах контроля качества и т. д. Безопасность, в целом, определяет модуль IV, содержащий данные по доклиническим исследованиям специфической фармакологической активности у животных, фармакокинетики и фармакодинамики у животных, острой, подострой и хронической токсичности у животных, мутагенном и аллергизирующем действии и др. А эффективность представлена в модуле V, где содержится информация о всех клинических испытаниях. Модуль II досье включает в себе сводную информацию о модулях III, IV и V, а модуль I представляет собой модуль для конкретной страны. Модуль I содержит заявку на регистрацию, описание упаковки, инструкцию по медицинскому применению и другую информацию, специфичную для каждой страны.

Одним из основных модулей общего технического документа, как представлено на рисунке 3, является третий блок «Качество». Модуль 3 CTD четко определен и содержит разделы как о лекарственном веществе (активном ингредиенте), так и о лекарственном продукте, каждый из которых содержит необходимые данные технической информации о лекарственном средстве, процессах и ключевых параметрах, а также различные обоснования, подкрепленные исследованиями.

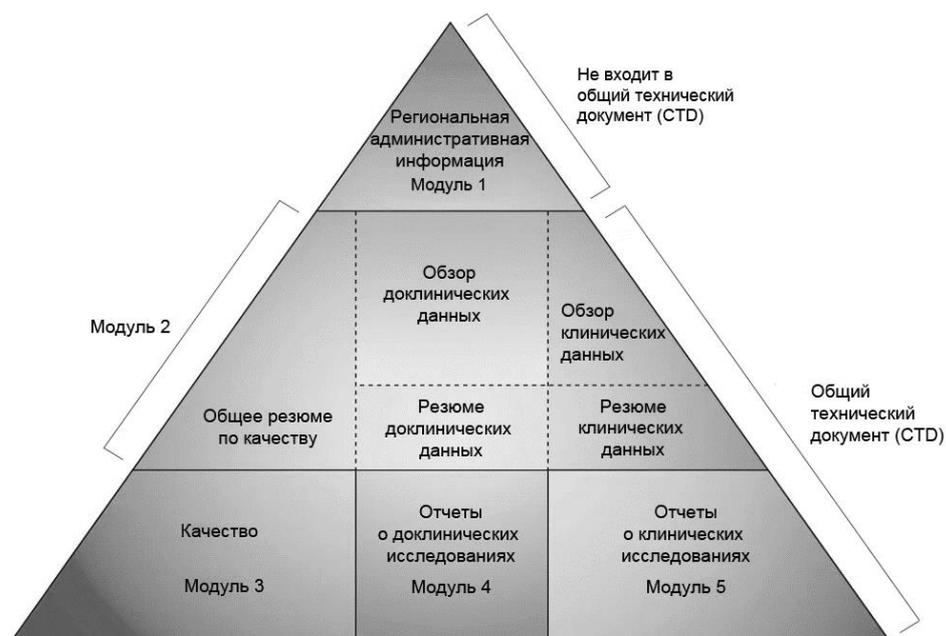


Рисунок 1.3 – Организация и структура общего технического документа

Эти данные и эти отчеты предоставляют подробные доказательства того, что характеристики лекарства четко определены и хорошо контролируются, так что можно гарантировать, что следующая произведенная партия будет по существу такой же, как и предыдущая партия. Контроль за производством лекарственного средства и воспроизводимость являются важным сообщением, которое должен передать модуль 3.

В рамках стратегии контроля необходимо понимать и устанавливать критические элементы процесса, одним из которых является установление и анализ критических параметров процесса (СРР), влияющих на критические атрибуты качества (СQA) в ходе всего производственного цикла.

1.5 Производство рекомбинантного человеческого инсулина и аналогов инсулина

Все этапы производства и очистки человеческого инсулина и аналогов инсулина, таких как инсулин гларгин, потенциально могут привносить вариабельность, которая способно оказывать влияние на биологические и

клинические свойства такого препарата [39]. Технологию производства биофармацевтических препаратов данного типа можно разделить на два основных процесса: «upstream process» (USP) и «downstream process» (DSP) (рисунок 1.4).

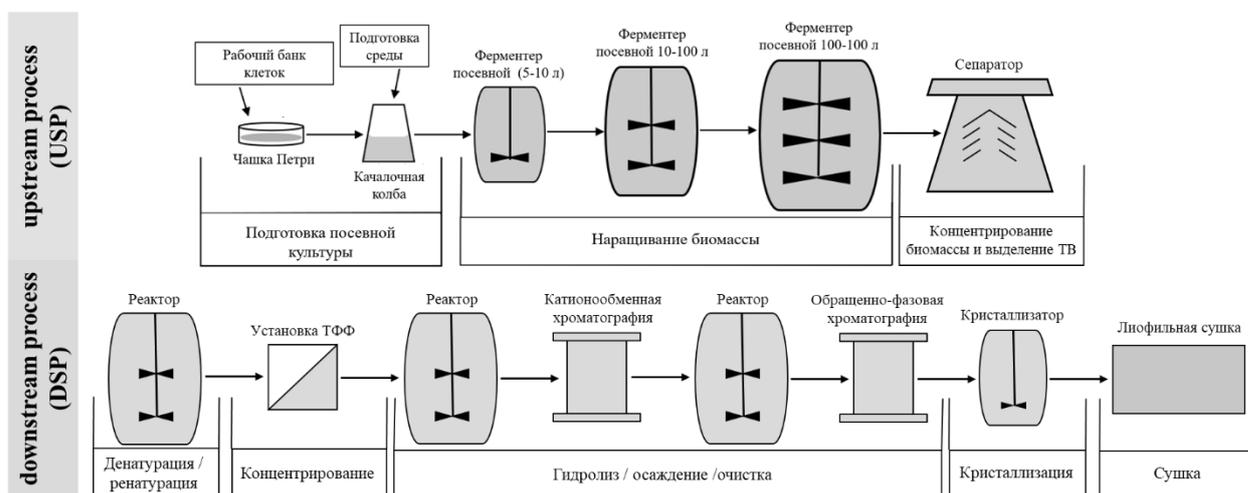


Рисунок 1.4 – Блок-схема технологии производства рекомбинантных белков, иллюстрирующая процессы upstream и downstream

USP (верхний по потоку процесс) определяется как наработка клеточной биомассы, необходимой для производства биофармацевтических препаратов или других биомолекул, и включает в себя выбор клеточной линии, культуральной среды, параметров роста, а также оптимизацию процессов для достижения оптимальных условий роста клеток биофармпроизводства. Основной целью upstream процесса является превращение субстратов в желаемые продукты метаболизма [40]. Это требует хорошо контролируемых условий и предполагает использование крупномасштабных биореакторов. Следует учитывать несколько факторов, таких как тип процесса (периодический, с подпиткой, непрерывный и т. д.), температура, pH и контроль подачи кислорода, стерилизация используемых материалов и оборудования для обеспечения отсутствия загрязняющих микроорганизмов и контаминации.

DSP (нижний по потоку процесс) включает все этапы, необходимые для очистки биологической субстанции от клеточной культуры до конечного очищенного продукта. Он включает несколько этапов очистки целевой биомолекулы и удаления примесей, связанных с клеткой-хозяином (например, белков клетки-хозяина, ДНК и т. д.), примесей, связанных с процессом (например, буферов, выщелоченных лигандов, пеногасителя и т. д.) и примесей, связанных с продуктом (например, агрегаты, фрагменты, обрезанные частицы и т. д.).

На каждом этапе очистки можно удалить один или несколько классов примесей. Последующая обработка обычно включает три основных этапа, а именно:

- 1) начальное извлечение (экстракция или выделение);
- 2) очистка (удаление большинства загрязнителей);
- 3) полировка (удаление определенных загрязнителей и нежелательных форм целевой биомолекулы, которые могут образоваться при выделении и очистке).

Начальное извлечение включает отделение клеток от супернатанта (осветление). Для этого в основном применяют центрифугирование, фильтрацию, осаждение и флокуляцию. Если целевая биомолекула производится внеклеточно, культуральную жидкость подвергают концентрированию (например, ультрафильтрации) с последующей очисткой. Например, секретируемые и растворимые белки в культуральной среде *P.pastoris* могут быть выделены непосредственно центрифугированием. Затем образцы можно сконцентрировать, а целевой белок извлечь из супернатанта с помощью таких процессов, как ультрафильтрация, осаждение или хроматография [41]. Для внутриклеточных биомолекул собранные клетки необходимо подвергнуть разрушению (например, гомогенизации высокого давления, обработке ультразвуком, прохождению через мельницы, прессы и т.д.) с последующим осветлением для удаления клеточного дебриса. Целевую биомолекулу очищают от клеточного гомогената (обычно путем

преципитации и/или хроматографии). В случае, когда белки экспрессируются в виде телец включения (как некоторые рекомбинанты, продуцируемые *E.coli*), требуется дополнительный этап рефолдинга белка. Эти дополнительные этапы в значительной степени способствуют увеличению времени производства и затрат на внутриклеточные биомолекулы.

Эффективное извлечение и очистка биофармацевтических препаратов считается критически важной частью производственного процесса. Процесс очистки должен быть надежным, легко масштабируемым и способным удалять как технологические, так и связанные с продуктом примеси для обеспечения безопасности продукта. Достигнутая чистота, параметры разработки процесса и общий выход целевого белка являются ключевыми моментами, которые необходимо учитывать при последующих процессах.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика объекта исследования

Объектом исследования магистерской диссертации является получаемый инсулин гларгин – аналог инсулина длительного действия.

Местонахождение объекта: Общество с Ограниченной Ответственностью "ГЕРОФАРМ", национальное производство биотехнологических препаратов и дистрибуция лекарственных препаратов с областью специализации, включающей эндокринологию, неврологию, гинекологию, офтальмологию и психиатрию.

Адрес объекта: 142279, Московская область, городской округ Серпухов, рабочий поселок Оболенск, территория "Квартал А", строение 4, корпус 82.

2.2 Методика контроля рабочей посевной культуры штамма-продуцента

Все работы по контролю рабочей посевной культуры проводились с соблюдением правил асептики. Для контроля использовали три криопробирки с рабочей посевной культурой (РПК), выбранные случайно. РПК из каждой выбранной пробирки анализировали независимо по следующим показателям:

- 1) проверка на загрязнение посторонней микрофлорой (ПМФ);
- 2) определение биологическая концентрация, количество жизнеспособных клеток в 1 см^3 , КОЕ/ см^3 (БК);
- 3) проверка на загрязненность литическими бактериофагами.

В подготовленный к работе ламинарный шкаф помещали:

- 21 стерильную пробирку объемом 20 см^3 в штативе;
- колбу со 100 см^3 стерильного раствора 0,85 % хлористого натрия;
- 2 пипетки на 5 см^3 или дозатор на 5 см^3 и наконечники к нему;
- 24 пипетки на 1 см^3 или дозатор на 1 см^3 и наконечники к нему;
- 15 чашек Петри без антибиотика;

- 27 чашек Петри с соответствующим антибиотиком;
- предметные стекла;
- покровные стекла;
- 27 шпателей стерильных.

Готовили три комплекта стерильных пробирок в штативах (по семь пробирок на штатив). Пробирки маркировали следующим образом: N–n, где N — номер криопробирки с РПК, n — степень разведения. В каждую пробирку вносили по 4,5 см³ стерильного раствора 0,85% натрия хлористого.

Из низкотемпературного холодильника брали три криопробирки с РПК, помещали в термостат на (30 ± 1) мин при температуре (35 ± 2) °С до полного оттаивания суспензии. Пробирки нумеровали от 1 до 3. Далее по (0,50±0,01) см³ суспензии количественно переносили из каждой криопробирки в соответствующую подготовленную пробирку (пробирка № N–1) — первое десятикратное разведение РПК.

2.2.1 Проверка РПК на присутствие ПМФ методом микроскопического анализа

Из каждой криопробирки готовили мазки типа «раздавленная капля» и мазки с первым десятикратным разведением РПК по Граму.

Подготовка образцов по типу «раздавленная капля»

На середину предметного стекла накладывали петлю или пипетку с каплей исследуемого материала, ее аккуратно накрывали покровным стеклом, и прижимали фильтровальной бумагой. Капля должна заполнить все пространство между стеклами, не выходя за края стеклянной крышки. На поверхность предметного стекла наносили одну каплю иммерсионного масла. Для получения наибольшей контрастности применяли фазово-контрастную микроскопию.

Подготовка образцов по Граму

Из жидкой культуры каплю материала наносили на предметное стекло и равномерно распределяли ее петлей. Мазку давали высохнуть на воздухе. Далее мазок фиксировали путем нагревания в течение $(2,5 \pm 0,5)$ секунд над верхней частью пламени горелки. На фиксированный мазок накладывали фильтровальную бумагу и наносили (4 ± 1) капли раствора генциан фиолетового. Выдерживали в течение $(1,5 \pm 0,5)$ минуты. Краситель аккуратно смывали водой очищенной, на мазок наносили 1 см^3 раствора Люголя и выдерживали $(1,5 \pm 0,5)$ минуты. После раствор Люголя смывали, предметное стекло с материалом погружали в стакан с 96 % этиловым спиртом и, периодически покачивая стекло, образец отмывали в течение одной минуты. Отмытый мазок ополаскивали водой очищенной и докрашивали в течение $(1 \pm 0,2)$ минуты, нанеся на него (4 ± 1) капли раствора фуксина. Далее сливали фуксин со стекла, промывали мазок очищенной водой и осушали от остатков воды фильтровальной бумагой. Полученный в ходе вышеперечисленных операций мазок микроскопировали при 100x увеличении под иммерсионным маслом.

После микроскопии, предметные стекла с мазками помещали в емкость с дезинфицирующим средством.

2.2.2 Проверка РПК на присутствие ПМФ методом посева на плотную ПС LB без антибиотика

Из криопробирки на чашку Петри с ПС LB без антибиотика переносили 100 мкл суспензии. Культуру распределяли по поверхности агара стерильным шпателем. Не меняя шпатель, культуру переносили последовательно еще на четыре чашки Петри с ПС LB без антибиотика. Процедуру повторяли для всех суспензий РПК.

Засеянные чашки Петри покрывали пленкой типа Parafilm, помещали в термостат и инкубировали в течение пяти суток при температуре $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$.

По истечении времени чашки Петри с выросшей культурой просматривали на предмет роста колоний нетипичной для *E.coli* формы и цвета.

2.2.3 Определение БК методом посева на плотные среды

Суспензию из каждой пробирки с первым десятикратным разведением раститровывали до 7-го десятикратного разведения методом последовательного переноса 0,5 см³ клеточной суспензии в пробирку с 4,5 см³ стерильного раствора 0,85 % натрия хлористого. Из 5-го, 6-го и 7-го разведений делали высев по 100 мкл суспензии на чашку Петри с агаризованной LB средой с антибиотиком (по три чашки на разведение). Культуру распределяли по поверхности агара стерильным одноразовым шпателем. Засеянные чашки Петри помещали в термостат и инкубировали в течение (21 ± 3) часа при температуре (37 ± 1) °С.

После инкубации проверяли выросшие колонии и проводили их подсчет БК для РПК из каждой выбранной криопробирки по формуле 2.1:

$$\text{БК}_n = \frac{\sum c}{n} \cdot d \cdot 10, \quad (2.1)$$

где БК_n – концентрация жизнеспособных клеток для РПК из отдельной криопробирки, КОЕ/см³; $\sum c$ – количество колоний на всех чашках для данного разведения; n – количество чашек Петри, выбранного разведения; d – коэффициент разведения образца ($1 \cdot 10^5$ при учете результатов пятого разведения и $1 \cdot 10^6$ при учете результатов шестого разведения); 10 – коэффициент, который учитывают пересчета при высевае на чашку в объеме 0,1 см³.

Исходя из полученных данных вычисляли БК для данной серии РПК из трёх выбранных для контроля пробирок по формуле 2.2:

$$\text{БК}_{\text{РПК}} = \frac{\sum M_n}{3}, \quad (2.2)$$

где $BK_{РПК}$ – концентрация жизнеспособных клеток для данной серии РПК, КОЕ/см³; $\sum M_n$ – сумма значений БК для РПК из каждой выбранной криопробирки; 3 – количество криопробирок с РПК, выбранных для контроля.

Затем рассчитать стандартную ошибку полученного среднего значения по формуле 2.3:

$$m_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (2.3)$$

где m_x – ошибка средней; n – количество криопробирок с РПК, выбранных для контроля; σ – среднеквадратическое отклонение, которое рассчитывают по формуле (2.4):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}, \quad (2.4)$$

где $\sum(\bar{x} - x_i)^2$ – сумма квадратов разности значений параметра и среднего арифметического; n – количество криопробирок с РПК, выбранных для контроля.

Вычисленное значение БК для данной серии РПК записывали как ($BK_{РПК} \pm m_x$).

2.2.4 Проверка РПК на загрязненность литическими бактериофагами

Для наращивания биомассы РПК на чашках из каждой выбранной криопробирки с РПК отбирали по 100 мкл суспензии и переносили на чашку Петри с плотной ПС LB без антибиотика. Инкубировали в термостате при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (21 ± 3) часа.

После инкубирования с выросшей на чашках культуры смывали газон 1 см^3 раствора стерильного 0,85 % натрия хлористого, отбирали полученную суспензию и переносили в стерильную пустую пробирку. Измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм (OD_{540}) и разводили стерильным раствором 0,85 % натрия хлористого до достижения оптической плотности $OD_{540} = 4,5$.

В подготовленный к работе ламинарный шкаф помещали:

- 10 стерильных стеклянных пипеток на 1 см³;
- колбу со 100 см³ стерильного раствора 0,85 % хлористого натрия;
- 6 пустых стерильных пробирок объемом 20 см³;
- микробиологическую петлю;
- 12 чашек Петри с плотной ПС LB без антибиотика.

Готовили 3 конических колбы со 100 см³ стерильной плотной ПС LB (с агаром) без антибиотика. Плотную питательную среду LB в 3-х конических колбах объемом (100,0 ± 5,0) мл растапливали на водяной бане, далее охлаждали до (45 ± 1) °С в шейкере-инкубаторе в течение (40 ± 5) мин при скорости качания 180 об/мин.

В колбу с растопленной и охлажденной до (45 ± 1) °С питательной средой LB (с агаром) вносили (1,00 ± 0,05) см³ разведенной бактериальной взвеси. После перемешивания суспензию разливали в 4 чашки Петри с плотной ПС LB без антибиотика. Процедуру повторяли для каждой агаризованной суспензии РПК.

Чашки инкубировали в термостате при температуре (37 ± 1) °С в течение (21 ± 3) часа. После инкубации чашки просматривали в проходящем свете на рост культуры и наличие/отсутствие зон лизиса.

