

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(прізвище та ініціали)

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ

(підпис)

(прізвище та ініціали)

«___» лютий 2022 р.

«___» лютий 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Сучасні підходи до розробки противірусних вакцин

Виконав: здобувач II курсу, групи 2

Губецький Андрій Сергійович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Стабнікова Олена Всеволодівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти _____

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Смітюх Я. В.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2022 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(шифр і назва)

Освітньо-професійна програма: «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

_____ Стабніков В.П.

«03» листопада 2021 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Губецькому Андрію Сергійовичу

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: Сучасні підходи до розробки противірусних вакцин

керівник роботи Стабнікова Олена Всеволодівна, доц., к.т.н.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом вищого навчального закладу від «02» листопада 2021 року № 865-кс

2. Строк подання здобувачем роботи _____ 2021 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Escherichia coli* BL21, цільовий продукт: вірусний білок гепатиту Е

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. Біотехнологія отримання вірус-подібних частинок. РОЗДІЛ 2. Вакцини на основі вірус-подібних частинок. РОЗДІЛ 3. Прогрес досліджень вакцин на основі вірус-подібних частинок. РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску вірусного білку для лікарського засобу та виробництва готової форми вакцини. РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу вірусного білку та технологічної схеми виробництва вакцини. РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу. РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва вакцини.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема виробництва вірусного білку та вакцини – 2 аркуша формату А1. Апаратурна схема виробництва вірусного білку та вакцини – 2 аркуша формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання «03» листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Біотехнологія отримання вірус-подібних частинок	02.11.2021-05.11.2021	
2.	Вакцини на основі вірус-подібних частинок	06.11.2021-15.11.2021	
3.	Особливості технології виробництва ЕПС	16.11.2021-19.11.2021	
4.	Техніко-економічне обґрунтування випуску вірусного білку для лікарського засобу та виробництва готової форми вакцини	20.11.2021-22.11.2021	
5.	Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу вірусного білку та технологічної схеми виробництва вакцини	23.11.2021-28.11.2021	
6.	Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу	29.11.2021-02.12.2021	
7.	Опис технологічного процесу виробництва вакцини	03.12.2021-10.12.2021	
8.	Оформлення пояснювальної записки	11.12.2021-20.12.2021	
9.	Виконання графічної частини проекту	21.12.2021-26.12.2021	

Здобувач

_____ Губецький А.С.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Керівник роботи

_____ Стабнікова О.В.
(підпис) (прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці фармацевтичного препарату вакцини проти вірусу гепатиту Е. Суть цієї розробки полягає у використанні технології вірусоподібних частинок для виробництва ефективного лікарського засобу з мінімальними негативними побічними ефектами. Спираючись на зростаючу статистику гепатиту Е по всьому світі, запропоновано розробити препарат на основі китайської вакцини Hecolin. Як біологічний агент використовується *Escherichia coli* BL21, який синтезує 30 мг/л вірусного білку. Порівняно з іншими мікроорганізмами, даний показник є найвищим.

Як лікарська форма обрано скляні ампули, зважаючи на термін використання вакцини, а також на захворюваність в країні. Оригінальний препарат Hecolin виробляється одразу в шприцах, що є доволі зручною формою. Але ми орієнтуємося на українського споживача, тому використовуємо звичайні скляні ампули. Як основний матеріал обрано скло НС-3.

Кваліфікаційна робота розглядає виробничий біосинтез, відокремлення та очищення вірусного білку, а також виробництво вакцини проти вірусу гепатиту Е. Розроблено аналітично-нормативна документація до препарату. Окремо звертається увага на мінімальний допустимий вік, який становить не менше 16 років.

Кваліфікаційна робота включає в себе 106 сторінок друкованого тексту, включаючи 15 таблиць та 5 рисунків, складається з вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (141 найменувань) та графічної частини (4 листа формату А1).

Ключові слова: вірусоподібні частинки, вакцина, вірус гепатиту Е, інфекційні захворювання, Hecolin, *Escherichia coli* BL21, експресія генів, вірусний білок.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ВСТУП	7

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ВІРУС-ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК	10
--	----

1.1. Типи вірус-подібних частинок.....	10
1.2. Методи виробництва вірус-подібних частинок.....	11
1.2.1. Бактерії та дріжді.....	12
1.2.2. Система експресії бакуловірусу. Клітини комах.....	13
1.2.3. Клітини ссавців.....	14
1.2.4. Рослини.....	15
1.3. Методи культивування.....	16

РОЗДІЛ 2. ВАКЦИНИ НА ОСНОВІ ВІРУС-ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК	18
--	----

2.1. Рекombінантна вакцина проти вірусу гепатиту В	18
2.2. Вакцини із вірус-подібними частинками проти вірусу папіломи людини (ВПЛ).....	23
2.3. Рекombінантна вакцина проти вірусу гепатиту Е.....	24
2.4. Вакцина проти вірусу імуннодефіциту людини (ВІЛ).....	25
2.5. Вакцина проти парвовірусу людини.....	26
2.6. Вакцина проти норовірусу.....	26
2.7. Вакцина проти важкого гострого респіраторного синдрому, спричиненого коронавірусом (SARS-CoV).....	26
2.8. Вакцина проти малярії.....	27
2.9. Вакцина проти вірусу грипу А.....	27

РОЗДІЛ 3. ПРОГРЕС ДОСЛІДЖЕНЬ ВАКЦИН НА ОСНОВІ ВІРУС-ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК	28
--	----

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ
ВІРУСНОГО БІЛКУ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ВИРОБНИЦТВА
ГОТОВОЇ ФОРМИ
ВАКЦИНИ.....40

4.1. Передумови виробництва вакцини.....	40
4.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей ВПЧ вакцини, галузей використання.....	40
4.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	42
4.1.3. Вибір форми випуску вакцини.....	45
4.1.4. Опис вакцини проти гепатиту Е згідно АНД.....	46
4.1.5. Розрахунок річної потужності та кількості серій на рік.....	55
4.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску вакцини.....	56
4.2.1. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників субстанції.....	56
4.2.2. Розрахунок річної потужності виробництва вірусного білку, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	57

РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
БІОСИНТЕЗУ ВІРУСНОГО БІЛКУ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ.....60

5.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування.....	60
5.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера.....	63
5.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення вірусного білку для виробництва вакцини.....	65
5.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва вакцини, вибору первинної упаковки.....	71

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО
БІОСИНТЕЗУ.....76

6.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу.....	76
6.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу.....	78
6.3. Контроль ділянки біосинтезу.....	83

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ.....	92
7.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва вакцини.....	92
7.2. Опис технологічного процесу виробництва вакцини.....	94
7.2.1. Опис допоміжних робіт.....	94
7.2.2. Опис основних стадій процесу виробництва вакцини.....	99
7.3. Контроль ділянки виробництва вакцини.....	102
ВИСНОВКИ.....	105
ЛІТЕРАТУРА.....	106
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Протягом останнього десятиліття інфекційні хвороби виявляли значний вплив на статистику захворюваності й смертності населення, і вимагали значних витрат коштів національних органів охорони здоров'я [1].

На сьогодні у практичній системі охорони здоров'я застосовуються вакцини, розроблені багато років тому, але удосконалені з розвитком імунології через необхідність підвищення їх безпеки, переносимості й ефективності. В результаті з'явилися продукти з покращеними характеристиками, але виробництво яких неможливе без ускладнення технологічних процесів. В той же час, деякі розроблені десятки років тому препарати, наприклад, вакцину проти грипу, досі отримують за допомогою застарілих методів [1].

Метою сучасної імунології є створення вакцин, що одержуються за допомогою сучасних технологічних процесів, значними обсягами й зі швидкістю, яка дозволяє задовольнити існуючі потреби при заходах масової вакцинації [1].

Вакцина – медичний препарат, призначений для створення в організмі прищеплених людей чи тварин активного імунітету до інфекційних хвороб. Залежно від механізмів формування розрізняють імунітет спадковий і набутий. Спадковий іноді називають видовим, оскільки він притаманний усім особам даного виду і передається від покоління до покоління. Набутий імунітет не успадковується, і формується в результаті перенесеної інфекційної хвороби або внаслідок імунізації [1].

Завдяки ДНК-рекомбінантним технологіям були створені вакцини, що містять вірусоподібні частинки. VLP утворюються в результаті самозбирання капсидних білків вірусів при їх внесенні в клітинну культуру. Вакцини на основі VLP мають ряд переваг порівняно з вакцинами інших типів. По-перше, вони складаються з частинок, що містять багато однакових копій антигенів, у

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ВСТУП</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>		<i>Губецький А.С.</i>						
<i>Перевір.</i>		<i>Стабнікова О.В.</i>					7	105
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

структуру яких входять епітопи, що взаємодіють з антитілами. Це забезпечує ефективну активацію як гуморальної, так і клітинної імунної відповіді, у тому числі формування специфічних цитотоксичних лімфоцитів. По-друге, вірусоподібні частки не містять вірусних нуклеїнових кислот і не здатні до самовідтворення, що забезпечує їх безпечність. По-третє, VLP-вакцини ефективні при нанесенні на слизові оболонки, у тому числі ротової порожнини. І, нарешті, існує багато варіантів синтезу таких частинок. Для цього можна використовувати культури клітин ссавців, комах, рослин, а також дріжджі й бактерії. Це забезпечує можливість підбору умов виробництва відповідно до специфічних вимог, що пред'являються до кожного конкретного продукту [2].

Нині, вакцини проти вірусу папіломи людини (ВПЛ) засновані на вірусоподібних частинках, які утворені компонентами поверхні ВПЛ. Як вже було наведено вище, вірусоподібні частки не мають патогенної дії, але мають виражений імуногенний ефект, що означає, що вони викликають високий рівень продукування антитіл організмом. Це робить вакцини даного типу високоефективними [3].

Чимало розробок вакцин за даною методикою. Наразі активно привернуто увагу до створення вакцин проти гепатиту Е (HEV). На базі вірусоподібних часток вже існує певна кількість таких препаратів. Частинок, подібні до вірусу гепатиту Е є потенційними кандидатами на вакцину проти HEV-інфекції. В результаті VLP не здатні реплікуватися і викликати захворювання, що є безпечними платформами вакцин. Наразі рекомбінантна вакцина на основі VLP Hecolin® проти HEV ліцензована лише в Китаї [4].

Гепатит Е, як і раніше, викликає пильний інтерес як у органів охорони здоров'я, так і у дослідників усього світу. Щорічно фіксується близько 20 млн. випадків інфікування вірусом гепатиту Е, з них 3,3 млн. з клінічними проявами. При цьому понад 40 тис. випадків HEV на рік завершується загибеллю хворих [1, 2]. Ці показники дозволяють вважати HEV лідером серед усіх вірусних гепатитів із захворюваності та смертності у світі [5].

Практично у всіх країнах Європи, Росії та США відзначено зростання офіційно реєстрованих випадків HEV. За даними Європейського Союзу, кількість хворих на HEV за 10 років (з 2005 по 2015 р.) зросла більш ніж у 10 разів (відповідно 514 та 5617 випадків). Більшість випадків HEV зареєстровано у чоловіків віком понад 50 років. У Німеччині у 2001 р. показник захворюваності становив 0,1 на 100 тис. населення (31 хворий), у 2016 р. він досяг показника 2,5 на 100 тис. населення (1991 хворий). При цьому сталося різке збільшення частки випадків HEV, визначених як автохтонні, тобто місцеві [5].

У Великій Британії кількість хворих на HEV з 2010 по 2016 р. також зросла в 3,5 рази (368 і 1243 відповідно). Крім того, наприкінці 2017 р. - на початку 2018 р. у засобах масової інформації Великобританії з'явилися повідомлення, що справжня кількість випадків HEV в країні перевищує 200 тис. Такий високий рівень захворюваності асоціювали з вживанням м'яса свиней, заражених HEV особливим варіантом генотипу [5].

За даними ВООЗ, сьогодні за рівнем реєстрованої захворюваності на HEV вийшов на перше місце у світі. Значимість цієї інфекції надає виявлення її ролі в патології людини не тільки в країнах з спекотним (країни, що розвиваються), але і в країнах з помірним кліматом (з розвинутою економікою). Такі особливості HEV, як висока летальність серед вагітних, можливість розвитку хронічного HEV, непечінкові прояви (захворювання нервової системи), ураження людей старшого віку, визначають інтерес до цієї інфекції. Причини зростання захворюваності на HEV в країнах з помірним кліматом остаточно не визначено. Очевидно, має місце як поліпшення діагностики HEV, і справжнє збільшення кількості випадків [5].

Тому, спираючись на все вищенаведене, існує потреба у розробці вакцини на основі ВПЧ проти гепатиту Е, хвороби, яка все більше й більше розвивається та поширюється на різних територіях, зважаючи, в першу чергу, на підвищення температури клімату.

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ВІРУС-ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК

Вірус-подібні частинки (ВПЧ) - це наноструктури, що нагадують за будовою структуру вірусів. Вони складаються одного або декількох структурних білків, що можуть бути розташовані в декілька шарів, а також можуть мати зовнішню ліпідну оболонку. ВПЧ викликають сильну гуморальну та клітинну імунну відповідь завдяки своїм повторюваним структурам. Ключовим фактором безпеки ВПЧ є відсутність вірусного геномного матеріалу, що підвищує безпеку як під час виробництва, так і під час застосування. Сучасне виробництво ВПЧ може користуватися перевагами декількох систем експресії – це клітини бактерій, дріжджів, комах та ссавців. Вибір виробничої платформи залежить від кількох факторів, в тому числі вартість та потреба у посттрансляційних модифікаціях (ПТМ), якщо вони необхідні для формування оптимальної імунної відповіді. Деякі вакцини на основі ВПЧ для профілактики декількох інфекційних захворювань вже затверджені та пропонуються на ринку. Є також багато інших вакцин, що знаходяться на стадії клінічних випробувань чи стадії розробки. Інтерес до цієї технології останнім часом зріс завдяки її перевагам перед класичними вакцинами. У цьому розділі ми розглянемо сучасні системи виробництва ВПЧ та новітнє покоління, доступних на даний час, вакцин на основі ВПЧ.

1.1. Типи вірус-подібних частинок

Вірус-подібні частинки складаються з одного або декількох структурних білків, які мають здатність самостійно збиратися при рекомбінантному відображенні. Білки можуть розташовуватися в один, два або три шари [6]. У випадку вірусу папіломи людини (ВПЛ) [7], ВПЧ утворені єдиним структурним протеїном, який утворює основний капсид частинок. Інші більш складні ВПЧ включають кілька структурних білків, наприклад ВПЧ сімейства *Reoviridae*

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 1 БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ВІРУС- ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Губецький А.С.</i>						10	105
<i>Перевір.</i>	<i>Стабнікова О.В.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

мають у своєму складі від 2 до 4 різних білків, розташованих у кілька шарів [1]. ВПЧ також можуть мати зовнішню ліпідну оболонку. В даному випадку структурний протеїн ядра виходить з клітини в процесі поділу, огортаючи капсид в межах частини клітинної мембрани. Це стосується ВІЛ-1 ВПЧ, які утворюються поліпротеїном Gag і беруть частину клітинної мембрани хазяїна як оболонку [8]. Також є ВПЧ грипу утворені білковим ядром і шипоподібними відростками гемаглютиніну, які відображаються на його поверхні [9]. Отже, правильний вибір клітиної лінії для продукування ВПЧ є дуже важливим, оскільки вони будуть містити білки, що експресуються на мембрані клітин-продуцентів.

Нещодавно був винайдений новий тип ВПЧ, так звані "химерні ВПЧ". Їх структура складається з вірусного білка, тоді як білки оболонки походять від іншого вірусу. Нещодавно були розроблені ВПЧ свинячого цирковірусу другого типу із відображенням вірусу свинячого репродуктивно-дихального синдрому GP5 епітоп В [10]. Це відкриття дає можливість використовувати ВПЧ як систему доставки. Протеїни оболонки можуть виступати подразниками для специфічних тканинних рецепторів. Таким чином, ВПЧ можуть бути націлені на певну тканину, якщо зв'язати капсидні білки з компонентами, які необхідно доставити до цільової тканини. Отже, ВПЧ мають нові перспективи застосування у доставці ліків, генній терапії та лікуванні раку [11].

1.2. Методи виробництва вірус-подібних частинок

При виборі система експресії для виробництва ВПЧ необхідно враховувати умови складання білка та можливість посттрансляційних модифікацій. Існує кілька доступних систем експресії. Основні переваги та недоліки кожної системи узагальнено в таблиці 1.1.

Переваги та недоліки систем експресії ВПЧ

Виробнича платформа	Переваги	Недоліки
Бактерії	<ul style="list-style-type: none"> - простота експресії - можливість масштабування - низька собівартість продукції 	<ul style="list-style-type: none"> - не допускає глікозилування - містить ендотоксини.
Дріжді	<ul style="list-style-type: none"> - простота експресії - можливість масштабування - низька собівартість продукції 	<ul style="list-style-type: none"> - невідповідне глікозилування протеїну - існує ризик неправильного складання
Клітини комах	<ul style="list-style-type: none"> - можуть продукувати велику кількість правильно зібраних ВПЧ при високій щільності культур клітин - можливість масштабування - ризик утворення патогенів зведений до мінімуму у порівнянні з культурою клітин ссавців - компоненти клітин комах та бакуловірусу можуть виступати в ролі вакцинних ад'ювантів, що допомагає викликати більш ефективну імунну відповідь 	<ul style="list-style-type: none"> - обмежена висока манозна модифікація глікопротеїну - важко усунути контамінацію бакуловірусом - компоненти клітини комах чи бакуловірусу можуть маскувати необхідний для імунної відповіді епітоп
Клітини ссавців	<ul style="list-style-type: none"> - клітини-продуценти, тісніше пов'язані з природним господарем - відповідні пост-трансляційні модифікації та автентичне збирання ВПЧ 	<ul style="list-style-type: none"> - висока собівартість продукції - низька продуктивність
Рослини	<ul style="list-style-type: none"> - простота експресії - можливість масштабування - відсутність контамінації вірусами людини 	<ul style="list-style-type: none"> - неможливо пройти збирання пост-трансляційних модифікацій та ВПЧ - низькі рівні експресії - стабільна деградація антигену

1.2.1. Бактерії та дріжді

Бактерії та дріжджі представляють собою легко масштабовані та економічно ефективні виробничі системи. Бактерії є більш підходящою експресійною

системою для ВПЧ, які сформовані лише з одним або двома структурними білками і не мають оболонки. Головна перевага - висока врожайність білків; проте бактерії не здатні виконувати посттрансляційні модифікації, що може бути дуже важливими для імуногенності ВПЧ [12]. Виробництво ВПЧ вірусу папіломи людини типу 16 L1 було успішно проведено за допомогою *Lactobacillus casei*, де для підтвердження наявності конформаційних епітопів була використана імунофлюоресценція [13]. І навпаки, бактерії *Escherichia coli* використали для виробництва рекомбінантних норовірусних капсидів, що, як було встановлено, можуть мати застосування в антигенних та рецепторно-зв'язуючих дослідженнях, але не як кандидат для вакцини [14].

Здатність дріжджів виконувати посттрансляційні модифікації дало змогу зробити крок вперед у виробництві ВПЧ. Нещодавно ВПЧ вірусу Чікунгуня вироблялися з використанням *Pichia pastoris* та були отримані багатообіцяючі результати щодо імунізації мишей [15]. Дійсно, кілька ВПЧ, що виробляються на дріжджах, вже отримали схвалення контролюючими органами, наприклад ВПЧ вірусу папіломи людини [16]. Тим не менше, їх шаблон посттрансляційних модифікацій не зовсім такий же, як у людини.

1.2.2. Система експресії бакуловірусу. Клітини комах

Процес системи Бакуловірус/клітини комах поділяється на дві фази: фаза інфікування та фаза виробництва. Проектування бакуловірусу – це швидка і проста процедура, яка робить його придатним для виробництва вакцин проти вірусів, поверхневий білок яких може легко змінюватися [17]. Система Бакуловірус/клітини комах здатна виробляти порівнянно таку ж кількість білка, як і та кількість, що досягається за допомогою бактерій або дріжджів, але його здатність виконувати складні посттрансляційні модифікації більша [12]. Для виробництва рекомбінантного білка з використанням системи експресії Бакуловірус/клітини комах використовується дві основні лінії клітин комах – це Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) та клітини High Five (*Trichoplusia ni*). Багато типів ВПЧ було виготовлено із використанням системи Бакуловірус/клітини комах, зокрема вірусу Чікунгуня, ВІЛ або свинячі парвовірусоподібні частинки [18, 19]. Основним

недоліком є те, що оболонки бакуловірусів утворюються одночасно з ВПЧ, що робить процес очищення складнішим і дорожчим [9].