2.3 Методика определение подлинности, родственных примесей и чистоты электрофоретическим методом

Описанный электрофоретический процесс использовали для качественного анализа белка в культуральной жидкости (КЖ) или биомассе, растворе солюбилизата и ренатурата при получении правильно свернутого гибридного белка.

Полиакриламидные гели готовили в виде пластин толщиной 0,75 мм. Между двумя стеклянными пластинами (10×7,5 см) вставляли тетрафторполиэтиленовый шаблон (гребенку) для получения 5, 10 или 14

лунок глубиной в 1 см. Максимально вместимый объем каждой ячейки был от 20 до 50 мкл.

Все гели готовили с додецилсульфатом натрия (SDS). После полимеризации геля пластинку помещали в камеру для электрофореза, гребенку удаляли, в лунки вносили образцы и подавали ток. Электрофоретическая подвижность за счет обработки SDS зависела только от молекулярной массы белка.

После окрашивания белковые компоненты становились видимыми в виде синих полос на геле. Положение полосы образца сравнивали со стандартными калибровочными белками (маркерами) и полосами от контрольных растворов.

2.3.1 Приготовление вспомогательных растворов

Во избежание путаницы все емкости с растворами маркировали в соответствии с верхним названием готовящегося буфера или вещества. Приготовленные растворы хранили при комнатной температуре, если не указано иное, в месте, защищенном от прямых солнечных лучей в течение трех месяцев.

- Электродный буферный раствор (10x)

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ помещали (10,0 ± 0,1) г додецилсульфата натрия, (30,0 ± 0,1) г трис(гидроксиметил)аминометана, (144,0 ± 0,1) г глицина, растворяли в (800,0 ± 50,0) см³ воды для инъекций (ВДИ) и доводили объём раствора тем же растворителем до метки.

Для приготовления рабочего буферного раствора (1x) отбирали 100 см³ электродного буферного раствора (10x), переносили в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводили ВДИ до метки, тщательно перемешивали.

- 30 % раствор акриламида (AA) и 1 % бисакриламида (BIS)

В градуированный химический стакан вместимостью 100 см³ вносили (30,0 ± 0,1) г акриламида, и (1,0 ± 0,02) г N, N'-метилден-бисакриламида,

растворяли в $(80,0 \pm 5,0)$ см³ ВДИ и перемешивали до полного растворения на магнитной мешалке. Доводили объем до 100 см³ ВДИ. Раствор отфильтровывали через фильтр 0,45 мкм. Содержимое переносили во флакон из темного стекла и хранили при температуре от 2 до 8 °С.

Работая с данными реактивами, надевали перчатки, защитные очки, нарукавники и маску. Все работы по приготовлению вели под тягой, поскольку акриламид до его полимеризации является сильным нейротоксином. С готовыми растворами так же работали в средствах защиты рук и глаз.

- 10 % раствор додецилсульфата натрия (SDS)

В мерную колбу вместимостью 100 см³ вносили $(10,0 \pm 0,1)$ г додецилсульфата натрия, растворяли в $(70,0 \pm 5,0)$ см³ ВДИ при аккуратном перемешивании, избегая вспенивания, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и вновь перемешивали.

- 10 % раствор персульфата аммония (ПСА)

В химическую полипропиленовую градуированную пробирку с завинчивающейся пробкой вместимостью 5-10 см³ вносили навеску персульфата аммония $(0,50 \pm 0,02)$ г и растворяли в 5,0 см³ ВДИ. Содержимое пробирки перемешивали встряхиванием. Раствор хранили в закрытой таре при температуре минус (18 ± 1) °С в течение месяца.

- 1,5 М раствор трис-гидрохлорида (Трис-НСl, рН 8,8)

В градуированный стакан вместимостью 100 см³ помещали $(18,16 \pm 0,02)$ г трис(гидроксиметил)аминометана и растворяли в $(80,0 \pm 5,0)$ см³ ВДВ. Доводили рН до значения 8,8 раствором 1 М хлористоводородной кислоты и ВДВ до общего объема 100 см³. Раствор хранили в закрытой таре при температуре от 2 до 8 °С

- 0,5 М буферный раствор трис-гидрохлорида (Трис-НСl, рН 6,8)

В градуированный стакан вместимостью 100 см³ помещали $(7,88 \pm 0,02)$ г трис(гидроксиметил)аминометана и растворяли в $(80,0 \pm 5,0)$ см³ ВДВ. Доводили рН до значения 6,8 раствором 1 М хлористоводородной кислоты и

ВДВ до общего объема 100 см³. Раствор хранили в закрытой таре при температуре от 2 до 8 °С.

- Буфер (4х) для нанесения образцов с восстановителем (БДНв)

В химическом стакане вместимостью 20 см³ количественно вносили 0,926 г дитиотреитола (ДТТ), 1,2 г додецилсульфата натрия, 3,75 см³ 0,5 М Трис-НСl, рН 6,8 и 3 см³ ВДИ. Раствор тщательно перемешивали до полного растворения. Далее добавляли 6 см³ глицерина и 0,5 см³ 0,5 % бромфенолового синего. Объем раствора доводили до 15 см³ ВДИ и еще раз перемешивали. Раствор хранили в закрытой таре при температуре минус (18 ± 1) °С в течение месяца.

- Буфер (4х) для нанесения образцов без восстановления (БДН)

Готовили так же, как и буфер (4х) для образцов с восстановителем только без ДТТ.

- Буфер для выделения образцов (БДВ)

В химический стакан объемом 100 см³ помещали 45 см³ мочевины 9 М, 2,2 см³ моноэтаноламина и 1,54 г ДТТ. Содержимое тщательно перемешивали на магнитной мешалке, после доводили объем до 100 см³ водой для инъекций.

- Красящий раствор Кумасси

В стакан вместимостью 500 см³ вносили 1,25 г красителя Кумасси бриллиантового синего R-250 и растворить в смеси 227 см³ этилового спирта и 227 см³ ВДИ. Содержимое стакана перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения красителя. Добавляли 46 см³ ледяной уксусной кислоты. Содержимое хранили в закрытой таре из темного стекла.

- Раствор для отмывки

В качестве отмывки использовали смесь воды с уксусной кислотой концентрацией 0,5 М в соотношении 1:1. Раствор хранили в закрытой таре в вытяжном шкафу.

2.3.2 Приготовление растворов и заливка полиакриламидного геля

- Разделяющий гель

Для полимеризации разделяющего геля во флакон пенициллиновый объемом 10 см³ вносили реагенты, представленные в таблице 3.1, в указанных объемах.

Таблица 3.1 – Объемные соотношения реагентов для разделяющего геля

Реагент	Концентрация разделяющего геля, %	
	12,5	15
Вода, см ³	2,0330	1,7210
АА 40 %, см ³	1,5630	1,8750
Трис 1,5 М, см ³	1,3000	1,3000
SDS 10 %, см ³	0,0500	0,0500
TEMED, см ³	0,0040	0,0400
ПСА 10 %, см ³	0,0500	0,0500

После добавления всех реагентов раствор аккуратно перемешивали при помощи дозатора на 1000 мкл, не допуская сильного пенообразования и барботажа, и, не меняя наконечника, аккуратно заливали полученный раствор, избегая формирования пузырьков воздуха в толще геля. Раствор вносили до момента, когда до зубцов гребенки оставалось 0,5-1 см (длина зубцов отмечали на стекле заранее). Сверху наслаивали ВДИ, так чтобы она покрыла полностью край геля, и выдерживали в течение 10-15 мин при комнатной температуре.

После окончания полимеризации разделяющего геля воду сливали, а остатки тщательно удаляли фильтровальной бумагой.

- Концентрирующий гель

Для полимеризации концентрирующего геля пенициллиновый флакон объемом 10 см³ вносили реагенты, представленные в таблице 3.2, в указанных объемах.

Таблица 3.2 – Объемные соотношения реагентов для разделяющего геля

Реагент	Концентрирующий гель
Вода, см ³	1,8830
АА 40 %, см ³	0,2500
Трис 0,5 М, см ³	0,3150
SDS 10 %, см ³	0,0250
TEMED, см ³	0,0025
ПСА 10 %, см ³	0,0250

После добавления всех реагентов раствор аккуратно перемешивали при помощи дозатора на 1000 мкл, не допуская сильного пенообразования и барботажа, и, не меняя наконечника, аккуратно наслаивали полученный раствор на застывший разделяющий гель. Осторожно вставляли чистую гребенку в раствор концентрирующего геля так, чтобы избежать образования воздушных пузырей в пространстве между гелем и гребнем. Ждали конца полимеризации 7-10 мин при комнатной температуре.

2.3.3 Приготовление образцов

Образцы культуральной жидкости перемешивали на вортекс-шейкере, отбирали по 2 см³ в пробирку типа эппендорф и центрифугировали при 13,3 тыс.об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливали, к оставшемуся осадку приливали 0,5 см³ БДВ, тщательно перемешивали до полной гомогенизации и выдерживали 20 минут при комнатной температуре. По истечении времени образцы центрифугировали в течение 10 мин при тех же условиях.

Супернатант отбирали, разбавляли ВДИ в 2, 5, 10 или 20 раз и добавляли буфер для нанесения образцов с восстановителем либо без него в соотношении 3 части образца к одной части БДН.

Растворы солюбилизата и ренатурата использовали сразу без предварительной пробоподготовки, разбавляли инъекционной водой и добавляли БДН или БДНв.

2.3.4 Проведение электрофоретического анализа

Пластины с гелем устанавливали в буферную камеру для электрофореза. Между пластинами помещали буфер так, чтобы верхние края карманов были погружены в раствор, аккуратно вытаскивали гребенку из застывшего концентрирующего геля и вносили в карманы исследуемые пробы в объеме от 5 до 10 мкл. В первую лунку внести контроль или белковый маркер с известными молекулярными весами, далее – пробы исследуемых образцов. Доливали электродный буфер до нужного объема, закрывали крышку камеры, соблюдая полярность, и запускали электрофорез с напряжением 70 В при прохождении маркерного красителя концентрирующего геля и 120 В при прохождении разделяющего геля.

Разделение белков наблюдать по движению маркерного красителя (бромфенолового синего).

Когда окрашенная зона доходила до нижнего слоя разделяющего геля, электрофорез останавливали, не допуская вытекания краски в электропроводный буфер. Пластины с гелем вынимали, промывали несколько раз водой очищенной и аккуратно разъединяли стекла с помощью шпателя в объеме воды.

2.3.5 Окрашивание геля

Гель переносили в чашу для фиксации и окрашивания раствором Кумасси. Белки фиксировали (15 ± 5) минут при комнатной температуре или 2 минуты при нагревании. По окончании окрашивания осторожно сливали красящий раствор обратно в колбу с этикеткой «Краситель Кумасси R-250». Окрашенный гель несколько раз промывали водой очищенной, заливали раствором для отмычки и выдерживали (3 ± 2) ч при комнатной температуре или (2 ± 1) ч при предварительном нагревании.

2.4 Методика определение содержания гибридного белка методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), основанный на разделении смесей веществ на хроматографической колонке с последующим исследованием элюата с помощью спектрофотометрического детектора, использовали для качественного и количественного анализа гибридного белка на стадиях денатурации, фолдинга и концентрирования.

2.4.1 Приготовление вспомогательных растворов

Во избежание путаницы все емкости с подвижными фазами для уравнивания и элюирования маркировали. Приготовленные растворы хранили при комнатной температуре в месте, защищенном от прямых солнечных лучей в течение одного месяца.

- Приготовление 0,1 М раствора натрия сульфата

Навеску натрия сульфата весом $(28,40 \pm 0,01)$ г количественно переносили в стеклянный стакан вместимостью 2000 см^3 и растворяли в 1900 см^3 ВДИ. Доводили рН полученного раствора до значения $2,3 \pm 0,1$ (потенциометрически) с помощью 85 % ортофосфорной кислоты. После достижения указанной концентрации ионов водорода довели объем до 2000 см^3 .

- Приготовление подвижной фазы А

В стакан объемом 1000 см^3 помещали 900 см^3 0,1 М раствора натрия сульфата и 100 см^3 ацетонитрила. Полученный раствор перемешивали на магнитной мешалке, фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор $0,45 \text{ мкм}$ и дегазировали.

- Приготовление подвижной фазы Б

Готовили так же, как и фазу А, только смешивали 500 см^3 0,1 М раствора натрия сульфата и 500 см^3 ацетонитрила.

2.4.2 Приготовление испытуемых образцов

Поступающие на анализ образцы центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 12000 об/мин. При необходимости разбавляли 0,01 М раствором HCl.

2.4.3 Проведение анализа

Подготовленную пробу в объеме 1 см³ переносили в пробирку, помещали в термостатируемый автосамплер и инжектировали. Условия хроматографирования приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Хроматографические условия для раствора образца

Колонка	250x4,6 мм, заполненная сорбентом с привитыми октадецильными группами типа Luna (2) — C18, диаметр частиц 5 мкм, диаметр пор 100 Å		
Подвижные фазы	ПФ А: сульфатный буферный раствор рН 2,0 — ацетонитрил для хроматографии — вода для хроматографии (2:1:7) ПФ Б: сульфатный буферный раствор рН 2,0 — ацетонитрил для хроматографии — вода для хроматографии (1:2:2)		
Элюирование	градиентный режим:		
	время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
	0,0	55	45
	17,0	55	45
	19,0	0	100
20,0	0	100	
Скорость потока	1 см ³ /мин		
Температура колонки	40 °С		
Детектор	спектрофотометрический, 214 нм		
Объем пробы	10 мкл		
Температура образцов	15 °С		
Время хроматографирования	20 мин		

Содержание ГБ в испытуемом растворе (X), в %, рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S}{\sum S_i} \cdot 100\% , \quad (2.5)$$

где S – площадь пика ГБ на хроматограмме испытуемого раствора; $\sum S_i$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

4 ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ

Каждому претенденту на государственное или частное бюджетное финансирование необходимо продемонстрировать источникам, что их вложение налоговых денег в научное исследование приносит узнаваемую (для граждан) ценность. Каждый финансовый источник в капиталистическом мире стремится обеспечить доход для себя и своих избирателей (например, налогоплательщиков или акционеров) в течение следующего отчетного цикла (квартальный отчет), приумножить свою прибыль и капитал. В связи с чем в последние двадцать лет в России возросло давление на положительные отчеты по управлению средствами, ресурсоэффективности и ресурсосбережению, без которых шансы на постоянное или увеличенное финансирование быстро уменьшаются.

Технико-экономическое обоснование проекта позволяет учесть многие факторы, включая экономические, технические и календарные соображения, для определения вероятности успешного завершения проекта. В рамках его выполнения руководители проектов должны определить, достаточно ли у них людей, финансовых ресурсов и эффективных соответствующих технологий. Отсюда формирование и реализация подходов ресурсоэффективности и ресурсосбережения на всех уровнях управления являются главными задачами стратегического менеджмента, а оценка коммерческой ценности разработки является главным условием при поиске источников финансирования для проведения научного исследования и коммерциализации его результатов.

Таким образом, целью раздела является определение перспектив по проведению научно-исследовательских работ, обоснование целесообразности разработки проекта, а также его конкурентоспособности и материалоемкости в соответствии с современными требованиями в данной сфере.

4.1 Предпроектный анализ

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Магистерская диссертационная работа направлена на проведение анализа контрольных точек и подбор оптимальных условий получения первичного инсулин гларгина на этапах апстримма и начальных стадиях даунстрим процессов.

Сахарный диабет входит в число самых распространенных в мире хронических заболеваний, и в последнее время эта болезнь стала изучаться как социальная проблема, становящаяся все более актуальной. Абсолютное количество больных СД в мире к 2019 году составляло 463 млн человек, в России это около 8,3 миллиона, то есть 6,1% от всего населения страны. В связи с постоянным увеличением числа больных являющихся потенциальными потребителями биотехнологического препарата, в настоящее время разрабатываются новые методы более эффективного производства и применения инсулина и его биоаналогов.

Инсулин гларгин представляет собой форму инсулина длительного действия, используемую для лечения гипергликемии, вызванной диабетом 1 и 2 типа. Компания «Герофарм» специализируется на выпуске отечественных инсулинов, который на сегодняшний день занимают 20% рынка лекарственных средств. Производство отечественных лекарств осуществляется по принципу полного цикла: от изготовления субстанции до выпуска готового продукта на рынок. Помимо производства, компания ведет самостоятельные научные исследования, направленные на оптимизацию и усовершенствование имеющихся технологий.

Детальный анализ всех этапов биотехнологического производства и обзор конкурирующих технологических разработок дает возможность оценить эффективность данного проекта и определить рациональность

применения мероприятий по оптимизации стадий получения первичного инсулин гларгина.

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений

На сегодняшний день существуют разные способы получения инсулиновых белков, основанных на технологии рекомбинантной ДНК. Для анализа с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбележения рассмотрим типовой и оптимизированный методы получения первичного инсулина гларгина.

Наглядно представить сравнительную характеристику двух способов помогает оценочная карта, представленная в таблице 4.1, в которой приведены баллы экспертной оценки оптимизированных контрольных точек производства (B_o), разработанных в данной работе, типовых (B_r), применяемых при получении инсулиновых биоаналогов, а также конкурентоспособность соответствующих объектов – K_ϕ , K_k .

Позицию разработки и ее конкурентов оценивали по каждому показателю экспертным путем по пятибалльной шкале, где 1 – наиболее слабая позиция, а 5 – наиболее сильная. Анализ конкурентных технических решений определяли по формуле 4.1:

$$K = \sum V_i \cdot B_i \quad (4.1)$$

где K – конкурентоспособность научной разработки или конкурента; V_i – вес показателя (в долях единицы); B_i – балл i -го показателя.

Таблица 4.1 – Оценочная карта сравнения конкурентных разработок

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы		Конкурентоспособность	
		B_o	B_r	K_o	K_r
1	2	3	4	6	7
Технические критерии оценки ресурсоэффективности					
1. Простота эксплуатации	0,1	2	2	0,2	0,2

Продолжение таблицы 4.1

1	2	3	4	6	7
2. Точность	0,2	4	3	0,8	0,6
3. Надежность	0,1	4	4	0,4	0,4
4. Воспроизводимость	0,2	5	4	1	0,8
Экономические критерии оценки эффективности					
1. Цена	0,2	3	3	0,6	0,6
2. Затраты на реактивы	0,1	5	4	0,5	0,4
3. Затраты на оборудование	0,1	4	5	0,4	0,4
Итого	1	27	25	3,9	3,5

Подставив полученные значения, получим:

$$K = \frac{K_o}{K_r} = \frac{3,9}{3,5} = 1,1$$

Расчет показал значение больше 1, что говорит о конкурентоспособности научной разработки. Несмотря на большую стоимость оборудования, которую продемонстрировал анализ оценочной карты, оптимизированные контрольные точки процесса являются более точным, что способствует высокому уровню воспроизводимости, в сравнении с типовым, применяемыми при производстве биоаналогов инсулин гларгина.