В даний час існують інші платформи для виробництва ВПЧ без використання бакуловірусу, що спрощує очищення. Стабільні клітинні лінії можуть безперервно експресувати необхідні білки. ВПЧ ВІЛ-1 продукуються на стабільно трансфікованих клітинах S2 *Drosophila* [20]. Якщо вироблений білок має цитотоксичний ефект, він може регулюватися індукційним промотором. Перехідна трансфекція також може проводитися в клітинах комах. Cellfectin був використаний для виробництва ВПЧ грипу А, що складаються з гемаглютиніну (НА) та матричного білка (М1) у клітинах Sf9 [21]. У іншому дослідженні випробовували використання для продукції рекомбінантного протеїну в клітинах комах дешевших реагентів для трансфекції, таких як поліетиленімін (PEI) [22].

1.2.3. Клітини ссавців

Існує кілька типів клітин ссавців придатних для виробництва ВПЧ. Хоча у клітинах ссавців продуктивність виробництва білка менша порівняно з іншими системами, вони краще придатні до більш складних та точних посттрансляційних модифікацій [23]. З цієї причини клітини ссавців, як правило, використовують для отримання складних ВПЧ з оболонкою, що складаються з безлічі структурних протеїнів. Існує кілька клітинних ліній ссавців доступних для виробництва рекомбінантного білка і пристосовані для росту в суспензійних безсироваткових хімічно-визначених середовищах [24]. Однією з найбільш широко використовуваних є клітинна лінія яєчників китайського хом'яка (Chinese Hamster Ovary (CHO)). Перевага полягає у тому, що в порівнянні з іншими клітинними лініями ссавців вона не походить від людини, а отже, представляє менший ризик забруднення вірусами людини [25]. Клітини CHO вже використовувались для генерація хантавірус-подібних частинок, які змогли індукувати специфічна імунна відповідь у мишей [26]. Клітинна лінія НЕК 293 є ще однією широко використовуваною виробничою платформою, яка була протестована для виробництва багатьох різних типів ВПЧ, таких вірусів як сказ, ВІЛ та грип [8, 27, 28]. Інші клітинні лінії людини, розглядаються для виробництва складних

рекомбінантних білків. Клітини САР-Т, що отримані з навколоплідних вод людини, використовують для виробництва ВПЧ ВІЛ-1 [29].

Існує два методи отримання ВПЧ у клітинних культурах ссавців. Класичним методом є генерація стабільної клітинної лінії, в яку інтегрований ген, що кодує необхідний білок. Цей процес починається з трансфекції культури клітин, після чого відбираються клони з кращими продукуючими можливостями [27]. Через шість місяців може бути отримана стабільна клітинна лінія. Перехідна трансфекція - набагато швидший процес. У такому випадку, ВПЧ можна збирати приблизно від 48 до 72 годин після трансфекції [8], виробляючи значну кількість продукту протягом двох тижнів. Цей процес слушний, коли є необхідність у невеликих кількостях різних ВПЧ, наприклад, на початкових фазах досліджень, або коли один з білків ВПЧ токсичний для клітинної лінії виробника.

1.2.4. Рослини

Трансгенні рослини також використовувались для виробництва ВПЧ. *Agrobacterium tumefaciens* зазвичай використовується для зараження та трансформація клітин [30]. Ці бактерії можуть заразити рослинні клітини та вводять специфічний ген у геном хазяїна. Існує кілька прикладів виробництва ВПЧ на рослинах, такі як вірусу папіломи людини тип 16 або грипу [31,32]. Найчастіше для виробництва рекомбінантного білка використовуються такі рослини, як *Nicotiana tabacum* та *Arabidopsis thaliana*, іноді це клітини картоплі або помідора.

1.2.5. Порівняння продуктивності

Порівняння продуктивності різних систем не завжди просте, оскільки ефективність виробництва залежить не тільки від системи, а також щодо складності ВПЧ. Тим не менше, можна оцінити широкий діапазон продуктивності. Вище зазначалося, що бактерії та дріжджі є висококонцентраційними виробничими системами, і їх врожайність може варіюватися від 0,75 до 700 мг білка на мл культури. Системи на основі тварин досягають нижчої продуктивності: від 0,2 до 18 мг/мл у випадку системи Бакуловірус/клітини комах і від 0,018 до 10 мг/мл для технології клітин ссавців. Клітини тварин, як правило, мають нижчий рівень продуктивності ВПЧ, але вони стали вибору для виробництва складних ВПЧ.

Трансгенні рослини найважче порівняти з іншими систем, оскільки їх виробництво, як правило, розраховується на мг рослинної тканина, урожайність коливається від 4 до 2380 пг/мг тканини.

1.3. Методи культивування

Для виробництва ВПЧ існує три різні режими культивування: періодичне, періодичне з підживленням та безперервне культивування. При періодичному методі всі необхідні елементи додаються на початку культивування. Це має перевагу, коли середовище добре використовується і продукт є висококонцентрованим. Це метод найчастіше застосовується для виробництва багатьох типів ВПЧ, в тому числі ВПЧ ВІЛ [29], вірусу Чікунгунья [18] і вірусу Ебола [33]. Для продовження експоненціальної фази зростання може бути використаний режим періодичний з підживленням. При цьому невелика кількість поживних речовин або середовища додаються під час культивування для постачання клітин специфічним компонентами, коли ті закінчуються. Періодичне з підживленням культивування можна використовувати для досягнення високих концентрацій клітин. Цей метод культивування був випробуваний при виробництві парвовірусоподібних частинок в системі Бакуловірус/клітини комах.

Нарешті, в режимі безперервного культивування додається свіже середовище в той час як використане середовище відбирається. За допомогою цього методу реалізується безперервне виробництво, і продукт має зберігатися за належних умов поки він виробляється. Концентрації продукт залишаються такими ж, як і в періодичному методі, але загальна кількість виходить більшою. Однак, для безперервного виробництва потрібні великі кількості середовища, що створює певні труднощі в адаптації цього методу до великого виробництва. Нещодавно для виробництва ВПЧ ВІЛ-1 було використано нову виробничу стратегію, названу розширеною генною експресією (Extended Gene Expression(EGE)), що використовує клітинну лінію ссавців НЕК 293 та транзиторну трансфекцію. У цьому випадку клітинне середовище НЕК 293 оновлювалось кожні 48 год, також проводили два раунди ресфекції в колбі Ерленмейера [34]. Безперервне культивування також використовувалося для отримання ВПЧ вірусу сказу у НЕК

293. Клітинна лінія НЕК 293 була використана для стабільної експресії ВПЧ у п'яти літровому біореакторі [27].

Методи періодичне з підживленням та безперервне культивування можуть використовуватися, коли гени, що кодують білки ВПЧ, стабільно експресуються в клітинній лінії регульовані індуктивними промоторами. Після досягнення високої щільності вирощуваних клітин, експресія генів індукується з отриманням більш високих концентрацій білка [35].

Зазвичай для виробництва рекомбінантних білків використовують біореактори з нержавіючої сталі. Тим не менше, технології одноразового використання набуває все більшого значення у виробництві біофармацевтичних препаратів. Найбільш придатні для малих та середніх масштабів виробництва, вони мають певні переваги для виробництва ВПЧ. Ця технологія не вимагає процесів очищення та стерилізації, і виключає перехресне забруднення. Повідомляється, що використання одноразових біореакторів значно зменшує як інвестиції, так і експлуатаційні витрати. З максимальним обсягом виробництва 200 літрів, одноразові реактори менш придатні для великих обсягів виробництва. Ємності також можуть виділяти деякі речовини до культури клітин, і це отримання може бути лімітуючим фактором у виробництві. Датчики, що необхідні для моніторингу культивування, також недостатньо пристосовані до технології одноразового використання [35].

РОЗДІЛ 2

ВАКЦИНИ НА ОСНОВІ ВІРУС-ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК

В даний час показано, що 110 вірусних білків, отриманих з 35 вірусних сімей, збираються у ВПЧ [36]. На даний час є кілька вакцин на основі ВПЧ, що були дозволені для використання у людей, включаючи Recombivax HB та Engerix-B проти вірусу гепатиту В, Gardasil, Cervarix та Gardasil-9 проти вірусу папіломи людини та Hecolin для вірусу гепатиту Е. Існує також кілька новіших вакцин, що знаходяться на різних стадіях проектування, виробництва та затвердження (Таблиця 2.1).

2.1. Рекомбінантна вакцина проти вірусу гепатиту В

Вірус гепатиту В (ВГВ) - оболонковий ДНК-вірус, що належить до сімействі *Нерадnaviridae*, є основним збудником гепатиту В [37]. Інфікування ВГВ може призвести як до гострого, так і до хронічного гепатиту та суттєво збільшує рівень захворюваності та смертності серед обстежуваних осіб [38]. Згідно з епідеміологічною статистикою, два мільярди людей у світі мають серологічно підтверджений гепатит В, з них 350 мільйонів хворіють на хронічну форму гепатиту В. На даний час вакцинація вакцинами, що засновані на самостійному складанні поверхневих антигенів HBsAg ВГВ у ВПЧ, є найбільш ефективним способом запобігання зараженню ВГВ.

На сьогодні розроблено три покоління вакцин з ВПЧ проти ВГВ. Першим поколінням була вакцина *Нертavax-B*. Гематогенна вакцина проти гепатиту В, що складається з поверхневих частинок антигену вірусу гепатиту В (HBsAg ВПЧ; діаметром ~ 22 нм), що були виділені із зразків крові пацієнтів хворих на гепатит В. По суті, це була інактивована вакцина виготовлена з людської плазми крові, що була взята у людей, які страждали безсимптомною формою хронічного гепатиту В. Через те, що HBsAg і ВГВ обидва присутні в плазмі донора, її потрібно доочистити та інактивувати ультрацентрифугованням,

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Губецький А.С.</i>			РОЗДІЛ 2 ВАКЦИНИ НА ОСНОВІ ВІРУС-ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК					
<i>Перевір.</i>		<i>Стабнікова О.В.</i>						<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									18	105
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

розщепити пепсином, додати сечовину та обробити формальдегідом для отримання високоочищеного HBsAg [39]. Через невизначеність щодо безпеки та джерел походження, її використання поступово було замінено вакцинами другого покоління – Recombivax HB та Engerix-B. Ці вакцини другого покоління проти ВГВ вироблені компаніями Merck та GlaxoSmithKline - є генно-інженерними вакцинами на основі ВПЧ ВГВ [33]. Обидва виробники використовують систему *Saccharomyces cerevisiae* для стабільної експресії HBsAg. У цій системі утворюються частинки приблизно розміром 20 нм і з правильною восьмигранною симетричною структурою. Ці вакцини вважаються більш безпечними і більш імуногенні, ніж вакцина проти гепатиту В першого покоління, і продовжують широко використовуватися по сьогодні [40]. Вакцина третього покоління Sci-B-Vac містить три поверхневі антигени ВГВ – це антигени S, pre-S1 та pre-S2, що експресується у системі клітин ссавців, а саме на культурі клітин яєчників китайських хом'яків (СНО). Порівняно з ВПЧ, що виробляються дріжджовою системою, які містять лише неглікозильовані HBsAg, ці ВПЧ містять суміш глікозильованого та неглікозильованого HBsAg та мають вищу імуногенність. Крім того, вакцина виробляє високі титри анти-HBsAg антитіл та захисні антитіла проти pre-S1 та pre-S2, з хорошою ефективністю та безпекою. Та була схвалена для використання в Ізраїлі та Східній Азії у 2017 році.

Нещодавно нову вакцину проти ВГВ, HepLisav-B, було схвалено для використання серед дорослих у США. Ця вакцина використовує ту саму самозібрану ВПЧ з HBsAg розміром 20 нм, що і попередні три покоління вакцин, але також використовує, як ад'ювант, послідовність CpG 1018. Щеплення з двома дозами протягом місяця призводить до кращого результату, ніж три дози Engerix-B протягом шести місяців. Більше того, імуногенність HepLisav-B вища, ніж у Engerix-B. Тому, як очікується, HepLisav-B стане новою генерацією вакцин проти вірусу гепатиту В [38,41].

Вакцини на основі ВПЧ, що представлені на ринку або знаходяться в клінічній розробці

Вакцина	Система експресії	Ад'ювант	ВПЧ платформа	Антиген	Спосіб застосування	Етап розробки	Джерела
Heptavax-B (Merck & Co.)	Відсутня (походить із плазми)	Алюмінію гідроксид	HBsAg	SHBs	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[39]
Engerix-B® (GSK, Belgium)	Дріжді (<i>S. cerevisiae</i>)	Алюмінію гідроксид	HBsAg	SHBs	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[40]
Recombivax HB (H-B-Vax®II) (Merck & Co., USA)	Дріжді (<i>S. cerevisiae</i>)	Алюмінію гідроксид	HBsAg	SHBs	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[41]
Sci-B-Vac® (Bio-Nep-B®) (SciGen, Israel)	Клітини ссавців (CHO клітини)	Алюмінію гідроксид	HBsAg	SHBs, MHBs, LHBs	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[42]
Heplisav-B (Dynavax)	Дріжді (<i>H. polymorpha</i>)	1018 ISS	HBsAg	SHBs	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[43, 44]
Fendrix® (GSK, Belgium)	Дріжді (<i>S. cerevisiae</i>)	AS04 (Алюмінію гідроксид і MPL)	HBsAg	SHBs	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[45]
Hepavax-Gene® (Crucell)	Дріжді (<i>H. polymorpha</i>)	Алюмінію гідроксид	HBsAg	SHBs, MHBs	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[46]
Gardasil® (Merck & Co.)	Дріжді (<i>S. cerevisiae</i>)	Алюмінію гідрокси фосфат	ВПЛ	ВПЛ 6/11/16/18 ВПЧ	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[47]
Cervarix® (GSK)	Клітини комах (High Five™)	AS04 (Алюмінію гідроксид і MPL)	ВПЛ	ВПЛ 16/18 ВПЧ	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[48]
Gardasil-9® (Merck & Co.)	Дріжді (<i>S. cerevisiae</i>)	Алюмінію гідрокси фосфат	ВПЛ	ВПЛ 6/11/16/18/31/33/45/52/58 ВПЧ	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[49]
Cecolin® (Innovax)	Бактерія (<i>E. coli</i>)	Алюмінію гідроксид	ВПЛ	ВПЛ 16/18 ВПЧ	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[50,51]
Cecolin-9® (Innovax)	Бактерія (<i>E. coli</i>)	Алюмінію гідроксид	ВПЛ	ВПЛ 6/11/16/18/31/33/45/52/58 ВПЧ	Внутрішньом'язово	Фаза 2	[52]

Hecolin® (Innovax)	Бактерія (<i>E. coli</i>)	Алюмінію гідроксид	ВГЕ	ВГЕ р239 (аа 439–617)	Внутрішньом'язово	Ліцензована	[53]
rHEV (GSK)	Клітини комах	Алюмінію гідроксид	ВГЕ	ВГЕ (аа 112–607)	Внутрішньом'язово	Фаза 2	[54]
p179 (Changchun Institute of Biological Products Co. Ltd.)	Бактерія (<i>E. coli</i>)	Алюмінію гідроксид	ВГЕ	ВГЕ (аа 439–617)	Внутрішньом'язово	Фаза 1	[55]
tNIV (Novavax)	Клітини комах (Sf-9 клітини)	Matrix-M	Вірус грипу	A/Hong Kong/4801/2014(H3N2) HA	Внутрішньом'язово	Фаза 1/2а	[56,57]
gH1-Qbeta	Бактерія (<i>E. coli</i>)	Відсутній	РНК бактеріофаг Qbeta ВПЧ	A/California/07/2009(H1N1) HA(gH1 домен)	Внутрішньом'язово	Фаза 1	[58]
H5 ВПЧ+GLA вакцина	Рослина	Глікопіранозил ліпідна ад'ювант-стабільна емульсія	<i>Medicago</i> ВПЧ	A/Indonesia/05/2005(H5N1) H5	Внутрішньом'язово	Фаза 2	[59]
RTS,S/AS01 (GSK)	Дріжді (<i>S. cerevisiae</i>)	AS01	HBsAg	<i>Plasmodium falciparum</i> CSP	Внутрішньом'язово	Фаза 3	[60]
R21	Дріжді (дріжджовий штам <i>Pichia pastoris</i>)	Abisco-100 і Matrix-M	HBsAg	<i>Plasmodium falciparum</i> CSP	Внутрішньом'язово	Фаза 1/2а	[61]
Комбінована вакцина норовірус ВПЧ і ротавірус VP6	Клітини комах	Відсутній	Норовірус ГІІ-4 ВПЧ	NoV ГІІ-4 ВПЧ, rVP6	Внутрішньом'язово та інтрадермально	Доклінічні дослідження	[62,63]

Закінчення табл.2.1.

Р2-VP8-Р вакцина (Армійський дослідний інститут ім. Вальтера Ріда)	Бактерія (<i>E. coli</i>)	Алюмінію гідроксид	Штам ротавірусу людини (G1P)	Субодиниця VP8 (aa 64–223) та P2 епітоп правцевого токсину	Внутрішньом'язово	Фаза 1	[64]
Ротавіруси VP 2/6/7 і VP 2/6 (Медичний коледж Байлор, США)	Клітини комах	Відсутній або холерний токсин	ВПЧ ротавірусу	VP 2/6/7 і VP 2/6	Інтраназально	Доклінічні дослідження	[65]
Бівалентна G1.1/GII.4 вакцина (Takeda Pharmaceutical Company Limited)	Клітини комах (клітини Sf-9)	Алюмінію гідроксид і MPL	ВПЧ норовірусу	ВПЧ G1.1, ВПЧ GII.4	Внутрішньом'язово	Фаза 2б	[66]
ВПЧ ентеровірусу 71 С4а	Клітини комах (High Five™)	Алюмінію гідроксид	ВПЧ ентеровірусу 71	EV71 С4а-gp41	Внутрішньом'язово	Доклінічні дослідження	[67]
Тетравалентна вакцина HFMD	Клітини комах	Алгідрогель	ВПЧ EV71, CVA6, CVA10, CVA16	ВПЧ EV71, CVA6, CVA10, CVA16	Інтрапарентерально	Доклінічні дослідження	[68]

Скорочення: HBsAg: гепатит В поверхневий антиген; SHBs: малий поверхневий антиген гепатиту В; BM: внутрішньо м'язово; MHBs: середній Pre-S2 пептид вірусу гепатиту В; LHBs: великий Pre-S1 протеїн оболонки вірусу гепатиту В; ВПЛ: вірус папіломи людини; ВГЕ: вірус гепатиту Е;

На додачу до цих профілактичних вакцин, розробляються також терапевтичні вакцини проти гепатиту В на основі ВПЧ. У 2019 році група науковців продемонструвала, що кілька копій поліпептидних епітопів HBsAg-aa113-135 (SEQ13) можуть відображатися на новому імуно-посиленому ВПЧ носії (CR-T3), що був отриманий з ядра антигену (RBHBsAg) ВГВ круглолистого кажана (*Hipposideros halophyllus*). Цей ядерний антиген може стимулювати специфічну відповідь антитіл опосередкована ВГВ/HBsAg для досягнення кращого терапевтичного ефекту. В даний час проходять подальші дослідження [69].

2.2. Вакцини із вірус-подібними частинками проти вірусу папіломи людини (ВПЛ)

Вірус папіломи людини (ВПЛ) - це сферичний вірус із дволанцюжковою ДНК, який викликає стійку інфекція і є основною причиною раку шийки матки та генітальних бородавок [70]. В даний час на ринку є чотири профілактичні вакцини проти ВПЛ, що виготовленні на основі самотійно зібраних ВПЧ із лише одним протеїном L1 у складі [71]: Gardasil (Merck), Cervarix (GSK), Gardasil-9 (Merck) і Secolin (Innovax). Протеїн L1 є основним структурним білком вірусу і може самотійно збиратися у ВПЧ з високою імуногенністю і здатний провокувати сильна специфічна імунну відповідь [72]. Структурний аналіз показує, що кожен ВПЧ ВПЛ складається із 72 пентамерів L1 (п'ять копій білка L1) з високою індукованою імунною відповіддю [73]. Чотиривалентна вакцина Gardasil (Merck), яка отримала ліцензію на використання в США в 2006 році, головним чином націлена на ВПЛ 6/11/16/18 і забезпечує 100% захисту від вірусної інфекції, викликані цими типами ВПЛ [47]. У 2009 році FDA затвердила двовалентну вакцину Cervarix (GSK). Для виробництва цієї вакцини використовують систему експресії бакуловірусу на клітинах комах, переважно для типів ВПЛ 16/18 [48]. Пізніше, в 2014 році, компанія Merck також випустила дев'ятивалентну вакцину Gardasil-9, яка забезпечує додатковий захист від вірусів ВПЛ 31/33/45/52/58 на додачу до ВПЛ 6/11/16/18, що надавав Gardasil. Однак, щоб індукувати рівні антитіл близькі до Gardasil, Gardasil-9 має більший вміст

антигену L1 та ад'ювант алюмінію, ніж у Gardasil [49]. Серед трьох вакцин Cervarix має найнижчу концентрацію антигену, але водночас забезпечує кращу імуногенність та довгостроковість захисту від ВПЛ 16 та 18. Це тому, що Cervarix має нову ад'ювантну систему AS04, яка несе агоніст TLR4 монофосфорил ліпід А (MPL), який безпосередньо стимулює антигенпрезентацію клітин (APCs) [48].