4.1.3 SWOT-анализ

В данной работе первый этап анализа проводили путем нахождения слабых и сильных сторон проекта, выявляли угрозы и оценивали его потенциал. Результаты представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – первичный SWOT-анализ научно-исследовательской работы

Сильные стороны технологии	Слабые стороны технологии
С1. точность результатов; С2. высокий уровень воспроизводимости; С3. увеличение выходов промежуточных продуктов; С4. уменьшение расходов реактивов; С5. схожесть рутинных операций.	Сл1. более высокая стоимость оборудования; Сл2. увеличение нагрузок на персонал.

Продолжение таблицы 4.2

Возможности	Угрозы
В1. увеличение производительности; В2. увеличение спроса на конечный продукт; В3. перспективы внедрения оптимизированных контрольных точек в другие проекты компании; В4. быстрая регистрация ЛС.	У1. введение дополнительных требований к сертификации продукции; У2. развитие конкурентных технологий производства; У3. узкая направленность.

На втором этапе SWOT-анализа устанавливали степень необходимости проведения изменений, путем построения интерактивных матриц проекта, позволяющих установить комбинации взаимосвязей. Каждый отдельный фактор обозначали знаком «+», в случае если он соответствовал возможностям, или знаком «-», если соответствие было слабое. При наличии сомнений в расстановке знаков ставили «0». Построенные матрицы представлены в таблицах 4.3-4.6.

Таблица 4.3 – Интерактивная матрица сильных сторон и возможностей

Сильные стороны Возможности	С1	С2	С3	С4	С5
В1	+	+	+	+	+
В2	0	+	+	0	-
В3	+	+	+	+	-
В4	+	+	-	-	-

Таблица 4.4 – Интерактивная матрица слабых сторон и возможностей

Слабые стороны Возможности	Сл1	Сл2
В1	+	+
В2	-	+
В3	0	+
В4	-	-

Таблица 4.5 – Интерактивная матрица сильных сторон и угроз проекта

Сильные стороны \ Угрозы	C1	C2	C3	C4	C5
У1	+	+	-	+	-
У2	-	+	+	0	+
У3	-	-	-	-	+

Таблица 4.6 – Интерактивная матрица слабых сторон и угроз проекта

Слабые стороны \ Угрозы	Сл1	Сл2
У1	+	+
У2	-	0
У3	-	-

Объединив результаты интерактивных матриц, получим конечную матрицу SWOT-анализа, представленную в таблице 4.6.

Таблица 4.7 – SWOT-анализ итоговая матрица

	Сильные стороны	Слабые стороны
	С1. точность результатов; С2. высокий уровень воспроизводимости; С3. увеличение выходов промежуточных продуктов; С4. уменьшение расходов реактивов; С5. схожесть рутинных операций.	Сл1. более высокая стоимость оборудования; Сл2. увеличение нагрузок на персонал.
Возможности	СиВ	СЛиВ
В1. увеличение производительности; В2. увеличение спроса на конечный продукт; В3. перспективы внедрения оптимизированных контрольных точек в другие проекты компании; В4. быстрая регистрация ЛС.	При развитии потребительского спроса точность и высокий уровень воспроизводимости с увеличенными выходами полупродуктов позволит нарастить производительную мощность компании, а полученный опыт проекта возможно применить к другим аналогичным проектам.	Более высокая стоимость оборудования, так же как и необходимость в увеличении нагрузок на персонал могут создать трудности по внедрению проекта, однако перспективы по увеличению производительности могут превысить возможные недостатки проекта.

Угрозы	СиУ	СЛиУ
У1. введение дополнительных требований к сертификации продукции; У2. развитие конкурентных технологий производства; У3. узкая направленность.	Высокие показатели воспроизводимости и выхода полупродукта делают проект конкурентоспособным, однако введение дополнительных требований к паспорту продукта может повлечь за собой изменения к требованиям по чистоте и, как следствие, к большому расходу сырьевой базы.	Возможность введения дополнительных требований при регистрации ЛС приведет к увеличению числа анализов и валидаций, выполняемых персоналом, а требования к производственному оборудованию заметно возрастут.

Проанализировав конечную матрицу SWOT-анализа, получим результаты, указывающие на нахождения научной разработки в состоянии оптимального баланс сильных и слабых сторон, возможностей и потенциальных угроз. Расширение направленности проекта, а также усовершенствования в сторону сокращения дорогостоящего оборудования, позволят быстрее внедрить технологию на производство.

4.1.4 Готовность проекта к коммерциализации

Результаты оценки готовности научного проекта и уровня имеющихся знаний у разработчика представлены в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Бланк оценки степени готовности проекта к коммерциализации

№ п/п	Наименование	Степень проработанности проекта	Компетенция разработчика
1	2	3	4
1	Определен имеющийся научно-технический задел	5	4
2	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	4	3
3	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	5	5
4	Определена товарная форма научно-технического задела для представления на рынок	4	4

Продолжение таблицы 4.8

1	2	3	4
5	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	3	3
6	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	2	3
7	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	3	1
8	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	4	4
9	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	2
10	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	4	5
11	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	4	2
12	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	1	1
13	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	4	4
14	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	5	5
15	Проработан механизм реализации научного проекта	4	4
Итого		55	50

Результаты анализа показали степень проработанности в 55 баллов, а компетентность разработчика в 50. Оба значения находятся в диапазоне от 45 до 59, что говорит о уровне перспективности проекта выше среднего. Основным лимитирующим фактором стала проработка вопросов использования услуг инфраструктуры поддержки и получения льгот. Проработка данного критерия, вместе с оценкой интеллектуальной собственности может подвести технологическую разработку к уровню готовности коммерциализации.

Для коммерциализации разработки по анализу контрольных точек и подбору оптимальных условий получения биоаналога инсулина можно использовать инжиниринг или организовать совместное предприятие. В первом случае будет подразумеваться выполнение услуг по разработке модифицированных технологических процессов производства генно-

инженерных белков и их усовершенствованию, а во втором – сотрудничество с компаниями данной направленности для совместного решения задач и расширения рынка сбыта.

4.2 Инициация проекта

Инициация научного проекта подразумевает определение начальных целей разработки, ее основное содержание и финансовые ресурсы. В ходе выполнения выявляют внутренние и внешние заинтересованные стороны, взаимодействующие между собой и влияющие на результат научной разработки. Вся полученная информация отражается в Уставе целостной совокупной модели исследования.

Цели и результат проекта разрабатываются на основании информации о вовлеченных лицах и критериях достижения цели. В таблицах 4.9-4.10 приведена информация по заинтересованным сторонам научной разработки, первоначальным целям проекта и критериям их достижения.

Таблица 4.9 – Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
Научны руководитель НИ ТПУ	Проведение анализа контрольных стадий получения первичного инсулин гларгина для увеличения уровня воспроизводимости и выхода продукта.
Научны руководитель ООО «ГЕРОФАРМ»	
Студент	
Компания ООО «ГЕРОФАРМ» и другие фармацевтические производители	Получение оптимальных условий технологии биоаналога инсулина на этапах апстрима и даунстрима.

Таблица 4.10 – Цели и результаты проекта

1	2
Цели проекта:	проведение анализ контрольных точек получения первичного инсуллин гларгина на этапах апстрим и даунстрим процессов

1	2
Ожидаемые результаты проекта:	анализ контрольных точек показал оптимальные диапазоны выполняемых работ на всех этапах биотехнологического производства рекомбинантного белка; воспроизводимость от серии к серии увеличилась, а выход по продукту увеличился
Критерии приемки результата проекта:	воспроизводимость и качество выходящих полупродуктов
Требования к результату проекта:	близость друг к другу отдельных значений в наработанных сериях; подтверждение качества (чистоты) полупродукта не менее, чем двумя методами

Этап по организационной структуре проекта включает информацию о рабочей группе, роли каждого участника, его функциях и их трудозатратах в проекте. В таблице 4.11 отражены требуемые сведения по сформированному составу.

Таблица 4.11 – Рабочая группа проекта

ФИО, место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудозатраты, часы
Чернова А.П., доцент ОХИ НИ ТПУ	руководители	– координация, контроль над ходом проекта и выполнением поставленных задач;	86
Гусаров Д.А., директор по биотехнологии завода ООО «ГЕРОФАРМ»		– консультации по экспериментальной части; – помощь в подведении итогов научной работы и сопутствующих выводов по ней	130
Аликова В.Д., студент НИ ТПУ	исполнитель	– выполнение экспериментальной части проекта; – анализ и обработка полученных результатов; – формирование разделов по менеджменту и социальной ответственности	1086
Былова Т.В., доцент ОСГН НИ ТПУ	консультант финансового менеджмента	– оценка эффективности разработки	24
Сечин А.А., доцент ООД НИ ТПУ	консультант социальной ответственности	– оценка приведенных факторов воздействия и требований к безопасности	24
Итого			1350

Все проектные работы по фактору трудоемкости рассчитывались на основании данных длительности выполнения разработки (3 месяца), участия руководителей в ней (около 4-х раз в неделю на протяжении 1-го часа) и общей продолжительности рабочего дня (студент работает в среднем 5 дней в неделю по 8 часов).

4.3 Планирование управления научно-техническим проектом

При планировании проекта хорошо иметь наглядное представление в виде последовательных процессов выполняемых работ. Созданная иерархическая структура работ (ИСР), показанная на рисунке 4.1, содержит в себе методичную информацию по проекту разработки критических контрольных точек на разных стадиях получения первичного инсулин гларгина.



Рисунок 4.1 – Иерархическая структура работ проекта

Поскольку в рамках планирование управления научно-техническим проектом необходимо определить ключевые события, была составлена таблица 4.12, в которой указывались даты (временные ограничения) и результаты, которые необходимо было выполнить в заданный промежуток.

Таблица 4.12 – Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат
1	Постановка цели и задач	с 12.01.2022 по 15.01.2022	раздел «Цели и задачи»
2	Обзор имеющихся литературных данных по технологии получения рекомбинантных белков, изучение нормативной документации и СОПов	с 15.01.2022 по 02.02.2022	литературный обзор по теме магистерской диссертации
3	Установление оптимальных диапазонов контрольных точек на этапе выделения гибридного белка	с 01.02.2022 по 15.02.2022	план экспериментальных работ
4	Выполнение экспериментов по оптимизация процессов получения правильно свернутого гибридного белка предшественника	с 15.02.2022 по 28.02.2022	разделы по методам исследования и результатам
5	Подбор оптимального метода концентрирования мономерного предшественника инсулина гларгина	с 01.03.2022 по 15.03.2022	разделы по методам исследования и результатам
6	Выполнение аналитических работ, сбор данных, обоснование критериев получения первичного гларгина	с 15.03.2022 по 30.04.2022	разделы по методам исследования и результатам
7	Обсуждение полученных результатов, подведение итогов и формирование выводов	с 05.04.2022 по 01.05.2022	раздел «Обсуждение результатов»
8	Обоснование конкурентоспособности и материалоемкости проекта, разработка норм и правил безопасности при выполнении работ	с 01.05.2022 по 30.05.2022	разделы по менеджменту и социальной ответственности
9	Составление отчетов и таблиц, оформление магистерской диссертации	с 15.05.2022 по 05.06.2022	выполненная диссертационная работа

При помощи построенной методической структуры и заданных временных ограничений был выполнен календарный план, представленный в таблице 4.13.

Таблица 4.13 – Календарный план проекта

№ п/п	Этапы	Дата начала	Дата окончания	Длительность, дни	Состав участников
1.1	Постановка цели и задач проекта	12.01.22	15.01.22	3	Чернова А.П., Гусаров Д.А., Аликова В.Д.
1.2	Изучение технологий получения белков	15.01.22	01.02.22	17	Аликова В.Д.
1.3	Анализ нормативной документации				Аликова В.Д.
1.4	Исследование методов детектирования				Аликова В.Д.
2.1	Определение оптимальных диапазонов выделения белка	01.02.22	15.02.22	14	Гусаров Д.А., Аликова В.Д.
2.2	Оптимизация процессов получения правильно свернутого белка	15.02.22	28.02.22	13	Аликова В.Д.
2.3	Выбор метода концентрирования первичного белка	01.03.22	15.03.22	14	Аликова В.Д.
2.4	Проведение аналитических работ	15.03.22	10.04.22	26	Аликова В.Д.
3.1	Обоснование критериев получения первичного инсулин гларгина	01.04.22	20.05.22	49	Гусаров Д.А., Аликова В.Д.
3.2	Обсуждение полученных результатов и формулирование выводов	05.04.22	01.05.22	26	Чернова А.П., Гусаров Д.А., Аликова В.Д.
3.3	Составление отчетов и таблиц, оформление магистерской диссертации	01.05.22	05.06.22	35	Чернова А.П., Аликова В.Д., Сечина А.А., Былкова Т.В.,
3.4	Планирование работ по дальнейшей оптимизации	30.05.22	03.06.22	4	Гусаров Д.А., Аликова В.Д.

Календарный план-график (диаграмма Ганта) проекта представлен в таблице 4.14, используется для наглядно иллюстрации плана проекта, на котором работы по теме представляются отрезками разной длины и стилистики, характеризующимися датами начала и окончания выполнения работ.

Для удобства построения графика, длительность каждого из этапов работ из рабочих дней переводят в календарные по формуле:

$$T_{ki} = T_{pi} \cdot k_{\text{кал}}, \quad (4.3)$$

где T_{ki} – продолжительность выполнения i – й работы в календарных днях; T_{pi} – продолжительность выполнения i – й работы в рабочих днях; $k_{\text{кал}}$ – коэффициент календарности.

Коэффициент календарности рассчитывают, как:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}}, \quad (4.4)$$

где $T_{\text{кал}}$ – количество календарных дней в году; $T_{\text{вых}}$ – количество выходных дней в году; $T_{\text{пр}}$ – количество праздничных дней в году.

Подставим числовые значения в формулу (4.3) и получим:

$$k_{\text{кал}} = \frac{T_{\text{кал}}}{T_{\text{кал}} - T_{\text{вых}} - T_{\text{пр}}} = \frac{365}{365 - 118} = 1,48$$

На основе план-графика устанавливали трудозатратность для каждого участника проекта. В календарных днях общее число для руководителя 1 составило 64 дня, для руководителя 2 – 96 дней, для исполнителя – 201 день; для консультантов по СО и ФМ – 35 дней. В пересчете на рабочие дни недели: для руководителя 1 – 43 дня, для руководителя 2 – 65 дней, для исполнителя – 136 дней; для консультантов по СО и ФМ – 24 дня.

Рабочий день исполнителя в среднем имел продолжительность 8 часов. Совместная работа руководителя и исполнителя в среднем составляла 2 часа в день. Отсюда трудозатратность участников проекта составит: для руководителя 1 – 86 часов, для руководителя 2 – 130 часов, для исполнителя – 1086 часов; для консультантов по СО и ФМ – 24 часа.

Таблица 4.14 – Календарный план-график проведения НИОКР

№ п/п	Вид работы	Исполнители	T_{ki} , кал. дн.	Продолжительность выполнения работ															
				январь		февраль			март			апрель			май			июнь	
				2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
1.1	Постановка цели и задач проекта	Чернова А.П., Гусаров Д.А., Аликова В.Д.	4	////															
1.2	Изучение технологий получения белков	Аликова В.Д.	18																
1.3	Анализ нормативной документации	Аликова В.Д.	18																
1.4	Исследование методов детектирования	Аликова В.Д.	18																
2.1	Определение оптимальных диапазонов выделения белка	Гусаров Д.А., Аликова В.Д.	16																
2.2	Оптимизация процессов получения правильно свернутого белка	Аликова В.Д.	14																
2.3	Выбор метода концентрирования первичного белка	Аликова В.Д.	16																
2.4	Проведение аналитических работ	Аликова В.Д.	26																
3.1	Обоснование критериев получения первичного инсулин гларгина	Гусаров Д.А., Аликова В.Д.	51																
3.2	Обсуждение полученных результатов и формулирование выводов	Чернова А.П., Гусаров Д.А., Аликова В.Д.	26																
3.3	Составление отчетов и таблиц, оформление магистерской диссертации	Чернова А.П., Аликова В.Д., Сечина А.А., Былкова Т.В.,	22																
3.4	Планирование работ по дальнейшей оптимизации	Гусаров Д.А., Аликова В.Д.	5																

Научный руководитель 1 Чернова А.П.
 Научный руководитель 2 Гусаров Д.А.
 Магистрант Аликова В.Д.
 * консультант по СО Сечина А.А.
 // // // консультант по ФМ Былкова Т.В.

4.3.1 Бюджет научного исследования

Значения цен на материальные ресурсы устанавливались в соответствии с ценами в online магазинах поставщиков и напрямую у изготовителей. Результаты расчета затрат на сырьевую базу, основного, необходимого для проведения оптимизационных работ, и вспомогательного оборудования, представлены в таблице 4.15.

Таблица 4.15 – Материальные затраты

Наименование	Ед. изм.	N _{рас xi}		Ц _i , тыс.руб		З _м , тыс.руб	
		Исп.1	Исп.2	Исп.1	Исп.2	Исп.1	Исп.2
Хроматографическая система АКТА pilot	шт	х	1	х	10000,0	х	10000,0
Хроматографическая колонка	шт	х	1	х	980,4	х	980,4
Пресс-фильтр Millipore	шт	1	х	200,9	х	200,9	х
Насос	шт	2	х	1500,7	х	3001,4	х
Реактор 1000 л	шт	1	1	3000,2	3000,2	3000,2	3000,2
Магнитная мешалка	шт	2	2	120,6	120,6	241,2	241,2
pH метр	шт	2	2	130,5	130,5	261	261,0
Кондуктометр	шт	1	1	60,8	60,8	60,8	60,8
Кассета для тангенциальной фильтрации	шт	3	х	210,6	х	631,8	х
Сорбент для ВЭЖХ	кг	х	0,8	3000,7	3000,7	х	2400,0
Трис аминокетан	кг	2,5	2,5	6,1	6,1	15,3	15,0
Кислота соляная 35%	л	20,0	20,0	0,8	0,8	16,0	16,0
Мочевина	л	230,0	460,0	0,3	0,3	69,0	138,0
Дитиотреитол	кг	0,1	0,5	87,5	87,5	8,8	43,75
Цистамин дигидрохлорид	кг	1,5	3,0	23,2	23,2	34,8	69,6
Трипсин	г	0,2	0,5	180	180	36	90,0
Моноэтаноламин	кг	0,2	0,2	0,8	0,8	0,16	0,2
Ацетонитрил	кг	3,0	3,0	0,9	0,9	2,7	2,7
Этиловый спирт 95%	кг	1,0	1,0	0,7	0,7	0,7	0,7
Ледяная уксусная кислота	кг	3,0	3,0	0,9	0,9	2,7	2,7
Ортофосфорная кислота 87%	кг	1,0	1,0	0,8	0,8	0,8	0,8
Микропробирки типа эппендорф	уп	0,5	0,5	1,2	1,2	0,6	0,6
Наконечники для дозаторов	уп	0,5	0,5	1,3	1,3	0,65	0,7
Латексные перчатки	уп	1,0	1,0	1,7	1,7	1,7	1,7
Итого						7587,1	17326,8

Расчет амортизационных отчислений на специальное оборудование, которое было приобретено ранее и уже использовалось в заводских условиях, проводили с учетом только дней, затраченных на проведение исследовательских работ по формуле 4.5:

$$A = \frac{C_n \cdot H_a \cdot n}{100 \cdot k}, \quad (4.6)$$

где C_n – первоначальная стоимость оборудования; H_a – норма амортизации, %; n – число проработанных месяцев; k – количество месяцев в году.