Для більшості країн, що розвиваються, вакцини, що виробляють за допомогою еукаріотичних експресійних систем, недоступні. Нещодавно була розроблена рекомбінантна двовалентна вакцина проти ВПЛ типу 16/18 (Cecolin) з використанням системи експресії *Escherichia coli*, яка може значно знизити вартість виробництва вакцини. Ця система показала чудові показники з безпеки та ефективності у третій фазі клінічних досліджень [50,51], а рівні нейтралізуючих антитіл майже такі ж, як у вакцин, що вже є у продажу і була схвалена для використання в Китаї. У майбутньому буде розроблена дев'ятивалентна вакцина, вироблена за допомогою *E. coli*, яка знаходиться на другій фазі клінічних досліджень [52].

Зовсім недавно було запропоновано використовувати ВПЧ для експресії багатьох антигенів, щоб забезпечити захист від кількох штамів одного типу вірусу, за допомогою химерної конструкції. Була розроблена «анти-множинна» одночастинна химерна вакцина. Автори показали, що L1 область петлі тісно пов'язана зі специфічністю типу ВПЛ та гомологічною заміною L1 область петлі та область тісно філогенетично пов'язаної області петлі можуть давати перехресний захист. Химера потрійного типу ВПЧ ВПЛ 33/58/52 може викликати нейтралізуючі титри, які рівні титрам від суміші трьох ВПЧ дикого типу, і це спостерігається як у мишей, так і у приматів. На основі цієї стратегії в даний час науковці розробляють сім вакцин перехресного типу проти 20 типів ВПЛ. Очікується, що ці вакцини будуть запобігати та всебічно контролювати захворювання, пов'язані з ВПЛ (наприклад, рак шийки матки) [60, 74].

2.3. Рекомбінантна вакцина проти вірусу гепатиту Е

Вакцина на основі ВПЧ на проти вірусу гепатиту Е (ВГЕ), Hecolin, випущена в Китаї в 2011 році та зробила значний внесок у профілактику

інфікування ВГЕ [74]. Вірус гепатиту Е – це безоболонковий, РНК-вірус. Він є збудником гепатиту Е, що передається фекально-оральним шляхом, поширений у всьому світі і викликає важко переносимий гострий гепатит [75]. Геному ВГЕ має довжина 7,2 kb і включає три відкритих рамки зчитування [75], серед яких ORF2, що кодує єдиний структурний білок рORF2. рORF2 містить основну антигенну область aa458–607. Несолін – це вакцина, що була розроблена на основі ВПЧ діаметром від 20 до 30 нм, що являють собою скорочену версію рORF2 (aa 368–606). Клінічні випробування продемонстрували, що Несолін має високі імуногенні та захисні властивості та може індукувати високі титри антитіл до ВГЕ. Вакцина може запобігти захворюванню гепатитом Е з ефективністю на 93% протягом 4,5 років [53,76]. Більше того, оскільки ВПЧ продукуються з використанням система експресії *E. coli*, це значною мірою знижує витрати на виробництво вакцини і робить її доступною для країн, що розвиваються. В даний час це єдина вакцина, яка може ефективно боротися з гепатитом Е. Окрім Несолін, ще дві вакцини проти ВГЕ знаходяться на клінічних дослідженнях це- вакцина гHEV (aa 112–607 aa) та вакцина р179 (aa 439–617). Вакцина гHEV (GSK) складається з пептиду вагою 56 кД , експресованого в клітинах комах, на другій фазі клінічних досліджень показала ефективність на рівні 95,5% [54]. Тим часом вакцина р179, яка експресується в системі *E. coli*, все ще перебуває на першій фазі клінічних випробувань [55].

2.4. Вакцина проти вірусу іммунодефіциту людини (ВІЛ)

Повна частка ВІЛ становить приблизно 80–120 нм. Геном містить 3 основні гени: gag, pol та env. Gag кодує три домени капсиду віріона. Зокрема, матричний субдомен(МА) пов'язаний з внутрішньою фазою ліпідної оболонки, що оточує частинку. Капсидний (СА) домен формує конусоподібне і більш конденсоване ядро, яке містить вірусну РНК, зв'язану з нуклеокапсидним доменом та містить вірусні ферменти. Білки оболонки кодуються генном env і являють собою gp120 і gp41, які поміщені в ліпідний бішар і відображаються на вірусної поверхні. Ген pol кодує ферментативні білки, що беруть участь у вірусному циклі. ВПЧ для ВІЛ були вироблені з використанням різних експресійних платформ. Експресований

поліпротеїн Gag має здатність мігрувати до клітинної мембрани, самостійно формуватися та відділятися від клітини. ВПЧ ВІЛ, що виробляються *Saccharomyces cerevisiae* вже готові до клінічних випробувань. Вони складаються із структурних білків p17 та p24. Клітини НЕК 293, серед інших клітинних ліній ссавців, використовувались для виробництва ВПЧ ВІЛ на основі білків Gag та/або Env з використанням будь-якого з перехідних процесів трансфекція або генерація стабільної клітинної лінії [8]. Системи клітини комах/бакуловірус також використовувались для виробництва Gag-Env ВПЧ. Були розроблені стабільні клітинні лінії комах, що продукують поліпротеїн Gag, для експресії цих ВПЧ [77].

2.5. Вакцина проти парвовірусу людини

Парвовірус людини - це невеликий безоболонковий ДНК-вірус родини *Parvoviridae*. Він має два основних структурні протеїни -- VP1 та VP2. ВПЧ парвовірусу людини В19 (HPVB19) знаходяться на клінічних дослідженнях. Складаються з протеїнів VP1 та VP2 і виготовляються за допомогою клітин комах. Клітини Sf9 заражаються двома бакуловірусами, що призводить до виробництва та самозбирання імуногенних ВПЧ [12].

2.6. Вакцина проти норовірусу

Норовірус – це РНК-вірус діаметром 27 нм, є причиною гострого вірусного гастроентериту і належить до *Caliciviridae*. Він не має оболонки, містить геном 7,5 кб, що кодує великий поліпротеїн, який складається із структурних (VP1 і VP2) і регуляторних (NS1 / 2 - NS7) протеїнів. Норовірусні ВПЧ, що перебувають на клінічних дослідженнях складаються з капсидного білка. Основний структурний протеїн VP1 був експресований в системі Бакуловірус/клітини комах (клітини Sf-9), і показав гарні результати на клінічних дослідженнях. Норовірусні ВПЧ, що утворені цим капсидним білком також продукуються трансгенними рослинами, перебувають на рівні клінічних випробувань [78].

2.7. Вакцина проти важкого гострого респіраторного синдрому, спричиненого коронавірусом (SARS-CoV)

SARS-CoV належить до родини *Coronaviridae*. Він має оболонку, має незвично великий (29,7 кб) одноланцюговий РНК-геном, що кодує 14 білків, які

виконують або регуляторну, або структурну роль. Вірус складається з чотирьох структурних білків: нуклеокапсидного , білок «шипа», мембранного та суперкапсидного. Ці ВПЧ також продукуються системою Бакуловірус/клітини комах в клітинах Sf-21. Білок "шипа", суперкапсидний і мембранний білки експресують через зараження культури клітин трьома різними бакуловірусами, по одному на кожен білок, який слід експресувати. Метод знаходиться на рівні досліджень [79].

2.8. Вакцина проти малярії

RTS,S/AS01 (Mosquirix) - це перша вакцина, створена проти паразитарного захворювання. Це вакцина на основі ВПЧ, що складається з поверхні вірусу гепатиту В та частини виділеного білка циркумспорозоїту від збудника малярії. Це центральні послідовно-розташований повторення та епітопи з білка циркумспорозоїту. Три частини вбудовані в поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg). При експресії в клітинах дріжджів, сформований білок утворює ВПЧ, які презентують антигени, провокуючи тим самим відповідь імунної системи [79].

2.9. Вакцина проти вірусу грипу А

Вірус грипу А становить від 80 до 120 нанометрів в діаметрі. Суперкапсид складається з двох білків: гемаглютиніну (HA) та нейрамінідаза (NA), які є цільовими білками у противірусному лікуванні. Платформа Бакуловірус/клітини комах була використана для виробництва ВПЧ грипу. Клітини Sf-9 були інфіковані з використанням трьох різних бакуловірусів. Кожен бакуловірус використовується кодування одного гену: HA, NA і гену матричного білка (M1). Коекспресія цих трьох білків призводить до утворення ВПЧ, які можуть бути відібрані із супернатантної культури. Ці ВПЧ провокують більш широку імунну відповідь, ніж інактивованій вірус або рекомбінантний гемаглютинін. Технологія трансгенних рослин також була використана для виробництва ВПЧ грипу, які показали добрі результати на доклінічних дослідженнях [40, 80].

РОЗДІЛ 3

ПРОГРЕС ДОСЛІДЖЕНЬ ВАКЦИН НА ОСНОВІ ВІРУС-ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК

Незважаючи на великий прогрес у галузі розробки вакцин, спалахи нових патогенів та недостатня імуногенність деяких ліцензованих вакцин вимагають розробки нових технологій у раціональному дизайні вакцин. Властиві властивості вірусоподібних частинок (ВПЧ) разом із сучасними генетичними та біохімічними інструментами перетворюють вакцини основані на наночастинках в гнучку платформу, що здатна до модуляцій у відповідності до потреби як у силі, так і в якості противірусних імунних відповідей.

До флавівірусів належать кілька важливих з медичної точки зору вірусів, таких як вірус Зіка, вірус Денге, вірус Західного Нілу та вірус японського енцефаліту. За останні роки вони розширились у географічному розподілі та переорієнтували міжнародну увагу. Вакцинація - одна з найефективніших способів для боротьби з флавівірусними інфекціями.. Застосування ВПЧ у кандидатів противірусних вакцини створює нові проблеми. Чжан та інші науковці не лише підсумували останні досягнення у розробці вакцин проти флавівірусу на основі ВПЧ, але також критично обговорили низку моментів, які все ще потребують вирішення. По-перше, слід розглянути вибір антигену. Безпека є вирішальним фактором при розробці вакцин на основі ВПЧ. По-друге, слід враховувати шляхи введення та вибір відповідних ад'ювантів, що може бути полегшено шляхом відпрацювання відповідних моделей за допомогою тварин підчас доклінічних досліджень. Нарешті, клінічні випробування повинні бути ретельно розроблені та сплановані для перевірки доцільності можливих кандидатів на вакцину. Тим не менше, результат

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3 ПРОГРЕС ДОСЛІДЖЕНЬ ВАКЦИН НА ОСНОВІ ВІРУС- ПОДІБНИХ ЧАСТИНОК					
<i>Розроб.</i>	<i>Губецький А.С.</i>							<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архивів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Стабнікова О.В.</i>								28	105
<i>Реценз.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>										
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>									

досліджень на тваринах не можуть бути безпосередньо екстрапольовані та інтерпретовані на людях, хоча патологічні процеси можуть бути подібними у тварин та людей. Тому дані з тваринних моделей слід ретельно переглянути та оцінити, щоб визначити вплив вакцини на патологічні процеси перед тим, як із доклінічних випробувань вакцин переходити до клінічних випробувань на людях. У своєму багатогранному огляді, автори також ілюструють потенційні варіанти стратегій підвищення ефективності флавівірусних вакцин на основі ВПЧ і навіть пропонують застосовувати флавівірусні ВПЧ як інструменти для виявлення вірусів та проведення антивірусного скринінгу [81].

Важкі респіраторні [82] вірусні інфекції, такі як грип, метапневмовірус (HMPV), респіраторно-синцитіальний вірус (RSV), риновірус (RV) та коронавіруси, включаючи важкий гострий респіраторний синдром коронавірусу-2 (SARS-CoV-2), спричиняють значну смертність та захворюваність у світі. Ці віруси були визначені основними збудниками гострих респіраторних захворювань у немовлят, людей похилого віку та осіб із ослабленим імунітетом. Клінічні ознаки інфекції варіюються від легких захворювань верхніх дихальних шляхів до більш серйозних захворювань нижніх дихальних шляхів, включаючи бронхіт та пневмонію. Крім того, ці хвороби можуть мати тривалий вплив на здоров'я пацієнта далеко поза перебігом вірусної інфекції. Окрім грипу, в даний час не існує ліцензованих вакцин проти цих вірусів. Однак кілька дослідницьких груп протестували різні кандидати на вакцини, включаючи тих, які використовують аттенуований вірус, вірусоподібні частинки, білкові субодиниці та наночастинки, а також останні РНК-вакцини, причому деякі з цих підходів показали гарні результати. Історично склалося, що кандидати на вакцину прогресували, залежачи від здатності активувати гуморальну імунну відповідь, зокрема, приводячи до сильних реакцій В-клітин та нейтралізуючи вироблення антитіл. Зовсім недавно було визнано, що клітинна імунна відповідь також має вирішальне значення для належного захисту від вірусної інфекції та захисту від шкідливих імунопатологій, пов'язаних з важким перебігом захворювань, і тому її

також слід враховувати при аналізі ефективності та безпеки кандидатів на вакцину. Науковці зазначають, що ці кандидати в ідеалі призвели б до стійких відповідей CD4 + і CD8 + Т-клітин, а також до високих титрів нейтралізуючих антитіл. Цей огляд спрямований на узагальнення встановлених та нових підходів, що використовуються для провокування клітинної імунної відповіді під час вакцинації проти респіраторних вірусів [82].

Через постійну антигенну мінливість [83] поточні вакцини проти грипу А потребують щорічного оновлення. Отже, терміново необхідна універсальна вакцина проти грипу, яка забезпечить тривалий захист як від сезонних, так і від нових пандемічних штамів грипу. Відростковий антиген гемаглютиніну (HA) є перспективною мішенню для такої вакцини, оскільки вона містить нейтралізуючі епітопи, які, як відомо, індують перехресні захисні реакції IgG на широкий спектр підтипів грипу. У цьому дослідженні ми описуємо розробку кандидата на універсальну, що складається з тримера HAstem, що відображається на поверхні твердих капсидоподібних частинок. Порівняно з розчинним некон'югованим тримером HAstem, частинки CLP-HAstem викликали більш потужну, тривалу імунну відповідь і змогли захистити мишей як від гомологічного, так і від гетерологічного грипу H1N1, навіть після одноразового прийому. Хоча для повного розкриття механізму, що лежить в основі цього посилення ефективності, будуть потрібні подальші дослідження, наші результати науковців [83] показують, що CLP-HAstem є перспективним кандидатом універсальної вакцини проти грипу та підтримує використання платформи Tag/Catcher AP205 при розробці вакцин, спрямованих на інші тримерні вірусні антигени [83].

Оболонка глікопротеїнових (Env) тримерів вірусу імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1) представляють інший важливий тип вірусного антигену-мішені, оскільки розробка вакцини проти ВІЛ-1 досі залишається однією з найбільших проблем для сучасної вакцинології. Оскільки зв'язування антитіл з нативними тримерами Env може призвести до нейтралізації ВІЛ-1, ВПЧ технологія пропонує платформу для перевірки гіпотези, в якій представлені рідні тримери Env мембрани можуть бути корисними для індукції нейтралізуючих антитіл після

введення вакцини. Немодифіковані ВПЧ ВІЛ-1 «дикого типу» не могли показати таких результатів. Оптимальна профілактична вакцина для запобігання передачі вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ-1) повинна викликати захисні реакції антитіл проти глікопротеїну оболонки ВІЛ-1 (Env). Некомпетентні до реплікації вірусоподібні частинки ВІЛ-1 (VLP) дають можливість представити асоційований з віріоном Env з нативною структурою під час вакцинації, яка дуже нагадує ту, що зустрічається з інфекційним вірусом. Крістофер А. Гонеллі та співавтори оптимізували включення Env у раніше розроблені зрілої форми ВПЧ та оцінили їх імуногенність у мишей. Включення Env у зрілі ВПЧ було збільшено шляхом заміни трансмембранного та хвостового доменів Env на домени гемаглютиніну грипу (HA-ТМСТ). Крім того, Env стабілізували на поверхні ВПЧ, вводячи міжланцюгові мутації дисульфідів та заміщення проліну (SOSIP), зазвичай використовувані для стабілізації розчинних тримерів Env. Отримані зрілі ВПЧ, в результаті, ефективно представляли нейтралізуючі епітопи антитіл, мінімізуючи вплив ненейтралізуючих ділянок антитіл. Вакцинація мишей зрілими ВПЧ викликала ширший спектр ізотипів Env-специфічних антитіл, ніж Env, представлений на незрілих ВПЧ або позаклітинних везикулах. Зрілі ВПЧ, що містять модифікований HA-ТМСТ Env, послідовно індукували відповіді анти-Env антитіл, які опосередковували помірну нейтралізаційну активність. Ці зрілі ВПЧ є потенційно корисними імуногенами для отримання нейтралізуючих реакцій антитіл, які націлені на природні епітопи Env на інфекційні віріони ВІЛ-1. Встановлено, що химерні домени на основі IFA HA ефективно покращують включення Env у зрілі ВПЧ ВІЛ-1 без значного погіршення презентації bNAв епітопу. Введення мутацій SOSIP стабілізувало вбудований Env та посилювало відображення четвертинних епітопів bNAв. Презентація зв'язного мембранною Env, що нагадує функціональний вірусний Env, на ВПЧ ВІЛ-1 є корисним підходом для індукції відповідей специфічних до ВІЛ-1 антитіл. На жаль, вироблення антитіл, спрямованих на людські білки та ліпіди, яких було багато на VLP, можливо, послабило імунну відповідь проти антигенів ВІЛ-1, обмежуючи імуногенні умовиводи між різними морфологіями частинок та включеною

щільністю Env. Зрілі VLP виявляли ширші відповіді на Env-специфічні антитіла, що є бажаним результатом, враховуючи, що відповіді поліфункціональних анти-Env-антитіл втягуються в захисну користь, яку отримують реципієнти вакцин у дослідженні RV144. Отже, VLP, що нагадують зрілі віріони ВІЛ-1, є перспективними імуногенами для ВІЛ-1 Env і вимагають подальшого дослідження, особливо коли вони експресуються *in vivo* з векторів вакцин нуклеїнових кислот [84].

Зіка – це арбовірусна хвороба [85], спричинена зараженням флавівірусом Зіка. Передача інфекції найчастіше відбувається під час годування за участю інфікованого комара *Aedes* або вертикальної передачі від інфікованої матері до її плоду. Результати зараження варіюються від безсимптомних до важких неврологічних пошкоджень у дітей, інфікованих внутрішньоутробно. Усвідомлення небезпеки, яку несе вроджений синдром Зіка, спричинило оголошення міжнародної надзвичайної ситуації та заклик до швидкої розробки вакцин та терапевтичних засобів. Велика кількість дослідницьких та дослідно-конструкторських робіт у промисловості, урядових, неурядових організаціях та наукових колах під час останньої епідемії Зіка (2015) стимулювали розробку ряду прототипів кандидатів на вакцини, отримання доклінічних даних та проведення випробування на людях на ранній фазі. Були продемонстровані безпека та імуногенність різних платформ вакцин, а дослідження пасивного переносу мишею та приматів, що не належать до людини, натякнули на можливість клінічної користі для людей та визначили імунний корелят захисту. Однак швидке зниження регіонального розповсюдження завадило провести клінічні дослідження ефективності до кінця. Шлях до ліцензування вакцини Зіка залишається незрозумілим [85]. Такі флавівіруси, як денга, жовта лихоманка, вірус Зіка, Західний Ніл та японський енцефаліт, є значним обтяженням для здоров'я. Шукаються нові вакцини для вирішення питань безпеки та виробництва, пов'язаних із сучасними живими аттенуєваними вакцинами. Тут [86] цями описується новий специфічний для комах флавівірус - вірус Бінджарі, який виявився надзвичайно толерантним до обміну своїх структурних білкових генів

(prME) з такими вищезазначеними патогенними флавівірусами, що заражають хребетних (VIF). Химерні віруси BinJ / VIF-prME залишалися дефектними при реплікації в клітинах хребетних, але реплікувалися з високою ефективністю в клітинах комарів. Дослідження кріоелектронної мікроскопії та моноклональних антитіл показали, що химерні частинки вірусу BinJ / VIF-prME були структурно та імунологічно подібними до батьківських VIF. Експериментальне виробництво в клітинах С6 / 36 припускає, що високий урожай може бути досягнутий до 109,5 дози інфекційної культури клітин / мл або ≈ 7 мг / літр. Віруси BinJ / VIF-prME виявили корисність для діагностики (мікросферні імунологічні аналізи та ІФА з використанням панелей сироватки людини та коней) та застосування вакцин (що ілюструє захист від вірусу Zika на мишачих моделях IFNAR - / - миші). Таким чином, віруси BinJ / VIF-prME представляють універсальну, неінфекційну (для клітин хребетних) високопродуктивну технологію генерування химерних частинок флавівірусу з низькими біологічними вимогами [86]. Використовуючи описану вище химерну технологію вакцини проти флавівірусу, засновану на новому специфічному для комах вірусі Бінджарі (BinJV), вчені [87] створили вакцину ZIKV (BinJ / ZIKA-prME) та продемонстрували її здатність захищати від зараження головного мозку плода. Самки мишей IFNAR - / - вакцинували одноразово без ад'юванту BinJ / ZIKA-prME, спарювали, а в ембріональний день 12.5 піддавали ZIKVPRVABC59. У мишей, щеплених BinJ / ZIKA-prME, у материнській крові, плаценті чи голівках плода не було виявлено інфекційного вірусу Zika. Подібний результат був отриманий, коли для вимірювання вірусної РНК використовували більш чутливу методологію qRT PCR. Вакцинація BinJ / ZIKA-prME також не призвела до посилення антитілозалежного посилення інфекції вірусу денге або захворювання. Таким чином, BinJ / ZIKA-prME є потенційним кандидатом на вакцину [87].