Число проработанных месяцев n брали с учетом часов, затраченных на выполнение экспериментальной части: 680 ч = 2,3 месяца. Расчет амортизационных отчислений приведен в таблице 4.16.

Таблица 4.16 – Амортизация оборудования

Наименование оборудования	Стоимость C_n , руб	Количество n , шт	Норма амортизации H_a , %	Амортизация A , руб
Весы ACCULAB	58300	1	8	2027,8
Хроматографическая система Shimadzu	3500000	1	15	228260,9
Дозатор одноканальный объема 1-10 мкл	30000	1	14	1826,1
Дозатор одноканальный объема 10-100 мкл	30000	1	14	1826,1
Дозатор одноканальный объема 100-1000 мкл	38000	1	14	2313,0
УФ-вид спектрофотометр Shimadzu	990000	1	17	73173,9
Итого				309427,8

Основную и дополнительную заработную плату рабочей группы проекта, рассчитывают по следующей формуле:

$$Z_{зп} = Z_{осн} + Z_{доп}, \quad (4.7)$$

где $Z_{осн}$ – основная заработная плата; $Z_{доп}$ – дополнительная заработная плата (12-20 % от $Z_{осн}$).

Основная заработная плата находится по формуле 4.8:

$$Z_{осн} = Z_{дн} \cdot T_{раб}, \quad (4.8)$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата одного работника; $Z_{\text{дн}}$ – среднедневная заработная плата работника, руб; $T_{\text{раб}}$ – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн.

Среднюю заработную плату рассчитывают следующим образом:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_{\text{м}} \cdot M}{F_{\text{д}}}, \quad (4.9)$$

где $Z_{\text{м}}$ – месячный должностной оклад работника, руб.; M – количество месяцев работы без отпуска в течение года: при отпуске в 24 раб. дня $M=11,2$ месяца, 5-дневная неделя; при отпуске в 48 раб. дней $M=10,4$ месяца, 6-дневная неделя; $F_{\text{д}}$ – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн.

Баланс рабочего времени и заработной платы исследовательской группы проекта проводили с учетом работы 5-и человек: научного руководителя 1, научного руководителя 2, магистранта-исполнителя, консультанта по ФИ и консультанта по СО. Полученные данные приведены в таблицах 4.17 и 4.18.

Месячный должностной оклад работника определяют как:

$$Z_{\text{м}} = Z_{\text{тс}} \cdot (1 + k_{\text{пр}} + k_{\text{д}}) \cdot k_{\text{р}}, \quad (4.10)$$

где $Z_{\text{тс}}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.; $k_{\text{пр}}$ – премиальный коэффициент, равный 0,3 (30 % от $Z_{\text{тс}}$); $k_{\text{д}}$ – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2–0,5; $k_{\text{р}}$ – районный коэффициент, равный 1,3 для Томска.

Таблица 4.17 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель		Студент	Консультант по ФМ	Консультант по СО
	1	2			
Календарное число дней	365	365	365	365	365
Количество нерабочих дней (выходные, праздники)	118	118	118	118	118
Потери рабочего времени (отпуск, больничные)	24	24	-	24	24
Действительный годовой фонд	223	223	247	223	223

Таблица 4.18 – Расчет основной заработной платы в рублях

Исполнители	$Z_{тс}$	$k_{пр}$	$k_{д}$	$k_{р}$	$Z_{м}$	$Z_{дн}$	$T_{раб}$	$Z_{осн}$
Руководитель 1	45000,0	0,3	0,5	1,3	105300,0	5288,61	64	338471
Руководитель 2	45000,0	0,3	0,5	1,3	105300,0	5288,61	96	507706,5
Студент	14000,0	0,3	0,5	1,3	32760,0	1485,474	201	298580,2
Консультант по ФМ	35000,0	0,3	0,45	1,3	79625,0	3999,103	35	139968,6
Консультант по СО	22000,0	0,3	0,45	1,3	50050,0	2513,722	35	87980,3

Общая заработная членов группы проекта, с учетом дополнительной ЗП, представлена в таблице 4.19.

Таблица 4.19 – Общая заработная плата

Исполнители	$Z_{осн}$, руб.	$Z_{доп}$, руб.	$Z_{зп}$, руб.
Руководитель 1	338471,0	40616,5	379087,6
Руководитель 2	507706,5	60924,8	568631,3
Студент	298580,2	35829,6	334409,8
Консультант по ФМ	139968,6	16796,2	156764,8
Консультант по СО	87980,3	10557,6	98537,9
Итого	1372707,0	164724,8	1537431,0

Под страховыми отчислениями (внебюджетные фонды), понимают обязательные отчисления по установленным законодательствам Российской Федерации. Они включают в себя пенсионные отчисления – 22 %, социальное страхование – 2,9 %, медицинское страхование – 5,1 % и страхование жизни от несчастного случая – 0,5 %. Для НИ ТПУ, осуществляющего научную и образовательную деятельности, ставка по отчислениям составляет 30,2 %

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из формулы (4.11):

$$Z_{внеб} = k_{внеб} \cdot (Z_{осн} + Z_{доп}), \quad (4.11)$$

где $k_{внеб}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды.

Подставив числовые значения основной заработной платы руководителей проекта, студента и консультантов получим внебюджетные отчисления в размерах, представленных в таблице 4.20.

Таблица 4.20 – Внебюджетные отчисления

Исполнители	$Z_{зп}$, руб	$Z_{внеб}$, руб
Руководитель 1	379087,6	114484,4
Руководитель 2	568631,3	171726,7
Студент	334409,8	100991,8
Консультант по ФМ	156764,8	47343,0
Консультант по СО	98537,9	29758,4
Итого		464304,3

В накладные расходы включают траты на печать и ксерокопирование графических материалов и набранных текстов, оплату услуг связи, электроэнергии и прочее. Их определяется по формуле 4.12:

$$Z_n = k_{нр} \cdot (Z_m + A + Z_{зп} + Z_{внеб}), \quad (4.12)$$

где $k_{нр}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы, который примем равным 16 %.

Отсюда накладные расходы на текущий технологический проект в рублях составят:

$$Z_n = 0,16 \cdot (7587100 + 309427,8 + 1537431,0 + 464304,3) = 1583722,1$$

На альтернативную разработку в рублях:

$$Z_n = 0,16 \cdot (17326800 + 309427,8 + 1537431,0 + 464304,3) = 3142074,1$$

Разница в расходах составляет:

$$3142074,1 - 1583722,1 = 1558352 \text{ (руб)}$$

Для наглядности сводные данные по статьям затрат представлены в таблице 4.21.

Таблица 4.21 – Группировка затрат по статьям

Статьи	Вид работ	
	текущий проект	аналог
материальные затраты, тыс.руб	7587,1	17326,8
затраты на оборудование, руб	309427,8	309427,8
основная заработная плата, руб	1372707,0	1372707,0
дополнительная заработная плата, руб	164724,8	164724,8
внебюджетные отчисления, руб	464304,3	464304,3
накладные расходы, руб	1583722,1	3142074,1
Итого	11481995,7	22780007,7

Проведенный анализ сметы затрат на выполнение исследовательской работы по оптимизации текущих процессов за счет анализа контрольных точек на всех стадиях производства показал, что предложенный вариант получения первичного инсулин глрагина по технологии рекомбинантной ДНК, приведенный в данной магистерской диссертации, с позиции финансовой и ресурсной эффективности является наиболее предпочтительным в сравнении с альтернативным методом, поскольку затраты на разработанную технологию почти в два раза меньше, чем на типовой способ получения полупродукта.

4.3.2 Организационная структура проекта

Для любого проекта необходимо составлять организационную структуру, к которой относят процессы целенаправленных изменений в системе, например, разработку и освоение новых видов продукции и технологических процессов. Организационная структура описанного исследовательского проекта приведена на рисунке 4.2.



Рисунок 4.2 – Организационная структура проекта

Формирование матрицы ответственности помогает распределить ответственность между всеми участниками проекта. Для ее создания каждому члену присуждают соответствующую степень ответственности. Первая степень или ответственное лицо (О) отводится отвечающему за реализацию этапа проекта и контролирующему его ход; вторая степень или исполнительное лицо (И) присуждается выполняющему работы в рамках этапа проекта; третья степень или согласующее лицо (С) – лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов с имеющимися требованиями.

Составленная матрица ответственности представлена в таблице 4.21

Таблица 4.21 – Матрица ответственности

Этапы проекта	Руководитель проекта 1	Руководитель проекта 2	Консультант по ФИ	Консультант по СО	Исполнитель
1	2	3	4	5	6
Введение в тему проекта, составление технического задания	О	О, И	-	-	-
Анализ литературных данных	О	О	-	-	И
Экспериментальная часть	-	О, С	-	-	О, И

Продолжение таблицы 4.21

1	2	3	4	5	6
Подведение итогов, оценка результатов	О, С	О, С	-	-	О, И
Формирование проектной документации	О	-	О, С	О, С	О, И
Планирование дальнейших работ	-	О	-	-	С

Требования к коммуникациям со стороны участников проекта хорошо отражает план управления коммуникациями, представленный в таблице 4.22.

Таблица 4.22– План управления коммуникациями

№ п/п	Вид передаваемой информации	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
1	статус проекта	исполнитель проекта	руководителю проекта 1	ежемесячно
2	сведения о текущем состоянии проекта	исполнитель проекта	руководителю проекта 2	пятница каждой недели
3	документы и отчеты по проекту	исполнитель проекта	руководителю проекта 1; руководителю проекта 2	дважды в месяц
4	замечания и комментарии к работе	руководитель проекта 1; руководитель проекта 2	исполнителю проекта	в течение недели после получения материалов
5	о выполнении всех контрольных точек	исполнитель проекта	руководителю проекта 1	за две недели до назначенной даты защиты проекта

Поскольку при реализации проекта могут возникнуть непредвиденные события с нежелательными последствиями, необходимо учитывать риски для снижения снизить возможных угроз и уменьшая действия неблагоприятных факторов. В таблице 4.23 представлены риски, способные при возникновении невыгодно сказаться на развитии проекта. Вероятность наступления неблагоприятного события или степень его влияния оценивали по пятибалльной шкале, где 5 – наибольшая степень вероятности или наибольшее влияние, а 1 – наименьшая.

Таблица 4.23 – Реестр рисков

Риск	Вероятность наступления (1- 5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска	Условия наступления
технический	3	5	высокий	соблюдение инструкций по эксплуатации, регулярная диагностика	выход из строя оборудования
поставки	3	5	высокий	поиск нескольких альтернативных поставщиков, закупка с запасом	отсутствие сырьевого материала

4.4 Оценка сравнительной эффективности исследовательской работы

Эффективность научно-исследовательской работы оценивают путем расчета интегрального показателя эффективности, связанного с финансовой эффективностью и ресурсоэффективностью.

Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки определяется по формулам 4.13-4.14:

$$I_m^a = \sum_{i=1}^n a_i \cdot b_i^a; \quad I_m^p = \sum_{i=1}^n a_i \cdot b_i^p \quad (4.13-4.14)$$

где I_m – интегральный показатель ресурсоэффективности вариантов; a_i – весовой коэффициент i -го параметра; b_i^a, b_i^p – бальная оценка i -го параметра для аналога и разработки (устанавливается экспертным путем); n – число параметров сравнения.

В случае нескольких вариантов исполнения вначале рассчитывают финансовый показатель разработки:

$$I_{\text{фр}}^{\text{исп } i} = \frac{\Phi_{\text{р}i}}{\Phi_{\text{max}}}, \quad (4.15)$$

где $I_{\text{фр}}^{\text{исп } i}$ – интегральный финансовый показатель разработки; $\Phi_{\text{р}i}$ – стоимость i -го варианта исполнения; Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения технологического проекта (в т.ч. аналогии).

Подставив полученные ранее числовые значения, получим:

$$I_{\text{Фр}}^{\text{исп 1}} = \frac{\Phi_{\text{р1}}}{\Phi_{\text{max}}} = \frac{11481995,7 \text{ руб}}{22780007,7 \text{ руб}} = 0,5 ;$$

$$I_{\text{Фр}}^{\text{исп 2}} = \frac{\Phi_{\text{р2}}}{\Phi_{\text{max}}} = \frac{22780007,7 \text{ руб}}{22780007,7 \text{ руб}} = 1,0 ;$$

Из расчетов видно, финансовый показатель разработки в первом исполнении, равен 0,5, то есть меньше единицы, но больше нуля, что говорит о численном уменьшении затрат оптимизированной технологии по сравнению с аналогом, иначе говоря, разработанный проект обойдется в два раза дешевле нежели аналогичный ему.

Для наглядности сравнительную оценку характеристик вариантов исполнения проекта можно представить в виде таблицы 4.24.

Таблица 4.24 – Сравнительная оценка вариантов исполнения проекта

Критерий \ Объект исследования	Весовой коэффициент параметра	Исп.1	Исп.1
1. увеличение выходов на стадиях	0,25	5	3
2. воспроизводимость результатов	0,25	5	4
3. точность (достоверность)	0,20	4	4
4. уменьшение расходов сырья	0,15	4	3
5. простота исполнения	0,15	3	5
Итого	1	4,35	3,75

Интегральные показатели ресурсоэффективности для каждого варианта исполнения рассчитывали следующим образом:

$$I_{m1} = 0,25 \cdot 5 + 0,25 \cdot 5 + 0,20 \cdot 4 + 0,15 \cdot 4 + 0,15 \cdot 3 = 4,35 ;$$

$$I_{m2} = 0,25 \cdot 3 + 0,25 \cdot 4 + 0,20 \cdot 4 + 0,15 \cdot 3 + 0,15 \cdot 5 = 3,75 ;$$

Интегральный показатель эффективности технологической разработки ($I_{\text{фин.р}}^{\text{р}}$) и аналога ($I_{\text{фин.р}}^{\text{а}}$) определяется на основании интегрального финансового показателя и показателя ресурсоэффективности по формулам 4.16-4.17:

$$I_{\text{фин.р}}^{\text{р}} = \frac{I_{m1}}{I_{\text{Фр}}^{\text{исп 1}}} ; \quad I_{\text{фин.р}}^{\text{а}} = \frac{I_{m2}}{I_{\text{Фр}}^{\text{исп 2}}} \quad (4.16-4.17)$$

Подставив ранее полученные числовые значения получим:

$$I_{\text{фин.р}}^p = \frac{4,35}{0,50} = 8,70 ; \quad I_{\text{фин.р}}^a = \frac{3,75}{1,00} = 3,75$$

Для определения сравнительной эффективности выполним сравнение интегральных показателей эффективности текущего проекта и его аналога:

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{фин.р}}^p}{I_{\text{фин.р}}^a} = \frac{8,70}{3,75} = 2,32 ;$$

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{фин.р}}^a}{I_{\text{фин.р}}^p} = \frac{3,75}{9,88} = 0,43 ;$$

Для наглядности представим сравнение по всем вышерасчитанным показателям эффективности текущей разработки и ее аналога в виде таблицы 4.25.

Таблица 4.25 - Сравнительная эффективность разработки

№	Показатели	Исп.1	Исп.2
1	Интегральный финансовый показатель	0,50	1,00
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности	4,35	3,75
3	Интегральный показатель эффективности	8,70	3,75
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	2,32	0,43

Исходя из результатов оценки сравнительной эффективности технологических методов получения первичного инсулин гларгина, можно сделать вывод о том, что настоящая разработка является более ресурсоэффективной, по сравнению с типовым методом получения инсулиновых биоаналогов.

5 СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

Сущность проекта магистерской диссертационной работы заключается в исследовании оптимальных диапазонов параметров контроля на различных стадиях получения первичного инсулин гларгина. Препараты инсулина гларгина используются для лечения диабета, как 1 типа (состояние, при котором организм не вырабатывает инсулин и, следовательно, не может контролировать количество сахара в крови), так и для лечения людей с диабетом 2 типа (состояние, при котором организм не использует инсулин в обычном режиме и, следовательно, не может контролировать количество сахара в крови). Из данных всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по статистическому информированию известно, что около 422 миллионов человек во всем мире страдают СД, большинство из них проживает в странах с низким и средним уровнем дохода, и ежегодно 1,5 миллиона смертей напрямую связаны с диабетом. Как число случаев, так и распространенность диабета неуклонно растут в течение последних нескольких десятилетий, в связи с чем разработка более эффективного производства и оптимизация методов получения инсулина и его аналогов представляет научный интерес.

В контексте представленного исследования все экспериментальные и аналитические работы проводилась в лаборатории научно-исследовательского отдела ООО «ГЕРОФАРМ». При работе осуществляется контакт с химическими реактивами разного класса опасности. Кроме того, сотрудник отдела подвергается воздействию опасных и вредных факторов, обусловленных работой оборудования и процессами обработки технического оснащения департамента.

В разделе обсуждаются вопросы безопасных условий труда, охраны окружающей среды, а также аспекты безопасности техногенной сферы. Помимо этого, рассматриваются и оцениваются вредные факторы, возникающих при выполнении экспериментальных и аналитических работ, осуществляется разработка мер по уменьшению их вредного воздействия и приводится расчет на примере системы искусственного освещения рабочей зоны.

5.1 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

Основой законодательного обеспечения безопасности является Конституция Российской Федерации, в которой базовой статьёй является статья 37 о свободном труде и о труде в условиях, отвечающих требованиям безопасности и гигиены.

В Трудовом кодексе Российской Федерации устанавливаются права и обязанности работодателей и работников в отношении охраны труда, исполнение которых контролируют специальные государственные органы и инспекции, такие как: прокуратура РФ, Государственный комитет санитарно-эпидемиологического надзора РФ (Госкомсанэпиднадзор России), Федеральная инспекция труда при Министерстве труда РФ (Рострудинспекция) и другие [84].