Вірусоподібні частинки – це потужна основа для різних способів презентації та доставки антигену. Через структуру ВПЧ та їх подібні властивості до екстрацелюлярних везикул, у порівнянні з одинарними терапевтичними системами на основі білків, оцінка якості ВПЧ вимагає більш високого ступеня

вдосконалення . Досягнення в галузі нанотехнологій з використанням методів аналізу окремих частинок та високою роздільною здатністю забезпечують привабливі підходи до характеристики ВПЧ. У дослідженні [88] було оцінено шість різних біофізичних методів для характеристики ВПЧ на основі ВІЛ-1, що виробляються на платформах клітин ссавців та комах. Підготовка зразків та налаштування обладнання були оптимізовані для шести оцінюваних стратегій. Електронна мікроскопія виявила наявність декількох типів екстрацелюлярних везикул у препаратах ВПЧ, а криогенна трансмісійна електронна мікроскопія дала найкращий результат у дослідженні ультраструктури ВПЧ. Застосування флуоресцентної мікроскопії з надвисокою роздільною здатністю, аналізу відстеження наночастинок та потокової вірометрії дозволило визначити високу пропускну здатність ВПЧ. Цікаво, що між методами спостерігались відмінності у визначенні концентрації наночастинок. Більше того, аналіз відстеження наночастинок та потокова вірометрія дозволили кількісно визначити як екстрацелюлярні везикули, так і ВПЧ в одному експерименті, одночасно аналізуючи розподіл розміру частинок. Серед шести методологій, що вивчались у цій роботі, криогенна трансмісійна електронна мікроскопія була визначена, як найкращий метод для виявлення структур наночастинок, зберігаючи їх природну конформацію. Ця методика дозволила детально охарактеризувати різні субпопуляції екстрацелюлярних везикул та бакуловірусів, що утворюються разом з ВПЧ при виробництвах на середовищах HEK293 та Sf9. Високопродуктивним аналіз ВПЧ та їх диференціація від інших сонтамінуючих частинок були досягнуті за допомогою потокової вірометрії, флуоресцентної мікроскопії з надвисокою роздільною та аналізу відстеження наночастинок. Серед цих методів аналізу потокова вірометрія виявилася найшвидшим методом для аналізу розподіл розміру частинок, одночасно дозволяючи одночасно кількісно визначати різні субпопуляції наночастинок. Ці результати дають нові уявлення про використання різних аналітичних інструментів для моніторингу виробництва біопрепаратів на основі наночастинок та пов'язаних з ними контамінацій. Вибір підходящого аналітичного методу є важливим у процесах визначення характеристики ВПЧ.

В останні десятиліття [89] рекомбінантні технології дозволили розробити експериментальні вакцини проти широкого кола захворювань з використанням рослинних вірусів та вірус-подібних частинок як основних елементів для стимулювання захисту та тривалих імунних реакцій. Аналіз останніх публікацій показує, що щонайменше 97 експериментальних вакцин розроблено на основі рослинних вірусів, включаючи 71 вакцину проти інфекційних агентів, 16 протиракових вакцин та 10 терапевтичних вакцин проти аутоімунних порушень. Кілька рослинних вірусів вже використовувались для розробки платформ вакцин і пройшли випробування в людях та у ветеринарних дослідженнях. Це дозволяє припустити, що найближчим часом вакцини на основі рослинних вірусів будуть введені в клінічну та ветеринарну практику. Виробництво вакцин є одним із найскладніших промислових процесів. Кілька важливих факторів впливають на розробку та маркетинг вакцин. Одним з них є час, необхідний для виведення на ринок нової вакцини від фази розробки, яка може перевищувати 15 років, включаючи в середньому 7 років для проектування, будівництва, затвердження та початку промислового виробництва. Наступним фактором є значні людські та фінансові ресурси, необхідні для розробки та налагодження виробництва вакцин. Вакцинна промисловість повинна постійно вирішувати такі проблеми, як довгий життєвий цикл вакцин, високі витрати на обладнання та мінливість світового попиту на вакцини. Тривалий період розробки вакцин є додатковою проблемою, яка негативно впливає на доступність вакцин проти нових інфекційних захворювань, таких як вірус Ебола, SARS-CoV, вірус Зіка, вірус Чікунгунья та інші. Більше того, обрана структура антигену, що використовується для виготовлення вакцин, може відрізнятися від відповідного нативного антигену, зменшуючи або навіть запобігаючи нейтралізуючій здатності генерованих антитіл. Цей аспект негативно впливає на процес розробки вакцин проти патогенних мікроорганізмів, особливо проти збудників інфекцій з високими генетичними варіаціями. ВІЛ є прикладом такого збудника, проти якого не існує ефективної вакцини, незважаючи на багаторічні зусилля науковців та вакцинопромисловості. Ще одним складним аспектом, який слід згадати тут як

фактор, який, можливо, важливий для розвитку вакцини в майбутньому, є той факт, що останні дослідження показують, що мікробіом у травному тракті реципієнтів може впливати на ефективність вакцин. Ефект спостерігається як у людей, так і у лабораторних мишей, що свідчить про необхідність подальших досліджень. Як показано в цьому огляді, рослинні віруси та їх неінфекційні похідні ВПЧ інтенсивно вивчались як імунологічно активні багатовалентні структури, корисні для виробництва нових профілактичних та терапевтичних вакцин проти інфекційних агентів людини або тварин, раку та аутоімунних захворювань. У порівнянні з іншими ВПЧ, рослинні вакцини на основі ВПЧ мають додаткові переваги, такі як гнучкість у створенні вакцин, простота виробництва та очищення ВПЧ, стабільність та низький ризик для існуючого імунітету. Всі ці властивості роблять рослинні віруси привабливою альтернативою ВПЧ тварин і людини. Сьогодні жодна вакцина на основі рослинних вірусів комерційно не доступна. Однак було розроблено кілька платформ вакцин, які дозволяють створювати нові вакцини за порівняно короткий проміжок часу. Деякі експериментальні вакцинні платформи допускають включення великих антигенів і навіть повнорозмірних білків у вірусні структури, не впливаючи на морфологію частинок та імуностимулюючі властивості. Оскільки нативні просторові структури рекомбінантних антигенів надзвичайно важливі для вироблення антитіл з нейтралізуючою активністю та тривалим імунітетом, майбутні рекомбінантні вакцини з ВПЧ повинні містити кілька копій правильно складених антигенів, а також різні імуностимулюючі компоненти, включаючи Т-клітинні епітопи та нуклеїнові кислоти. Розглянуті [89] досягнення свідчать про те, що вакцини на основі рослинних вірусів є дуже корисними для вирішення різних проблем, що виникають при створенні вакцин.

Традиційні вакцини [90] з ослабленням живих вірусів, такі як вакцини проти кору, краснухи та віспи, мають високу імуногенність і можуть викликати потужні та тривалі реакції антитіл навіть після одноразового введення. Спочатку це пояснювалося здатністю ослабленого вірусу до реплікації у клітинах господаря після вакцинації. Висока імуногенність ослаблених живих вірусів веде за собою

збільшення ризиків безпеки та складними виробничими процесами. На відміну від цього, сучасні рекомбінантні субодиничні вакцини (тобто на основі розчинного білкового антигену) демонструють високу безпеку, але загалом не можуть викликати подібні тривалі реакції антитіл у людей. Протягом останніх років під час клінічних випробувань було протестовано та отримали ліцензію кілька вакцин на основі вірус-подібних частинок, серед яких вакцини, орієнтовані на вірус гепатиту В (Recombivax HB[®] та Engerix-B[®]), вірус папіломи людини (Cervarix[®], Gardasil[®] і Gardasil 9[®]) та вірус гепатиту Е (Hecolin[®]). Варто відзначити, що вакцина проти вірусу папіломи людини є унікальним прикладом рекомбінантної субодиничної вакцини із рівнем імуногенності подібним з живими аттенуйованими вакцинами навіть після одноразового прийому. Ця вакцина утворюється шляхом самостійного збирання головного капсидного білка ВПЧ у капсидоподібні частинки (КПЧ), структура яких, як вважають, є ключовим фактором для її високої ефективності. КПЧ складають підклас ВПЧ. Вони являють собою тверді, неліпідні частинки на основі білка. Велика кількість досліджень спільно встановила сильний причинно-наслідковий зв'язок між високою імуногенністю КПЧ та їх структурною схожістю з природними вірусами. З цих властивостей їх розмір (20–200 нм у діаметрі) та повторювана геометрія поверхні вважаються найважливішими. Більше того, давно визнано, що імуногенність вакцинного антигену може бути значно підвищена, якщо він доставляється до імунної системи у подібному багатовалентному, повторюваному та твердому форматі. Отже, було застосовано декілька стратегій, що використовують КПЧ як основи для презентації гетерологічних антигенів, включаючи самоантигени. У роботі [90] розглянені ключові атрибути різних технологій вакцин на основі КПЧ з точки зору їх здатності сприяти високому імуногенному прояву епітопів. Крім того, обговорені практичні аспекти систем спряження, такі як їх універсальність, технологічність та масштабованість. У цьому контексті виділяється платформа Tag / Catcher-AP205 як особливо універсальну та ефективну технологію та надається обґрунтування для подальшого розвитку цієї технології при розробці вакцин.