5.1.1 Специальные правовые нормы трудового законодательства

В соответствии с Федеральным законом от 28.12.2013 N 426-ФЗ (ред. от 30.12.2020) «О специальной оценке условий труда» (с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2021) работники фармацевтических и биотехнологических компаний по степени вредности относятся к 2-ой (допустимой) и 3-ей (вредной) категории подкатегории 1, в которых подразумевается:

- в первом случае уровень воздействия опасных производственных факторов не превышает установленных гигиеническими нормативами норм, а состояние организма восстанавливается во время отдыха или к началу следующего рабочего дня;
- во втором случае условия труда имеют завышающие уровни опасных факторов, установленных нормативами, и относятся к 1-ой степени вредности, которая подразумевает, что после воздействия опасных производственных факторов измененное состояние организма

восстанавливается при более длительном, чем в первом случае, времени, а риск повреждения здоровья увеличивается.

Согласно специальной оценке условий труда для третьего класса вредности первого подкласса предусматриваются [83, 85-87]:

- компенсационные выплаты;
- сокращение числа рабочих часов в неделю до 36. В случае превышения максимально допустимого значения дополнительные часы рассматриваются как сверхурочные и оплачиваются по двойному тарифу;
- семь дней в дополнении к ежегодному оплачиваемому четырехнедельному отпуску;
- добавочные выплаты за негативные факторы в размере 4 % от оклада работника;
- возможность выхода на пенсию ранее установленного федеральным законом N 350-ФЗ от 3 октября 2018 года возраста при условии, если контакт с опасным фактором составляет 80 % времени трудящегося, а стаж на месте более 12 лет;
- медицинские осмотры в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России от 12.04.2011 N 302н (ред. от 18.05.2020);
- предоставление молока и/или молочной продукции;
- страхование жизни и здоровья в соответствии с Федеральным законом «Об обязательном социальном страховании от несчастных случаев на производстве и профессиональных заболеваний» от 24.07.1998;
- средства индивидуальной защиты (СИЗ): спецодежда, обувь, перчатки, респираторы, средства дезинфекции.

Поскольку первый подкласс третьего класса опасности относится к вредным, законодательством запрещено привлечение к труду несовершеннолетних лиц, беременных сотрудников и инвалидов I и II группы.

5.1.2 Организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны

Рабочее место в научно-исследовательском отделе должно соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.033-78 «Система стандартов безопасности труда. Рабочее место при выполнении работ сидя», поскольку значительная часть работ проводится в положении сидя. В качестве примера рассмотрим работу в шкафу лабораторном вытяжном и на модуле хроматографическом.

Конструкция рабочего места должна обеспечивать выполнение необходимых в работе операций в пределах зоны досягаемости моторного поля человека, а также учитывать его антропометрические данные, физиологические и психологические требования.

В соответствии с ГОСТ 22360-95 «Шкафы демонстрационные и лабораторные вытяжные» функциональные размеры шкафа лабораторного стационарного (вытяжного, IV-ЛС), приведенного на рисунке 5.1, должны удовлетворять требованиям, указанным в таблице 5.1 [89].

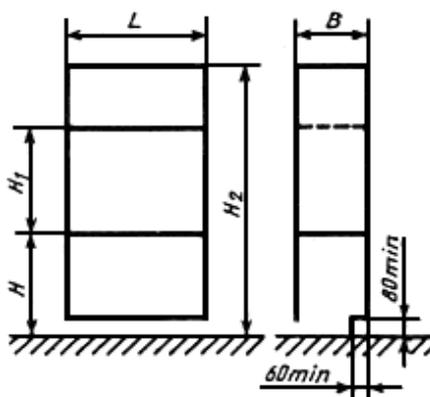


Рисунок 5.1 – Номинальные наружные размеры шкафа лабораторного типа IV-ЛС:

L – длина шкафа; B – глубина шкафа; H – высота рабочей поверхности шкафа от пола;
H₁ – высота рабочей зоны шкафа; H₂ – высота шкафа

Таблица 5.1 – Размер вытяжного шкафа, мм

Тип	L	B	H	H ₁ не менее	H ₂ не более
IV-ЛС	886-1275	640-700	900	900	2500

Внутренние поверхности вытяжного шкафа должны быть изготовлены из коррозионно-стойких, непористых, негорючих материалов, таких как нержавеющая сталь марки 316, и должны быть гладкими и непроницаемыми, со скругленными углами. С задней и верхней частей шкафа должны быть регулируемые перегородки с горизонтальными щелями расположенными таким образом, чтобы обеспечить достаточно равномерную скорость движения при различных условиях использования бокса в зависимости от источников тепла, размера и конфигурации оборудования в нем.

Запорная арматура для коммуникаций, в том числе газа, воздуха, вакуума и электричества, должна находиться за пределами корпуса вытяжки в месте, где они будут легкодоступны в случае пожара в вытяжке. Расположение такого запорного устройства должно быть четко обозначено в соответствующем месте на внешней стороне бокса.

При работе с элементами хроматографияеского модуля необходимо учитывать: рабочую позу инженера-химика, свободное пространство, обзор, возможность ведения записей, размещения документации и материалов, необходимых для удовлетворительного выполнения операционных процедур.

Расположение кресла, пульта, органов управления и средств отображения информации должно соответствовать антропометрическими, психофизиологическими и биомеханическими показателям [90]. Органы управления, связанные с четкой последовательностью действий работника, должны быть единообразными и расположенными близко друг к другу, а функционал осуществляться слева направо и сверху вниз. Зоны зрительного наблюдения в вертикальной плоскости оператора, находящегося в рабочей позе, должны находиться в оптимальной зоне информационного поля под углом $\pm 15^\circ$ от нормальной линии взгляда и в горизонтальной плоскости под углом $\pm 15^\circ$ от сагиттальной плоскости. Высота рабочей поверхности при организации рабочего места должна быть 655 мм, а сиденья около 420 мм.

Помимо вышперечисленных требований по организации рабочего места, должны быть предусмотрены необходимые средства защиты работника

от воздействия вредных производственных факторов в соответствии с системой стандартов безопасности труда по ГОСТ 12.0.003-2015 «Опасные и вредные производственные факторы», а также условия для экстренной эвакуации инженера-химика с рабочего места.

К самостоятельной работе допускаются работники не моложе 18 лет, прошедшие предварительный медицинский осмотр, вводный инструктаж по охране труда и пожарной безопасности, инструктаж по электробезопасности, первичный инструктаж на рабочем месте, обучение безопасным приемам и методам труда по основной профессии, стажировку под руководством опытного работника и проверку знаний требований охраны труда.

5.2 Производственная безопасность

Во время проведения научно-исследовательских работ на биотехнологическом предприятии работник может подвергаться воздействию комплекса неблагоприятных факторов, установленных в соответствии с ГОСТ 12.0.003-2015. К этим факторам относятся вредные и легковоспламеняющиеся вещества, недостаток освещения, психические перегрузки и др. Полный список опасных и вредных факторов с соответствующими нормативными документами приведен в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Опасные и вредные факторы

№	Факторы (ГОСТ 12.0.003-2015)	Эксплуатация	Нормативные документы
1	Отклонение показателей микроклимата	+	СанПиН 2.2.4.548–96; ГОСТ 12.1.005-88
2	Отсутствие или недостаток света, освещенность рабочей зоны	+	СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278–03; СНиП 23-05-95
3	Локальная вибрация	+	ГОСТ 31192.1-2004
4	Повышенный шум	+	ГОСТ 12.1.003-83
5	Электрический ток	+	ГОСТ 12.1.030-81 ССБТ; ГОСТ 12.1.038-82 ССБ
6	Вредные и легковоспламеняющиеся вещества	+	ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ; ГОСТ 12.1.044-89

Такие факторы, как отклонения микроклимата, недостаток естественного света, вибрации, шум и электрический ток, создаются физическими свойствами и характеристиками состояния материальных объектов производственной среды, в то время как органические вещества и растворители разного класса опасности относятся к группе, порождаемой химическими и физико-химическими свойствами находящихся в рабочей зоне веществ и материалов. Рассмотрим более подробно каждый из них.

1. Отклонение показателей микроклимата

Микроклимат производственных лабораторий – это климат внутренней среды, которая определяется действующими на организм человека сочетаниями таких параметров, как температура, влажность, скорость движения воздуха, а также в некоторых случаях интенсивность теплового излучения от нагреваемых поверхностей. Несоответствие этих факторов оптимальным микроклиматическим условиям в долгосрочной перспективе может привести к профзаболеванию.

Нормальная жизнедеятельность и высокая работоспособность человека являются возможно только при наличии баланса между производством тепла и его выделением в окружающую среду. При высокой внешней температуре сосуды кожи расширяются, секреция воды потовыми железами увеличивается, температура приподнимается, в результате теплоотдача с поверхности тела увеличивается. При низкой температуре сосуды кожи сужаются, кровь движется к внутренним органам, поверхность кожи охлаждается в связи с чем разница между температурой кожного покрова и воздуха становится меньше, а теплоотдача уменьшается.

В обычных условиях (комнатная температура 18 °С) человек теряет около 85 % тепла через кожу и примерно 15 % на подогрев пищи, питья, и вдыхаемого воздуха. Из 85 % тепла около 45 % теряется путем излучения, 30 % удерживается, а 10 % испаряется. Однако эти соотношения значительно меняются в зависимости от микроклиматических условий.

Возможность потери тепла на испарение увеличивается с уменьшением влажности и увеличением скорости воздуха. Скорость воздуха увеличивает потери тепла за счет конвекции испарения и, следовательно, при высоких температурах окружающей среды является благоприятным фактором. Поэтому в жаркую необходимо проветривание, обдув вентилятором, более сильный приток воздуха вентиляционной системы и т.п., когда покой ухудшая теплообмен, способствует перегреванию. При низких температурах движение воздуха будет выступать неблагоприятным фактором, поскольку повышает риск обморожения и простуды. Даже при высокой температуре окружающей среды, если одежда человека мокрая или его кожа покрыта ипаринной, сильное движение воздуха (сквозняк), резко увеличивающее теплопотери на испарение, может привести к простудным заболеваниям.

Высокая влажность воздуха (более 70%) отрицательно влияет на теплообмен как на высокие и низкие температуры. Если температура воздуха высокая (более 30 °С), то высокая влажность, затрудняющая испарение пота, приводит к перегреву. При низких температурах повышенная влажность воздуха способствует более сильному охлаждению. Очень сухой воздух также действует неблагоприятно. Поэтому оптимальная влажность находится в пределах 40–60% (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Оптимальные показатели микроклимата лаборатории

Период года	Температура воздуха, °С	Температура поверхностей, °С	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха, м/с
Холодный	19-21	18-22	60-40	0,2
Теплый	20-22	19-23	60-40	0,2

Перепады температуры воздуха по высоте и по горизонтали при обеспечении оптимальных величин микроклимата на рабочих местах не должны превышать 2 °С и выходить за пределы величин, указанных в таблице 5.3.

2. Недостаток света, освещенность рабочей зоны

Для плодотворной работы в научно-исследовательской лаборатории крайне важно правильное освещение. Плохая освещенность на рабочем месте приводит к постоянному зрительному напряжению, усталости, головным болям и несчастным случаям, с другой стороны, слишком много света и бликов может также вызвать проблемы со здоровьем, боли и стресс. Оба варианта могут привести к ошибкам и как следствие к некачественной продукции и низкой производительности.

Система освещения любой лаборатории в зависимости от специфики труда и места ее нахождения должна соответствовать всем необходимым требованиям освещенности рабочего места на протяжении всего рабочего времени. Для повышения эффективности труда и минимизации зрительного напряжения необходимо соблюдать оптимальные диапазоны значений показателей освещенности, некоторые из них приведены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Факторы освещения при проектировании рабочей зоны

Показатель	Допустимые значения
индекс цветопередачи светильников	$\geq 80 \%$
коэффициент пульсации источников света	$\leq 15 \%$
создание тени на рабочем месте при общем освещении	не допускается
колебания яркости ламп	незначительные
ослепленность	10-40 %

Аналитические комплексы и научно-исследовательские лаборатории фармацевтических производств по характеристике зрительной работы ведут технологические процессы высокой точности с наименьшим объектом различения 0,3–0,5 мм. В этом случае для рабочих мест рекомендуется использовать располагающиеся параллельно направлению взгляда светильники открытого монтажа и локальные осветительные приборы, встраиваемые в полки или надстройки рабочих столов с общим уровнем освещенности 400-500 лк (по СП 52.13330.2016).

Чтобы организовать такой уровень общего искусственного освещения горизонтальной рабочей поверхности проводят расчет по методу коэффициента светового потока, который показывает, какая часть от общего света ламп попадает на рабочую поверхность с учетом отражения от потолка и стен. Световой поток ламп определяют по формуле 5.1:

$$\Phi = \frac{E_H \cdot S \cdot K_3 \cdot Z}{N_L \cdot \eta}, \quad (5.1)$$

где E_H – нормативная освещённость, лк; S – площадь освещаемого помещения, м²; K_3 – коэффициент запаса, учитывающий загрязнение осветительных приборов и отражающих поверхностей; Z – коэффициент неравномерности освещения; N_L – общее число ламп в помещении; η – коэффициент использования светового потока.

Площадь помещения рассчитывают по формуле 5.2, как произведение длины на ширину:

$$S = A \cdot B, \quad (5.2)$$

где A – длина комнаты, м; B – ширина комнаты, м.

Лаборатория научно-исследовательского отдела имеет прямоугольную форму с номинальными размерами в м 8,0×7,0×4,0 (длина × ширина × высота) и высотой рабочей поверхности над полом 1,0 м. Подставив числовые значения, получим:

$$S = 8,0 \cdot 7,0 = 56,0 \text{ (м}^2\text{)}$$

При размещении светильников помимо общей площади помещения необходимо учитывать высоту светильников над поверхностью, где проводятся работы. Ее определяют по формуле 5.3:

$$h = h_{\Pi} - h_{\text{рп}}, \quad (5.3)$$

где h_{Π} – высота светильника над полом (высота подвеса), м; $h_{\text{рп}}$ – высота рабочей поверхности над полом, м.

Высоту подвеса рассчитывают как:

$$h_{\Pi} = H - h_c, \quad (5.4)$$

где H – высота помещения, м; h_c – расстояние светильников от перекрытия, м, которое при общей высоте менее 6 м принимают равным 0,5-0,7 м.

Отсюда высота светильников над поверхностью составит:

$$h = 4,0 - 0,5 - 1,0 = 2,5 \text{ (м)}$$

С целью нахождения выгодного положения светильников между собой используют интегральный критерий оптимальности λ , влияющий на равномерность общей освещенности рабочего места. Для люминесцентных ламп без защитной решётки типа ОД, которые чаще всего используют в лабораторных помещениях предприятий нормальными условиями среды, критерий оптимальности принимают равным 1,4. Расстояние между рядами светильников L рассчитывают по формуле 5.5:

$$L = \lambda \cdot h \quad (5.5)$$

Подставив числовые значения, получим:

$$L = 1,4 \cdot 2,5 = 3,5 \text{ (м)}$$

Оптимальное расстояние l от крайнего ряда светильников до стены рекомендуют брать в три раза меньше, чем расстояние между рядами светильников, поэтому примем его равным 1,2 м.

Общее количество светильников с люминесцентными лампами, а также количество необходимых рядов определяется по формулам 5.6 и 5.7:

$$n_{\text{св}} = \frac{(A - 2/3 \cdot L)}{l_{\text{св}} + 0,5}; \quad (5.6)$$

$$n_{\text{ряд}} = \frac{(B - 2/3 \cdot L)}{L} + 1, \quad (5.7)$$

где $n_{\text{св}}$ – количество светильников в ряду; $l_{\text{св}}$ – длина лампы, м; $n_{\text{ряд}}$ – количество рядов.

Светильники типа ОД – 2-80 с количеством ламп 2 шт и мощностью в 80 Вт имеют длину 1,531 м, отсюда количество светильников составит:

$$n_{\text{св}} = \frac{(8,0 - 2/3 \cdot 3,5)}{1,531 + 0,5} = 2,5 \approx 3;$$

$$n_{\text{ряд}} = \frac{(7,0 - 2/3 \cdot 3,5)}{3,5} + 1 = 2,3 \approx 2$$

Тогда общее количество ламп $N_{л}$ с учетом того, что в каждом светильнике установлено две лампы, будет равно 12.

При учете равномерного размещения люминесцентных светильников получим план, представленный на рисунке 5.2. Чертеж выполнен в масштабе 1:100.

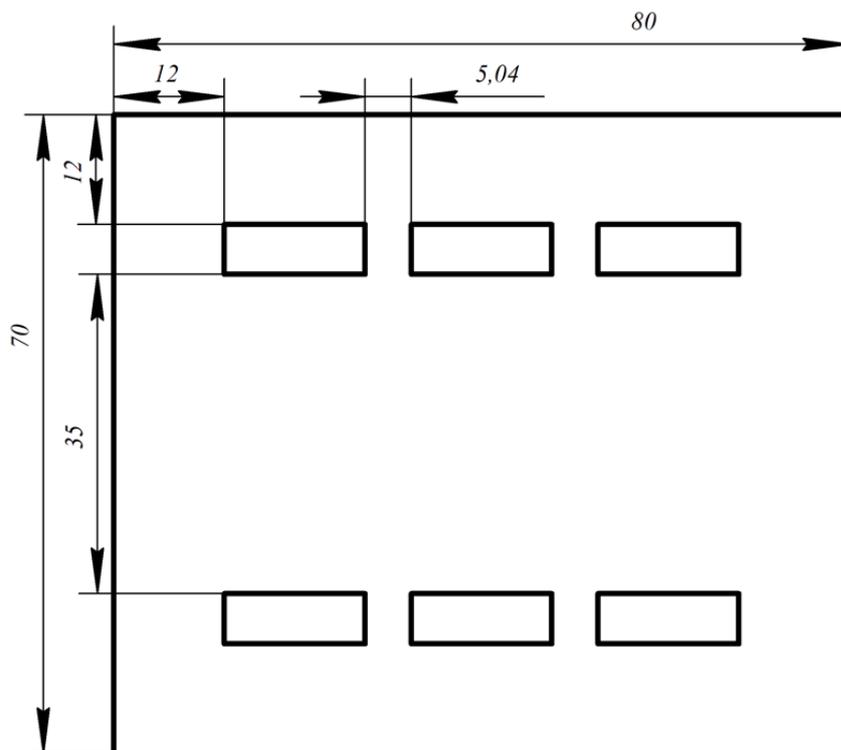


Рисунок 5.2 – План помещения с расположением светильников

Коэффициент использования светового потока η , необходимый для расчета светового потока лампы, зависит от индекса помещения i , типа светильника, высоты светильников над рабочей поверхностью и коэффициентов отражения стен $\rho_{ст}$ и потолка $\rho_{п}$. Поскольку потолок и стены помещения выкрашены в белый цвет, а концентрация в воздухе твердых частиц минерального и органического происхождения минимальна, коэффициенты отражения свежепобеленных потолка и стен с окнами без штор пример равными 70 % и 50 % соответственно. Коэффициент запаса люминесцентных ламп примем равным 1,5. Индекс помещения рассчитываем по формуле 5.8.

$$i = \frac{A \cdot B}{h \cdot (A + B)}, \quad (5.8)$$

Подставив числовые значения, получим:

$$i = \frac{8,0 \cdot 7,0}{2,5 \cdot (8,0 + 7,0)} = 1,5$$

Тогда коэффициенты использования светового потока светильников с люминесцентными лампами при $\rho_{ст} = 50 \%$, $\rho_{п} = 70 \%$ и $i = 1,5$ составит 56% .

При расчетах коэффициент неравномерности освещения Z для люминесцентных ламп берут равным $1,1$.

С учетом вышеприведенных данных световой поток ламп составит:

$$\Phi = \frac{400 \cdot 56,0 \cdot 1,5 \cdot 1,1}{12 \cdot 0,56} = 5500 \text{ (лм)}$$

Ближайшей стандартной лампой по световому потоку является лампа белой цветности типа ЛБ мощностью 80 Вт и световым потоком 5200 лм .

Выполним проверку соблюдения заданных условий:

$$-10\% \leq \frac{\Phi_{л.станд} - \Phi_{л.расч}}{\Phi_{л.станд}} \cdot 100\% \leq +20\%$$

Подставим числовые значения:

$$\begin{aligned} -10\% &\leq \frac{5200 - 5500}{5200} \cdot 100\% \leq +20\%; \\ -10\% &\leq -5,6\% \leq +20\% \end{aligned}$$

Как видно из расчетов, полученное значение $-5,6 \%$ входит в допустимый диапазон от -10% до $+20 \%$, то есть подобранно число светильников и высота подвеса подходят для данной лаборатории.

Электрическая мощность P осветительного комплекса составит:

$$P = 12 \cdot 80 = 960 \text{ (Вт)}$$

Проведенный расчет показывает, что спроектированный план равномерного размещения шести двухламповых светильников типа ОД – 2-80 ЛБ, благоприятствует равномерного искусственного освещения и позволяет достичь электрической мощности осветительной установки 960 Вт .

3. Локальная вибрация

Как и при любом профессиональном воздействии, индивидуальная чувствительность к вибрации варьируется от человека к человеку. Работники фармацевтических и биотехнологических производств чаще всего подвержены вибрации всего тела, которая может вызвать усталость, проблемы с желудком, головную боль, потерю равновесия и «шаткость» вскоре после или во время воздействия. Симптомы схожи с теми, которые возникают у многих людей после долгой поездки на поезде или на лодке. Помимо этого, при высоких уровнях вибрации снижается продуктивность труда рабочих, усталость возрастает, а вероятность совершения ошибок увеличивается.

При исследовании последствий влияния локальной вибрации на здоровье человека учитывают такие факторы как:

- пороговое значение или количество воздействия вибрации, которое не приводит к неблагоприятным последствиям для здоровья;
- взаимосвязь доза-реакция (как тяжесть последствий для здоровья связана с количеством получаемой вибрации из вне);
- латентный период (время от первого контакта до появления симптомов).

Пороговое значение вибрации – это уровень, ниже которого отсутствует риск вибрационного синдрома. Другими словами, это максимальная интенсивность вибрации, которой большинство здоровых рабочих могут подвергаться каждый рабочий день при полной занятости без развития онемения, бледности или озноба.

Тип зависимости «воздействие-реакция» указывает на возможную связь между воздействием на здоровье и общим количеством вибрационной энергии, поступающей в руки или тело. В зависимости от интенсивности воздействия симптомы могут появиться через месяцы или годы после начала воздействия.

В соответствии с ГОСТ 31192.1-2004 при количественной оценке факторов, влияющих на восприятие работником локальной вибрации в производственных условиях, учитывают: частотный спектр вибрации; уровень вибрации; длительность воздействия в течение рабочего дня, а также

суммарное воздействие вибрации, накопленное к определенному моменту времени в течение трудовой деятельности.

Для снижения воздействия локальной вибрации на персонал промышленных предприятий рекомендуют использовать процессы и инструменты с минимальным вибровоздействием. В частных случаях для снижения передаваемых на руки оператора воздействий в диапазоне частот действия вибрации используют антивибрационные перчатки (ГОСТ ИСО 10819-2002). Помимо этого, необходимо проводить ежегодное техническое обслуживание оборудования и установок в соответствии с план-графиком.

4. Шум

Поскольку большинство вибрирующих машин и инструментов производят шум, рабочий, подвергающийся воздействию вибрации, одновременно подвергается и воздействию шума. Потеря слуха, вызванная шумом, является одним из наиболее распространенных профессиональных заболеваний. Поскольку воздействие шума влияет на общение и слух, вероятность несчастных случаев на соответствующих рабочих местах возрастает. Даже относительно низкий уровень шума может вызвать проблемы на рабочем месте, вызывая раздражение, нервозность и стрессовые реакции, которые пагубно влияют на способность концентрироваться и на продуктивную эффективность.

В соответствии с ГОСТ 12.1.003-83 допустимым уровнем шума на местах, где проводится высококвалифицированная работа, требующая сосредоточенности, измерительных и аналитических работ, уровень звука должен составлять не более 60 дБ.

Для установления предельно допустимых шумовых характеристик машин в соответствии с допустимым уровнем шума на рабочем месте используют ГОСТ 12.1.023-80, в котором описаны методы, порядок внесения и контроль шумовых характеристик.

В случаях, когда уровень шума превышает допустимое пороговое значение, необходимо выполнять различного рода мероприятия по его

снижению, например, осуществить изоляцию источника шума, где это возможно, или заменить оборудование, технические характеристики которого не удовлетворяют заданным требованиям. Если оставшиеся риски нельзя устранить, то работодатель должен предоставить работникам индивидуальные средства защиты органов слуха, такие как одноразовые или многоразовые защитные беруши, беруши на скобе или наушники.

5. Электрический ток

Лаборатория научно-исследовательского отдела содержит широкий спектр электрического оборудования, включая мешалки, шейкеры, насосы, нагревательные плиты, нагреватели, источники питания, печи и оборудование для электрофореза. Эти и все остальные электрические устройства, используемые в лабораторных условиях, представляют потенциальную опасность из-за возможности поражения электрическим током, пожаров, а также из-за искр, служащих источником воспламенения легковоспламеняющихся жидкостей (ЛВЖ) или горючих материалов (ГМ).

Поражение электрическим током происходит, когда тело становится частью электрической цепи, то есть ток входит в тело в одной точке, проходит через него и выходит в другой. В то время как легкие удары могут быть едва заметны, более серьезные случаи могут привести к остановке сердца, ожогам, повреждению тканей или даже смерти.

Лаборатории фармацевтических производств по возможности поражения людей электрическим током относятся к помещениям с повышенной опасностью, по причине наличия химически активных веществ и органических сред, разрушающих изоляцию и токоведущие части электрооборудования.

Общая электробезопасность рабочего помещения должна обеспечиваться выполнением мероприятий по соблюдению безопасного расстояния до токоведущих частей, их изоляции, по применению блокировки аппаратов, ограждающих устройств и предупреждающей сигнализации (включая надписи и плакаты). Также необходимо использовать средства индивидуальной защиты

(резиновые перчатки, галоши или сапоги) и, по возможности, средства защиты от воздействия электрического и магнитного полей.

6. Вредные и легковоспламеняющиеся вещества

Одним из основных опасных производственных факторов на фармацевтическом предприятии является широкий спектр вредных и легковоспламеняющихся веществ, воздействию которых работники лабораторий подвергаются на протяжении всей трудовой карьеры. Помимо риска воспламенения, которое может привести к травмам, смерти и повреждению имущества, вредные вещества могут вызывать головокружение, удушье, раздражение кожных покровов, тошноту и пр.

Работа в научно-исследовательском отделе подразумевает частый контакт с токсичными и легковоспламеняющимися химическими реактивами разных классов опасности, значения предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны (ПДКр.з) которых регламентируются определяются по ГН 2.2.5.3532–18 и ГОСТ 32419-2013. Список наиболее часто используемых в течение рабочего дня веществ приведен в таблице 5.5.

Таблица 5.5 – Перечень вредных и легковоспламеняющиеся веществ

Вещество	Характеристика	Класс опасности	ПДКр.з мг/м ³	Влияние на организм
1	2	3	4	5
Ацетон (ГОСТ 2603-79)	Бесцветная легковоспламеняющаяся жидкость	4	200	Сильно раздражает слизистые оболочки, вызывает слабость и головокружение
Ацетонитрил (ТУ 2636-092-44493179-04)	Бесцветная прозрачная жидкость. Легко воспламеняется	3	10	Раздражающее воздействие на глаза, может привести к судорогам, нарушению дыхания и анемии
Ледяная уксусная ксилита (ТУ 6-09-4191-76)	Жидкость со специфическим запахом	3	5	Пары раздражают слизистые оболочки верхних дыхательных путей. Способна вызывать сильные химические ожоги
Метанол (ГОСТ 6995-77)	Бесцветная горючая жидкость с запахом	3	5	Сильно действует на нервную и сосудистую систему, вызывает слепоту

Продолжение таблицы 5.5

1	2	3	4	5
Меркаптоэтанол (не регламентируется)	Горючая жидкость с характерным запахом	2	1	Вызывает раздражение дыхательных путей, кожи, боли в животе, может приводить к смерти
Трихлоруксусная кислота (ТУ 6-09-1926-77)	Жидкость со специфическим запахом	3	5	Вещество разъедает глаза, кожу и дыхательные пути. Вдыхание пара может вызвать отек легких
Этанол 95% (ГОСТ 5962-2013)	Легучее бесцветное вещество с отчетливым запахом	3	10	Способен вызвать кому, ступор, нечувствительность к боли, угнетение функций ЦНС, при вдыхании паров в большой концентрации наносит вред здоровью

Для снижения рисков, связанных с вредными и легковоспламеняющимися химическими веществами лаборатория должна быть снабжена приточно-вытяжной вентиляцией и вытяжным шкафом для защиты органов дыхания и слизистой оболочки глаз. Помимо этого, необходимо обеспечить каждого работника средствами индивидуальной защиты. Всему персоналу лаборатории необходимо соблюдать комплекс правил по особенностям работы с едкими и токсичными химическими веществами [9-12], регулярно проходить инструктажи и проверку остаточных знаний по технике безопасности.

5.3 Экологическая безопасность

Лаборатории фармацевтических компаний при несоблюдении норм и правил по утилизации производственных отходов способны оказывать сильное негативное влияние на состояние литосферы, гидросферы и атмосферы, поскольку большой ряд отходов устойчив к естественному разрушению и способен изменять свою активность с образованием физико-химических трансформантов, представляющих потенциальную опасность для живых организмов и человека.

Меры по защите атмосферы

Вредные выбросы фармацевтических предприятий имеют относительно небольшие объемы, однако, представляют особую опасность, за счет возможной высокой концентрации разнообразных токсических веществ.

Основными мероприятиями по снижению вредных выбросов являются совершенствование технологических процессов и внедрение малоотходных и безотходных технологий; снижение объема использования органических растворителей; снижение температуры рабочих процессов; организация очистки вентиляционных стоков.

Меры по защите гидросферы

Органические растворители, используемые во многих лабораторных процессах, могут попадать в поверхностные и грунтовые воды с промышленными стоками или в результате неправильной утилизации. Хотя растворители органической природы обычно относительно быстро улетучиваются и разлагаются в поверхностных водах, но в зависимости от климатических условия они способны сохранять повышенный уровень концентрации [95]. Также химические растворители могут мобилизовать менее растворимые токсичные органические химические вещества, что приводит к усилению воздействия на организм. Оценку оказываемого влияния проводят в соответствии с ГОСТ 17.1.3.06-82 и ГОСТ 17.1.3.13-86.

Для предотвращения загрязнения водных систем попадания фармацевтическими отходами необходимо осуществлять их сбор в соответствующие сосуды из темного инертного стекла с обязательной подписью компонентов, содержащихся в сливе, или, в случае твердых отходов, в герметично закрытые контейнеры и мешки черного цвета с указанием класса опасности и описанием содержимого. Емкости хранят в специальном здании или изолированном помещении с отдельным входом. Они должны соответствовать всем требованиям санитарно-пожарных норм. При вывозе больших объемов составляют паспорт и оформляют номенклатурный список, а после утилизации – предоставляют соответствующий акт.

Меры по защите литосферы

При проведении опытно-исследовательских работ в лаборатории образуется большое количество пластиковых отходов, за счет использования большого количества расходного материала: пробирки, планшеты, наконечники для пипеток, чашки Петри и многое другое. Пластик вызывает загрязнение земли, за счет медленного выброса токсичных химических веществ в почву и воду. Полихлорированные бифенилы, обнаруженные в пластмассах, угрожают воздуху и естественной растительности, а также всем видам жизни, подверженным воздействию почвы.

Оптимальным решением данной проблемы является сортировка разных видов пластика, используемого в лаборатории, и его дальнейшая переработка. На сегодняшний день во всем мире действует следующая классификация пластмасс:

- 1) полиэтилентерефталат (ПЭТ);
- 2) полиэтилен высокой плотности (HDPE);
- 3) поливинилхлорид (ПВХ);
- 4) полиэтилен низкой плотности (LDPE);
- 5) полипропилен (ПП);
- 6) полистирол (ПС);
- 7) другой.

Существуют большие различия в простоте переработки этих разных категорий. Например, группы 1 и 2 относительно легко перерабатываются, тогда как «другая» категория (группа 7) обычно не перерабатывается. Независимо от номера группы переработанные пластмассы могут значительно отличаться от своих первичных аналогов по чистоте и механическим свойствам. Причина этого в том, что даже после очистки и сортировки остаются примеси либо из разных видов пластика, либо из веществ, связанных с предыдущим использованием материалов. Поэтому большинство пластиков (в отличие от стекла) перерабатываются только один раз, и переработанные материалы имеют иное применение, чем их первичные аналоги.

5.4 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

Несчастные случаи или чрезвычайные ситуации могут возникнуть в результате несоблюдения правил техники безопасности персоналом лаборатории, а также вследствие внешних антропогенных и неантропогенных факторов [96], к которым относятся: пожары и взрывы; внезапное обрушение зданий; землетрясения; метеорологические и агрометеорологические явления.

Для химической лаборатории самыми распространенными являются проливы и выбросы опасных химических веществ. Работы по ликвидации разливов следует проводить в средствах индивидуальной защиты (СИЗ), таких как фартук прорезиненный, очки защитные, кислотно-щелочные перчатки, маска полнолицевая, специальная обувь.

Если пролита концентрированная кислота/щелочь, то необходимо засыпать место пролива сорбентом, или сорбирующим материалом (впитывающие салфетки, рулоны, бобы, подушки), затем удалить пропитанный сорбент пластиковым совком и смёткой, после чего промыть место пролива большим количеством воды, промыть перчатки под струей проточной воды, просушить. При ликвидации разливов неизвестного объема, последовательно засыпать участок разлива слоем сорбента не менее 5-7 см превышающим уровень жидкости. Время контакта сорбента с концентрированной кислотой/щелочью должно быть не менее 1 часа. Отработанный сорбент следует собрать, закрыть плотной крышкой и вынести в ближайшее место накопления отходов. После необходимо промыть место пролива водой и вытереть насухо склизями.

При проливе ЛВЖ и горючих жидкостей (ГЖ) необходимо немедленно обесточить все приборы и принять меры, обеспечивающие индивидуальную защиту. Место пролива ЛВЖ и ГЖ следует засыпать сорбентом или промыть водой. При ликвидации разливов необходимо действовать так же, как и в случае пролива кислот/щелочей.

При обнаружении первых признаков пожара (запах дыма, отблески пламени, искры) работник по возможности должен принять меры по тушению

пожара в начальной стадии первичными средствами пожаротушения с соблюдением мер предосторожности. Если источником возгорания является электрооборудование, его необходимо обесточить. Для тушения электрооборудования необходимо использовать только углекислотный огнетушитель, т.к. он гораздо меньше загрязняет объект пожаротушения, во всех остальных случаях можно использовать порошковый и углекислотный огнетушители. Необходимо активировать автоматическую противопожарную систему путем нажатия ручного извещателя – кнопка «Пожар», при необходимости предупредить криком «Пожар», присутствующий персонал. Далее сотрудник лаборатории должен незамедлительно эвакуироваться с места пожара к ближайшему эвакуационному выходу согласно плана эвакуации.

Для возможных чрезвычайных ситуаций неантропогенного характера, обусловленных географическим расположением региона нахождения фармацевтического предприятия, предусматривается определенная защита сооружения и разработка план эвакуации. От прямых ударов молнии здание оснащают молнеприемниками и заземлителями. При возникновении ураганов и землетрясений в сооружении отключают воду и электричество, и в соответствии с планом эвакуации покидают рабочее помещение.

Таким образом, в разделе были рассмотрены правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности при выполнении работ в научно-исследовательской лаборатории, выявлены вредные и опасные факторы, такие как недостаток света, вибрация, шум, ЛВЖ и ядовитые вещества, разработаны мероприятия по снижению и ликвидации их действия, произведен расчет по организации искусственного освещения в 400 лк. Помимо этого, описаны возможные неблагоприятные воздействия на окружающую среду отходов фармацевтического предприятия, и способы минимизации их воздействия. Также был проведен анализ возможных чрезвычайных ситуаций и план мероприятий для их ликвидации.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СТУДЕНТА

1/ Аликова В.Д., Герасимова Т.С., Гусаров Д.А., Чернова А.П.. Исследование оптимальных условий сольобилизации гибридного белка гларгин-инсулина из культуры *Escherichia coli* // Химия и Химическая технология в XXI веке: Материалы XXIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени выдающихся химиков Л.П. Кулёва и Н.М. Кижнера. В 2 томах. Том 1 (г. Томск, 16–19 мая 2022 г.). / Томский политехнический университет. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2022, С. 414-415.

2/ Alikova V.D., Chernova (Astashkina) A.P., Shormanov V.K., Korotkova E.I. Determination of 2-methoxyphenol in model solutions by spectrophotometry // Modern Analytical Chemistry: Proceedings of the 16th International Students Conference, Prague, September 17-18, 2020. - Prague: Charles University, 2020, P. 1-5.

3/ Alikova V.D., Nomerovsky O.D., Portnikova A.I., Udovenko E.A., Shelofast A.R., Shirina M.R. Determination of heavy metals in soil // Materials of the regional initial-practical conference of students, graduate students and young scientists in natural sciences, Vladivostok, April 11 - April 30, 2017, P. 409-410.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Riddle M. C. et al. Introduction: standards of medical care in diabetes—2018 //Diabetes Care. – 2018. – Т. 41. – №. Supplement 1. – С. S1-S2.
2. Atlas D. et al. International diabetes federation //IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. – 2015.
3. Li S. et al. Diabetes mellitus and cause-specific mortality: a population-based study //Diabetes & metabolism journal. – 2019. – Т. 43. – №. 3. – С. 319-341.
4. Баирамошвили Д.И. Генно-инженерный инсулин человека: успехи и перспективы. // Рос. Хим. Ж. 2005. -Т. XLIX. -№ 1. -С. 34-45.
5. Sapra A, Bhandari P. Diabetes Mellitus. 2021 Sep 18. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
6. Балаболкин М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений: Руководство для врачей / М.И.Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская. -М.: Медицина, 2005. 512 с.
7. Строев, Ю.И. ; Иванов, С.Н.; Сомова, Л.В.; Феоктистов, Э.А.; Лернер, Э.Я.; Соколова, Н.В. / Сахарный диабет. Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, 1992.
8. Craig M. E. et al. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents //Pediatric diabetes. – 2014. – Т. 15. – №. S20. – С. 4-17.
9. Tuomilehto J. The emerging global epidemic of type 1 diabetes //Current diabetes reports. – 2013. – Т. 13. – №. 6. – С. 795-804.
10. Mayer-Davis E. J. et al. Incidence trends of type 1 and type 2 diabetes among youths, 2002–2012 //N Engl J Med. – 2017. – Т. 376. – С. 1419-1429.
11. Banting F. G., Best C. H. The internal secretion of the pancreas //Indian Journal of Medical Research. – 2007. – Т. 125. – №. 3. – С. L251.
12. Abel J. J. Crystalline insulin //Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1926. – Т. 12. – №. 2. – С. 132.

13. Stern K. G., White A. Studies on the constitution of insulin: i. Properties of reduced insulin preparations //Journal of Biological Chemistry. – 1937. – Т. 117. – №. 1. – С. 95-110.
14. Scott D. A. Crystalline insulin //Biochemical Journal. – 1934. – Т. 28. – №. 4. – С. 1592.
15. Sanger F., Thompson E. O. P. The amino-acid sequence in the glyceryl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates //Biochemical Journal. – 1953. – Т. 53. – №. 3. – С. 353.
16. Adams M. J. et al. Structure of rhombohedral 2 zinc insulin crystals //Nature. – 1969. – Т. 224. – №. 5218. – С. 491-495.
17. Munte C. E. et al. Solution structure of human proinsulin C-peptide //The FEBS journal. – 2005. – Т. 272. – №. 16. – С. 4284-4293.
18. Gusarov D. A. et al. Инсулины пролонгированного действия: структура и фармакологический эффект //Биофармацевтический Журнал. – 2009. – Т. 1. – №. 1. – С. 3-11.
19. Brange J. // Protein delivery: Physical systems, NY: Plenum Press. 1997. С. 343-412.
20. Bhatnagar S. et al. Molecular variants and derivatives of insulin for improved glycemic control in diabetes //Progress in biophysics and molecular biology. – 2006. – Т. 91. – №. 3. – С. 199-228.
21. Dodson G., Steiner D. The role of assembly in insulin's biosynthesis //Current opinion in structural biology. – 1998. – Т. 8. – №. 2. – С. 189-194.
22. Sieber P. et al. Totalsynthese von Humaninsulin unter gezielter Bildung der Disulfidbindungen. Vorläufige Mitteilung //Helvetica Chimica Acta. – 1974. – Т. 57. – №. 8. – С. 2617-2621.
23. Märki F., Albrecht W. Biological activity of synthetic human insulin //Diabetologia. – 1977. – Т. 13. – №. 4. – С. 293-295.
24. Homandberg G. A., Mattis J. A., Laskowski Jr M. Synthesis of peptide bonds by proteinases. Addition of organic cosolvents shifts peptide bond equilibria toward synthesis //Biochemistry. – 1978. – Т. 17. – №. 24. – С. 5220-5227.

25. Owens D. R. Human insulin: clinical pharmacological studies in normal man. – Springer Science & Business Media, 1986. 297 c.
26. Owens D. R. et al. Human, porcine and bovine ultralente insulin: subcutaneous administration in normal man //Diabetic medicine. – 1986. – T. 3. – №. 4. – C. 326-329.
27. Heinemann L. et al. What is the correct timing of subcutaneous injections of regular insulin to cover carbohydrate rich meals //Horm Metab Res Suppl. – 1992. – T. 26. – C. 137-9.
28. Hvass A., Skelbaek-Pedersen B. Determination of protamine peptides in insulin drug products using reversed phase high performance liquid chromatography //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2005. – T. 37. – №. 3. – C. 551-557.
29. Hallas-Møller K., Petersen K., Schlichtkrull J. Crystalline and amorphous insulin-zinc compounds with prolonged action //Science. – 1952. – T. 116. – №. 3015. – C. 394-398.
30. Samuel T., Kolk A. H., Rümke P. Studies on the immunogenicity of protamines in humans and experimental animals by means of a micro-complement fixation test //Clinical and experimental immunology. – 1978. – T. 33. – №. 2. – C. 252.
31. Kurtz A. B. et al. Circulating IgG antibody to protamine in patients treated with protamine-insulins //Diabetologia. – 1983. – T. 25. – №. 4. – C. 322-324.
32. Plakogiannis R., Nathan J. P., Rosenberg J. M. Clinical Q&A: How are insulin glargine and insulin aspart different from the 'older' insulins? //Drug Topics. – 2000. – T. 144. – №. 22. – C. 41-41.
33. Tan C. Y., M. Wilson D., Buckingham B. Initiation of insulin glargine in children and adolescents with type 1 diabetes //Pediatric diabetes. – 2004. – T. 5. – №. 2. – C. 80-86.
34. Home P. Insulin glargine: the first clinically useful extended-acting insulin in half a century? //Expert Opinion on Investigational Drugs. – 1999. – T. 8. – №. 3. – C. 307-314.

35. Bolli G. B. et al. Insulin analogues and their potential in the management of diabetes mellitus //Diabetologia. – 1999. – Т. 42. – №. 10. – С. 1151.
36. Habermann P., Zocher F. Amidated Insulin Glargine //Patent No.: US 8048854B2. – 2011.
37. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues //London, UK: European Medicines Agency. – 2015.
38. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues //London, UK: European Medicines Agency. – 2015.
39. Covic A., Kuhlmann M. K. Biosimilars: recent developments //International urology and nephrology. – 2007. – Т. 39. – №. 1. – С. 261-266.
40. Gronemeyer P., Ditz R., Strube J. Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing //Bioengineering. – 2014. – Т. 1. – №. 4. – С. 188-212.
41. Weinacker D. et al. Applications of recombinant Pichia pastoris in the healthcare industry //Brazilian Journal of Microbiology. – 2013. – Т. 44. – №. 4. – С. 1043-1048.
42. Echols, K. R., J. C. Meadows, and C. E. Orazio. "Pollution of aquatic ecosystems II: hydrocarbons, synthetic organics, radionuclides, heavy metals, acids, and thermal pollution." – 2009. С. 120-128.
43. Герна, Р. Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии : пер. с англ. / Р. Герна ; под ред. Ф. Герхардта [и др.]. - М. : Мир, 1983. - С. 512-534.
44. Atkinson Y. H. et al. Human tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) directly stimulates arachidonic acid release in human neutrophils //Immunology. – 1990. – Т. 70. – №. 1. – С. 82.

45. Goldwin D., Stater J. N. The influence of the growth on the stability of a drug resistance plasmid in *Escherichia coli*. – K-12//*J. Gen. Microbiol*, 1979. – T. 111. – C. 201-209.
46. Wang H. et al. Optimization of fed-batch fermentation and direct spray drying in the preparation of microbial inoculant of acetochlor-degrading strain *Sphingomonas* sp. DC-6 //3 *Biotech*. – 2018. – T. 8. – №. 7. – C. 1-9.
47. Foster J. W. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* //Critical reviews in microbiology. – 1995. – T. 21. – №. 4. – C. 215-237.
48. Hersh B. M. et al. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli* //Journal of bacteriology. – 1996. – T. 178. – №. 13. – C. 3978-3981.
49. Gerchman Y. et al. Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli* //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1993. – T. 90. – №. 4. – C. 1212-1216.
50. Slonczewski J. L. et al. pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1981. – T. 78. – №. 10. – C. 6271-6275.
51. Maurer L. M. et al. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12 //Journal of bacteriology. – 2005. – T. 187. – №. 1. – C. 304-319.
52. Ingraham J. L. Growth of psychrophilic bacteria //Journal of bacteriology. – 1958. – T. 76. – №. 1. – C. 75-80.
53. Uden G. et al. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria //Archives of microbiology. – 1995. – T. 164. – №. 2. – C. 81-90.
54. Sen R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR //Progress in energy and combustion Science. – 2008. – T. 34. – №. 6. – C. 714-724.
55. Uden G. et al. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria //Archives of microbiology. – 1995. – T. 164. – №. 2. – C. 81-90.
56. Imlay J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide //Annu. Rev. Biochem. – 2008. – T. 77. – C. 755-776.

57. Marquis R. E. High-pressure microbial physiology //Advances in microbial physiology. – Academic Press, 1976. – T. 14. – C. 159-241.
58. Siddiqi S. F., Titchener–Hooker N. J., Shamlou P. A. Simulation of particle size distribution changes occurring during high-pressure disruption of bakers' yeast //Biotechnology and bioengineering. – 1996. – T. 50. – №. 2. – C. 145-150.
59. Limon-Lason J. et al. Reactor properties of a high-speed bead mill for microbial cell rupture //Biotechnology and Bioengineering. – 1979. – T. 21. – №. 5. – C. 745-774.
60. Moore E. K., Hoare M., Dunnill P. Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: New evidence on mechanism //Enzyme and Microbial Technology. – 1990. – T. 12. – №. 10. – C. 764-770.
61. Hafiz, A. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization / Ahmed Hafiz. -CRC Press LLC, 2005. – C. 389.
62. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding //Analytical biochemistry. – 1976. – T. 72. – №. 1-2. – C. 248-254.
63. Schoemaker J. M., Brasnett A. H., Marston F. A. Examination of calf prochymosin accumulation in Escherichia coli: disulphide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies //The EMBO journal. – 1985. – T. 4. – №. 3. – C. 775-780.
64. Dirnhuber P., Schütz F. The isomeric transformation of urea into ammonium cyanate in aqueous solutions //Biochemical Journal. – 1948. – T. 42. – №. 4. – C. 628.
65. Verbrugge F. H., Tang W. H. W., Hazen S. L. Protein carbamylation and cardiovascular disease //Kidney international. – 2015. – T. 88. – №. 3. – C. 474-478.
66. Lin M. F. et al. Ion chromatographic quantification of cyanate in urea solutions: estimation of the efficiency of cyanate scavengers for use in recombinant protein manufacturing //Journal of Chromatography B. – 2004. – T. 803. – №. 2. – C. 353-362.

67. Futami J. et al. Convenient and efficient in vitro folding of disulfide-containing globular protein from crude bacterial inclusion bodies //The Journal of Biochemistry. – 2000. – T. 127. – №. 3. – C. 435-441.
68. Privalov P. L. Physical basis of the stability of the folded conformations of proteins //Protein folding. – 1992. – C. 83-126.
69. Sela M., White Jr F. H., Anfinsen C. B. Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease //Science. – 1957. – T. 125. – №. 3250. – C. 691-692.
70. Goldring J. P. Methods to concentrate proteins for protein isolation, proteomic, and peptidomic evaluation //Detection of Blotted Proteins. – Humana Press, New York, NY, 2015. – C. 5-18.
71. Reis R. V., Zydney A. L. Protein ultrafiltration //Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. – 2009. – C. 1-25.
72. Noordman T. R. et al. Concentration and desalination of protein solutions by ultrafiltration //Chemical Engineering Science. – 2002. – T. 57. – №. 4. – C. 693-703.
73. Min C. K. et al. Increased expression, folding and enzyme reaction rate of recombinant human insulin by selecting appropriate leader peptide //Journal of biotechnology. – 2011. – T. 151. – №. 4. – C. 350-356.
74. Gráf L. et al. Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – T. 85. – №. 14. – C. 4961-4965.
75. Evin L. B., Vásquez J. R., Craik C. S. Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1990. – T. 87. – №. 17. – C. 6659-6663.
76. Son Y. J. et al. Effects of citraconylation on enzymatic modification of human proinsulin using trypsin and carboxypeptidase B //Biotechnology progress. – 2009. – T. 25. – №. 4. – C. 1064-1070.
77. Nieto M. A., Palacián E. Effects of temperature and pH on the regeneration of the amino groups of ovalbumin after modification with citraconic and

- dimethylmaleic anhydrides //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology. – 1983. – Т. 749. – №. 2. – С. 204-210.
78. Habeeb A., Atassi M. Z. Enzymic and immunochemical properties of lysozyme. Evaluation of several amino group reversible blocking reagents //Biochemistry. – 1970. – Т. 9. – №. 25. – С. 4939-4944.
79. Mossavarali S. et al. Stepwise modification of lysine residues of glucose oxidase with citraconic anhydride //International journal of biological macromolecules. – 2006. – Т. 39. – №. 4-5. – С. 192-196.
80. Kadlcik V., Strohalm M., Kodicek M. Citraconylation-a simple method for high protein sequence coverage in MALDI-TOF mass spectrometry //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2003. – Т. 305. – №. 4. – С. 1091-1093.
81. Spicer C. D., Davis B. G. Selective chemical protein modification //Nature communications. – 2014. – Т. 5. – №. 1. – С. 1-14.
82. Kumar A. et al. Is diabetes mellitus associated with mortality and severity of COVID-19? A meta-analysis //Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews. – 2020. – Т. 14. – №. 4. – С. 535-545.
83. Майстренко Г. А., Майстренко А. Г. Источники правового регулирования защиты персональных данных работника в России //Legal Bulletin. – 2020. – Т. 5. – №. 1. – С. 24-29.
84. Трудовой кодекс Российской Федерации от 30.12.2001 N 197-ФЗ (редакция от 25.02.2022) (с изменениями и дополнениями, вступает в силу с 01.03.2022) – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_34683/ (дата обращения 17.05.2022).
85. Постановление Правительства РФ от 19.06.2012 N 608 «Об утверждении Положения о Министерстве здравоохранения Российской Федерации» (с изменениями на 3.04.2021) – URL: <https://rulaws.ru/government/Postanovlenie-Pravitelstva-RF-ot-19.06.2012-N-608/> (дата обращения 17.05.2022).
86. Приказ Минтруда России от 10.12.2018 N 778н «Об утверждении Типовых норм бесплатной выдачи специальной одежды, специальной обуви и

других средств индивидуальной защиты работникам организаций легкой промышленности, занятым на работах с вредными и (или) опасными условиями труда, а также на работах, выполняемых в особых температурных условиях или связанных с загрязнением» (Зарегистрировано в Минюсте России 19.12.2018 N 53067) – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_314176/ (дата обращения 17.05.2022).

87. Федеральный закон "О специальной оценке условий труда" от 28.12.2013 N 426-ФЗ (последняя редакция) – URL: <https://docs.cntd.ru/document/499067392> (дата обращения 17.05.2022).

88. СанПиН 2.2.1/2.1.1.1200-03. Санитарно-защитные зоны и санитарная классификация предприятий, сооружений и иных объектов – URL: <https://docs.cntd.ru/document/902065388> (дата обращения 17.05.2022).

89. ГОСТ 22360-95 Шкафы демонстрационные и лабораторные вытяжные. Типы и размеры. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200017649> (дата обращения 18.05.2022).

90. ГОСТ 22269-76 Система "Человек-машина". Рабочее место оператора. Взаимное расположение элементов рабочего места. Общие эргономические требования.–URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200012834> (дата обращения 18.05.2022).

91. СанПиН 2.4.2.2821-10. Санитарно-эпидемиологические требования к условиям и организации обучения в общеобразовательных учреждениях. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/902256369> (дата обращения 21.05.2022).

92. ПНД Ф 12.13.1-03. Методические рекомендации. Техника безопасности при работе в аналитических лабораториях (общие положения). – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200044235> (дата обращения 21.05.2022).

93. Правила техники безопасности для кабинетов (лабораторий) химии общеобразовательных школ Министерства просвещения СССР, введенные в действие приказом Минпроса СССР от 10.07.1987 № 127. Сборник приказов и инструкций Министерства просвещения РСФСР. –1987. – № 35. – С. 2-32.

94. Федеральный закон от 08 января.1998 г. № 3-ФЗ О наркотических средствах и психотропных веществах (с изменениями на 26 июля 2019 года) – URL: <http://docs.cntd.ru/document/9056021> (дата обращения 21.05.2022).
95. Echols K. R., Meadows J. C., Orazio C. E. Pollution of aquatic ecosystems II: hydrocarbons, synthetic organics, radionuclides, heavy metals, acids, and thermal pollution. – 2009. – С. 120-128.
96. Федеральный закон от 21 декабря 1994 г. № 68-ФЗ. О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера (с изменениями на 23 июня 2016 года). – URL: <http://docs.cntd.ru/document/9009935> (дата обращения 21.5.2022).
97. Baeshen N. A. et al. Cell factories for insulin production //Microbial cell factories. – 2014. – Т. 13. – №. 1. – С. 1-9.

LITERATURE REVIEW

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ03	Аликова Валерия Дмитриевна		

Консультант-лингвист отделения иностранных языков ШБИП:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОХИ	Чернова Анна Павловна	к.х.н.		

Консультант-лингвист отделения иностранных языков ШБИП:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент ОИЯ	Коротченко Татьяна Валериевна	к.ф.н.		

1 LITERATURE REVIEW

Diabetes is a serious endocrine disease that poses a global medical and social threat to public health, the growth rate of which is acquiring the scale of a global epidemic [1]. According to the IDF (International Diabetes Federation), there are more than three hundred and fifty million people with diabetes mellitus worldwide [2], another two hundred and eighty million have impaired glucose tolerance (impaired carbohydrate metabolism). This does not take into account patients who do not know that they have diabetes, and, as practice shows, they are 3-4 times more than those who have a confirmed disease.

According to studies published in the 1990s, the life expectancy of people with diabetes is typically 7,5 years shorter than that of people without diabetes [3]. Now approximately two percent of the world's population suffer from this type of disease, while the number of patients with susceptible diabetes is steadily increasing year by year by an average of 2-6% [4].

In diabetes mellitus, a metabolic disorder occurs, accompanied by an excessively high level of glucose in the blood. Type 1 diabetes (T1D) mellitus refers to a group of diseases that develop because of the progressive destruction of pancreatic beta cells, which leads to a deficiency in proinsulin synthesis and hyperglycemia. Type 2 diabetes (T2D) mellitus refers to a disease that develops in individuals with excessive accumulation of adipose tissue, who have insulin resistance, due to which there is an excessive synthesis of proinsulin, insulin and amylin by pancreatic beta cells [5].

The vast majority of diabetes in childhood is type 1 diabetes, accounting for more than 90% of all cases, and its incidence varies greatly between countries, within countries and between different ethnic populations [8]. Worldwide, the incidence of type 1 diabetes is increasing by about 3–5% per year [9]. However, growth rates and time trends are different, and the increase in the incidence of this type of diabetes has slowed in some countries.

In the case of type 1 diabetes, maintaining basal glucose levels becomes the task of hormone replacement therapy. To prevent a critical glycemic level in the blood, the patient needs to take insulin preparations repeatedly during the day [6]. Such therapy consists in the appointment of prolonged insulin to reduce sugar levels to basal values, as well as periodic injections (most often after each meal) of fast-acting insulin preparations to avoid hyperglycemia. The patient injects the hormone subcutaneously using an insulin syringe, a pen or a special dosing pump. In the absence of proper treatment, T1D develops rapidly and leads to severe complications such as ketoacidosis and diabetic coma [7].

An increase in the incidence and prevalence of type 2 diabetes has been observed since the early 1990s, accounting for a significant proportion of cases of diabetes in young people in certain risk groups [10]. The risk of development increases with overweight/obesity (60% of people with diabetes are overweight and 20% are obese), unhealthy diet, low level of physical activity. Over the years of its course, the disease leads to long-term disability and a significant deterioration in the quality of life. With a steadily growing number of patients and a high risk of dangerous complications, diabetes mellitus is a lifestyle disease. It is one of the most common causes of death in highly developed countries and is a top public health priority.

1.1 History of insulin, meaning and basic structure

For the first time, insulin as an active component was isolated from islet cells of the dog pancreas in 1921 [11], and the belonging to the protein nature of insulin was proved five years later [12]. In the first half of the twentieth century, insulin became the most studied hormone: it was shown that insulin has three disulfide bonds formed by cysteine residues [13]; received the first hormone crystals [14]; established the complete amino acid sequence [15]; published X-ray images of the three-dimensional structure of this protein [16]. In addition, insulin metabolism has been studied in detail, during which the biologically active hormone is formed from

a single-chain precursor of preproinsulin in pancreatic islet cells [17]. The insulin molecule (pI 5.4) formed as a result of the enzymatic cleavage of the precursor, shown in Figure 1.1, consists of two chains, with 21 amino acid residues in the A chain and 30 amino acid residues in the B chain [18]. Both hormone chains are connected via two disulfide bridges; also in the A-chain, there is a third, intramolecular disulfide bond. The insulin A-chain forms two antiparallel α -helices; in turn, the B-chain contains 1 α -helix and one β -sheet [19].

At low concentrations of insulin molecules, a monomeric liquid represents it; however, in most pharmaceutical formulations, the hormone forms a dimer. When glucose is suspected and waiting for zinc cations, three insulin dimers are grouped into a hexamer [20]. The formation of hexamers gives an effective protein load in the pancreatic storage vesicles, helping to ensure efficient conversion of preproinsulin to insulin and may be protein ingested and denatured [21].

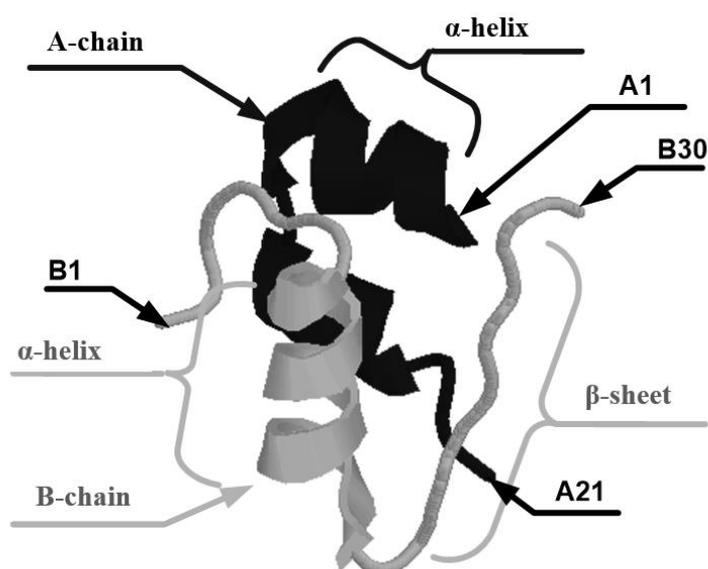


Figure 1.1 - The spatial structure of the insulin molecule

Sieber and coworkers carried out the first complete chemical synthesis of human insulin in 1974 [22], where it was shown to be biologically equivalent to the natural hormone [23]. The breakthrough that allowed the large-scale production of human insulin was the discovery that the hydrolytic reaction carried out by proteases

can be reversed by carrying out the reaction in a mixture of water and an organic solvent, which allows the formation of peptide bonds [24].

The introduction of recombinant DNA technology meant that by the late 1980s, most human insulin was produced biosynthetically. Recombinant insulin was prepared using the yeast *Escherichia coli* (*E. coli*) or *Saccharomyces cerevisiae*. In the first recombinant human insulin, the A and B chains were produced separately and then combined to produce insulin. Subsequently, it was also obtained through the biosynthetic production of human proinsulin, i.e. inside the expressing cell, which is then enzymatically converted into human insulin [25], [26].

When insulin therapy became widespread and was first introduced into clinical practice, there was a problem with multiple daily injections, since the administered drug had a short pharmacological effect. From the very beginning, there has been a desire to develop new formulations of insulin and explore different routes of administration.

The physical state and size of insulin crystals affect the time of action of the hormone in the human body [27]. Various combinations of amorphous and crystalline insulins make it possible to obtain preparations of ultrafast, fast, intermediate and prolonged action. For example, it has been demonstrated that an increase in the concentration of zinc, the size of insulin crystals, as well as a change in the content of highly basic protamine polypeptides in the preparation increases the duration of the sugar-lowering effect, which makes it possible to obtain such forms of insulin as intermediate-acting NPH insulin (NPH, neutral protamine Hagedorn; suspension crystalline zinc-insulin in an isophane ratio to protamine proteins) [28], a longer action of Lente and, finally, Ultralente, in which a high concentration of zinc leads to an ultra-long sugar-lowering effect of the drug [29].

However, it has been shown that protamine polypeptides can be immunogenic, and that their use for medical purposes can lead to the formation of antibodies [30]. Moreover, it has been proven that the protamine complex with insulin itself also induces the formation of antibodies during long-term therapy with NPH-insulin [31].

Another way to prolong the effect of insulin is the use of soluble forms, devoid of the disadvantage associated with immunogenicity. The duration of action of such a drug is achieved, because the insulin solution has a pH value below physiological. Therefore, after injection of the drug, insulin will precipitate as the pH rises and subsequently dissolve.

1.2 Insulin glargine

Glargine is a long-acting insulin analog marketed by Aventis Pharmaceuticals under the trade name Lantus [32]. The prolongation of the properties of the drug was achieved by replacing asparagine A21 with glycine and adding the B-chain to two amino acid residues of arginine (Figure 1.2) [33]. This led to the fact that the molecule began to form stable hexamers, and the value of the isoelectric point of the protein increased to 6.7 (the isoelectric point of human insulin is 5,4), that is, a value close to blood pH.

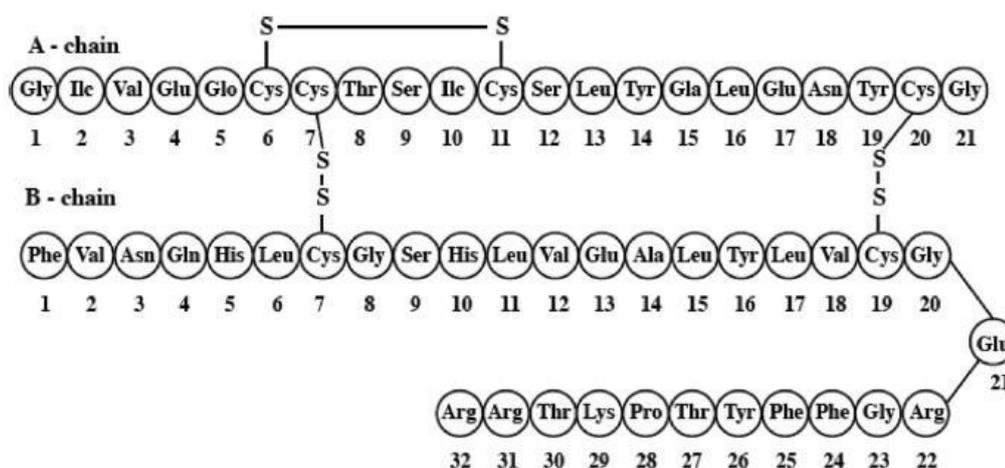


Figure 1.2 - The structure of insulin glargine

Thus, in order for the hexamer to decompose to a monomeric form that exhibits biological activity, it takes time after the administration of the drug. However, due to the values of blood acidity close to the isoelectric point of the protein, absorption slows down and, as a result, the solubility of the drug decreases.

The introduction of a small amount of zinc cations into the preparation also contributes to the slowing down of absorption. It has a duration of action of 24 hours without a peak and shows good glycemic control, which reduces the frequency of nocturnal hypoglycemia. In addition, the additional replacement of asparagine B21 by glycine does not allow deamidation reactions to occur, which makes it possible to store the drug for a long time in a solution with a low pH value [34].

Insulin glargine was approved for use in patients with type 1 and type 2 diabetes by the European Agency for Drug Evaluation in June 2000 and by the US Food and Drug Administration in April 2000 [35]. Patent protection for insulin glargine expired in most countries in 2015 and expires on July 5, 2027 in the US [36].

1.3 Regulations and legislation for biosimilars

When the patents for such a biological product expire, the biosimilar approval process goes through extensive physical and chemical compatibility studies, based on which the state regulator allows the drug to be registered. Therefore, its commercial success depends on the nature of these studies and the confirmed quality of the studied biological agent.

Biopharmaceuticals are large recombinant proteins, such as human insulin (5,8 kDa), filgrastim (18,8 kDa), and rituximab (145 kDa), compared to most generics, which are typically much smaller, such as aspirin (180 Da) and omeprazole (345 Da). The complexity of a biological drug is determined both by the nature of the drug molecule itself and by the manufacturing process. Manufacturing protocols are the property of the originating pharmaceutical company, so biosimilar manufacturers cannot duplicate the manufacturing process of a reference drug. Minor changes in manufacturing processes can change the biological function of a product.

The Common Technical Document (CTD) is part of the ICH (International Conference on Harmonization) program to develop globally harmonized guidelines

on the content and format of applications for new medicinal and biological products to be submitted to regulatory authorities in the ICH regions. The CTD is divided into five main modules, shown in Figure 1.3, three of which provide detailed information on quality, safety and efficacy. Quality represents module III, which contains information about the substance and dosage form, formulation development and transfer, production, analytical methods for quality control, etc. Safety, in general, determines module IV, which contains data on preclinical studies of specific pharmacological activity in animals, pharmacokinetics and pharmacodynamics in animals, acute, subacute and chronic toxicity in animals, mutagenic and allergenic effects, etc. The effectiveness is presented in module V, which contains information on all clinical trials. Module II of the dossier contains a summary of modules III, IV and V, while module I is a country-specific module. Contains an application for registration, a description of the packaging, instructions for medical use and other information specific to each country.

One of the main modules of the general technical document, as shown in Figure 3, is the third block "Quality". Module 3 of the CTD contains sections on both drug substance (active ingredient) and drug product, each of which contains the necessary technical information data about the drug, processes and key parameters, as well as various rationales supported by research.

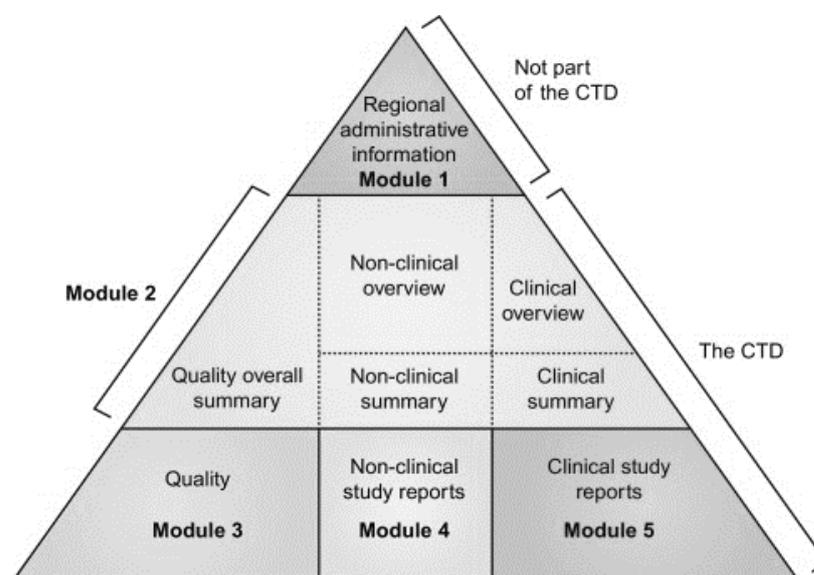


Figure 1.3 - Organization and structure of the general technical document

These data and these reports provide detailed evidence that drug characteristics are well defined and well controlled so that the next batch produced can be guaranteed to be essentially the same as the previous batch. Drug production control and reproducibility is an important message that Module 3 has to convey.

As part of the control strategy, it is necessary to understand and establish the critical elements of the process, one of which is the establishment and analysis of critical process parameters (CPP) that affect critical quality attributes (CQA) during the entire production cycle.

1.4 Manufacturing processes for recombinant human insulin and insulin analogues

All steps in the production and purification of human insulin and insulin analogs such as insulin glargine have the potential to introduce variability that can affect the biological and clinical properties of such a drug [39]. The technology for the production of biopharmaceuticals of this type can be divided into two main processes: the upstream process (UPS) and the downstream process (DSP) (Figure 1.4).

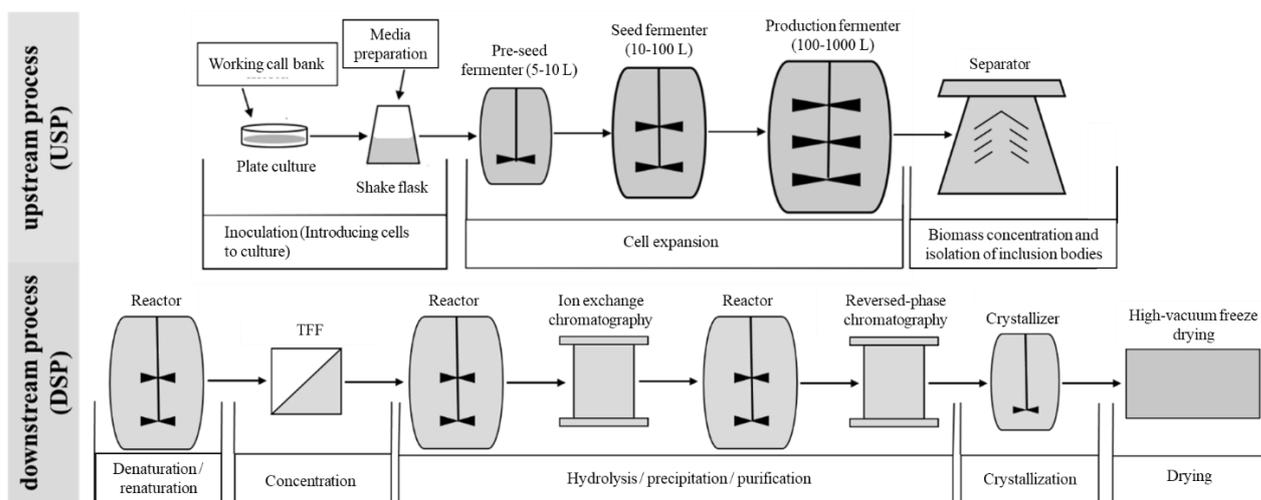


Figure 1.4 - Block diagram of the technology for the production of recombinant proteins, illustrating upstream and downstream bioprocesses

USP (upstream process) represents the production of cell biomass required for the production of biopharmaceuticals or other biomolecules, and includes the selection of cell line, culture medium, growth parameters, as well as process optimization to achieve optimal cell growth conditions for biopharmaceutical production.. The main goal of the bottom-up process is the conversion of substrates into desired products of the expected [40]. This requires well-controlled conditions and involves the use of large-scale bioreactors. Several factors should be taken into account, such as the type of process (batch, fed-batch, continuous, etc.), temperature, pH and oxygen control, sterilization of natural materials and equipment to protect the environment from pollution and pollution.

The DSP (Downstream Process) includes all the steps necessary to purify the biological substance from the cell culture to the final purified product. It includes several cases to capture the isolation of biomolecules and to isolate host cell related impurities (for instance host cell products, DNA, etc.), processing impurities (e.g. buffers, leached ligands, defoamer, etc.) and impurities associated with the product (e.g. aggregates, fragments, cut particles, etc.).

At each purification step, one or more classes of impurities can be removed. Post-processing usually involves three main steps, namely:

- 1) initial extraction (extraction or isolation);
- 2) purification (removal of most contaminants);
- 3) polishing (removal of certain contaminants and undesirable forms of the target biomolecule, which may be formed during isolation and purification).

Initial recovery involves separation between cells and supernatant (clarification). For this, centrifugation, filtration, sedimentation and flocculation are mainly used. If the target biomolecule is produced extracellularly, the culture fluid is subjected to concentration (for example ultrafiltration) followed by purification. For example, secreted and soluble proteins in the *P.pastoris* culture medium can be isolated directly by centrifugation. The samples can then be concentrated and the target protein purified from the supernatant by processes such as ultrafiltration, precipitation, or chromatography [41]. For intracellular biomolecules, the harvested

cells must be subjected to disruption (e.g. high-pressure homogenization, sonication, milling, presses, etc.) followed by clarification to remove cellular debris. The target biomolecule is purified from the cell homogenate (usually by precipitation and/or chromatography). In the case where proteins are expressed as inclusion bodies (as in some recombinants produced by *E.coli*), an additional protein refolding step (buffer exchange) is required. These additional steps greatly contribute to the increase in production time and costs for intracellular biomolecules.

Efficient recovery and purification of biopharmaceuticals is considered a critical part of the manufacturing process. The purification process must be robust, easily scalable, and capable of removing both process and product-related contaminants to ensure product safety. Purity achieved, process development parameters, and overall recovery yield are key points to consider in downstream processes.