Цитомегаловірус людини [91] є широко розповсюдженим представником сімейства Herpesviridae, що належить до підродини Betaherpesvirinae. Даним вірусом інфіковано 70% дорослого населення у всьому світі. Первинна інфекція, як правило, протікає безсимптомно у осіб, що не мають імунодефіцитних станів. Тим не менше, після первинного інфікування вірусом протягом усього життя людини зберігається латентна форма, а реактивація вірусу є загально поширеним явищем. Перехід в активну форму інфікування не обов'язково передбачає прояв клінічних симптомів. Однак інфекція або реактивація вірусу у імунодефіцитних осіб, таких як хворі на СНІД, пацієнти після трансплантації органів або гемопоетичних стовбурових клітин, спричиняє важкі захворювання та навіть може стати причиною смерті. Крім того, цитомегаловірус людини є найпоширенішою причиною вроджених вад спричинених вірусами, що вражають 0,7% новонароджених і мають постійні наслідки такі, як сенсоневральна втрата слуху, обмеження росту та когнітивні порушення . Сучасна протівірусна терапія та переливання гіперімунних глобулінів для контролю вірусемії не є ефективними. Отже, з огляду на тяжкість та важливість цих захворювань, а також пов'язані із цим соціально-економічні втрати, потреба у вакцині проти цитомегаловірусу людини була визначена в категорії найвищого пріоритету, і вона є другою за значимістю ціллю після ВІЛ за пріоритетом у Центрі контролю за захворюваннями. Протягом останніх десятиліть було докладено значних зусиль для розробки вакцини, здатної запобігати зараженню цитомегаловірусом людини, внутрішньоутробному інфікуванню та поширенню вірусів після трансплантації органів або гемопоетичних стовбурових клітин від серопозитивних донорів до серонегативних реципієнтів. Потенційна вакцина містила у собі живі віруси, аттенувані або вірусні вектори, що експресують імуногени цитомегаловірусу людини. Також були проведені клінічні дослідження вакцини на основі очищених рекомбінантних білків. Встановлено, що суперкапсидний глікопротеїн В оболонки віріону викликає енергійні відповіді Т-клітин та антитіл і є основою для більшості вакцин, розроблених до цього часу. Рекомбінантна вакцина з глікопротеїном В з ад'ювантом MF59 у недавніх клінічних дослідженнях на П

фазі, генерувала титри антитіл порівнянні з природною інфекцією. Однак вакцина продемонструвала лише помірну ефективність у профілактиці первинних інфекцій цитомегаловірусом людини у серонегативних жінок та у зменшенні віремії у реципієнтів. Дивно, але недавнє дослідження продемонструвало, що у серонегативних пацієнтів, щеплених вакциною з глікопротеїном В з ад'ювантом MF59, швидша гуморальна реакція проти глікопротеїну В після трансплантації органів від серопозитивних донорів. Тим не менш, надзвичайно важливо оцінити можливі стратегії для вакцин проти цитомегаловірусу людини наступного покоління. У огляді науковці підсумовують поточні досягнення про адаптивну імунну відповідь на цитомегаловірус людини та надамо оновлення про нові методології, доступні для посилення імунної відповіді проти інфекційних захворювань за допомогою вірус-подібних частинок та наночастинок. У роботі було описано велику кількість різноманітних систем для генерування як ВПЧ, так і наночастинок. Самозбірні основи використовувались для представлення складних антигенів глікопротеїну та для дослідження вакцинації проти вірусу грипу, ВІЛ, вірусу Епштейна – Барра та респіраторно-синцитіального вірусу. У всіх випадках імуногенність антигену підвищувалася за рахунок багатовалентної презентації, а в деяких випадках можна було спостерігати ефект фокусування епітопу. Створення нових самозбірних білків відкрило шлях для нових можливостей у демонструванні антигенів без обмеження щодо кількості або олігомерного стану антигену. Цитомегаловірус людини все ще є основною вірусною причиною вроджених вад розвитку. Приблизно у чверті немовлят, інфікованих цитомегаловірусом людини внутрішньоутробно, розвиваються важкі наслідки, включаючи мікроцефалію, сенсоневральну втрату слуху та зору або когнітивні затримки. Недавня ідентифікація ключових антигенних мішеней цитомегаловірусу людини як для гуморальної, так і клітинної імунної відповіді, а також здатності відображати та інкапсулювати білки або нуклеїнові кислоти (РНК) на ВПЧ та ноночастинках, імовірно, призведе до появи кращих кандидатів на вакцини, здатних націлити імунну відповідь на конкретні мішені.

РОЗДІЛ 4

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ ВІРУСНОГО БІЛКУ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ ВАКЦИНИ

4.1. Передумови виробництва вакцини

4.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей ВПЧ вакцини, галузей використання

Інфекційні хвороби небезпечні своїми ускладненнями, що можуть призвести до інвалідності, а деякі — навіть до смерті. Інфекційні хвороби, від яких (або від тяжких ускладнень яких) можна захиститися за допомогою імунізації, передаються від інфікованої особи до здорової, як правило, повітряно-крапельним шляхом [92].

Імунізація — це процес, завдяки якому людина набуває імунітет, або стає несприйнятливою до інфекційної хвороби, і який зазвичай здійснюється шляхом введення вакцини [92].

До інфекцій, яким можна запобігти щепленнями, належать: кашлюк, дифтерія, правець, поліомієліт, кір, епідемічний паротит, краснуха, гепатит В, гемофільна інфекція, пневмококова інфекція, менінгококова інфекція, ротавірусна інфекція, вітряна віспа, гепатит А, папіломавірусна інфекція та інші [92].

Вакцини стимулюють власну імунну систему організму до захисту людини від відповідної інфекції або хвороби. Вакцинація має на меті захистити організм від інфекції, запобігти важкому перебігу та появі ускладнень від неї. Дитина, яка не отримала щеплення проти тих чи інших інфекцій, наражається на великий ризик захворіти, особливо якщо таких дітей стає з року в рік більше [92].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Губецький А.С.</i>			РОЗДІЛ 4 <i>ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИПУСКУ ВІРУСНОГО БІЛКУ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ТА ВИРОБНИЦТВА ГОТОВОЇ ФОРМИ</i>					
<i>Перевір.</i>		<i>Стабнікова О.В.</i>						<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									40	105
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

Застосування вакцин знижує вірогідність поширення відповідних інфекцій у сотні разів. На сьогоднішній день альтернатив вакцинації з метою

профілактики захворювання на відповідні інфекції немає. Ризик поширення захворювань серед дітей, які не отримали щеплення, значно вищий, ніж у захищених шляхом вакцинації [92].

Вірусоподібні частки (ВПЧ) – це термін, який використовується вже близько 80 років. Зазвичай ВПЧ означає частку, яка, як правило, зовні схожа на вірус, але не має ні перевірених, ні фактичних функцій вірусу. Спочатку ВПЧ відносились до структур, які видимі на зображеннях тканин, отриманих за допомогою електронного мікроскопа. Але останнім часом для інших дослідників ВПЧ стали означати зовсім інше. Ключова відмінність полягає в використанні ВПЧ в поєднанні з вакцинами та біотехнологічними системами [93].

Для вірусних екологів ВПЧ – це частинка розміром з вірус, що має нуклеїнові кислоти і могла бути функціональним вірусом. Але для розробників вакцин і дослідників біотехнологій ВПЧ – це вірусна структура, в якій навмисно відсутня вірусний геном [93].

Ідею використання ВПЧ як вакцин почали досліджувати, оскільки дослідники експресували гени вірусного капсиду в гетерологічних системах. У цих випадках ВПЧ як вірусні капсиди можна було використовувати за відсутності повного вірусного генома. Також, було показано, що ці частинки зберігають антигенність інфекційних віріонів. Використання ВПЧ-вакцин досліджено в різних системах, включаючи вірус імунодефіциту людини, вірус гепатиту, ротавірус, вірус папіломи, геморагічний вірус, вірус грипу, вірус Норвалу (зараз норовірус), і вірус Зіка. Кілька вакцин ВПЧ сьогодні є комерційно доступними, в тому числі проти гепатиту В та вірусів папіломи людини [93,94].

Порівняно з окремими білками або пептидами, ВПЧ мають конформаційні епітопи, більш схожі на природний вірус, тож, реактивність антитіл або реакція імунної системи значно покращується. Завдяки своїй дуже повторюваній поверхні, ВПЧ здатні індукувати сильні реакції В-клітин у відсутність ад'ювантів,

ефективно зшиваючи специфічні рецептори на В-клітинах. Використовуючи методи молекулярної біології, можна пристосувати один або кілька антигенів до цих мультимерних білкових структур для більш широкого та ефективного захисту. Ефективність ВПЧ може викликати захисну реакцію при менших дозах антигену, що значно знижує вартість вакцини [94].

ВПЧ–конструкції також використовуються для вивчення надходження віріону в клітини та механізмів складання віріону, включаючи деякі бактеріофаги. ВПЧ–конструкції, як показано, самостійно збираються на поверхні та інкапсулюють неорганічні нанокристали, капсулюють ензими та інші білки, та інкапсулюють негеномну РНК. Ці гібридні частинки також пропонуються як біореактори та терапевтичні засоби доставки [94].

Як бактеріальні системи в основному застосовуються комерційні штами кишкової палички та вектори експресії. Незважаючи на їх недоліки, такі як неспроможність продукувати рекомбінантні білки з посттрансляційними модифікаціями, їх нездатність генерувати належні дисульфідні зв'язки, проблеми розчинності білків та наявність ендотоксинів у препаратах рекомбінантних білків. Системи кишкової палички є загально визнаною технологією, яка задовольняє багатьом науковим та промисловим вимогам і широко застосовується для виробництва ВПЧ. Успішне виробництво ВПЧ з використанням кишкової палички, ймовірно, досягне в тих випадках, коли цільові ВПЧ містять лише один білок вірусу, який розчиняється в клітинах після культивування [95].

Дотепер ВПЧ виробляються для більш ніж 30 різних вірусів, що інфікують людей та тварин. Ці віруси структурно різноманітні, мають одиночні або множинні капсидні білки або ліпідну оболонку. Важливо підкреслити, що не всі віруси є придатними цілями ВПЧ для розробки вакцини або всі ВПЧ, придатні як кандидати на вакцину. Також, нещодавно ВПЧ також знайшли застосування в якості будівельних лісів у біотехнології наночастинок [94].

4.1.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

Вірусний гепатит Е (ВГЕ) – захворювання ендемічне, переважно для країн з тропічним та субтропічним кліматом. Неендемічна зосередженість ВГЕ є вкрай

рідкісним явищем і базується на міграційних та туристичних засадах, що пояснює тенденцію до збільшення неендемичних спалахів ВГЕ в останні роки. Особливої настороженості потребують випадки ВГЕ у вагітних, які становлять групу підвищеного ризику летальності (до 25%) через перебіг, ускладнений синдромом дисемінованого згортання крові, нирковою недостатністю. Спорадичний характер ВГЕ на території України унеможлиблює своєчасне встановлення діагнозу, а вплив вірусного агента на архітекtonіку печінки взагалі не піддається вивченню [96].

Вірус гепатиту Е менш стійкий до умов середовища, ніж вірус гепатиту А, тому значно менш поширений. Щороку на Землі відбувається приблизно 20 мільйонів випадків інфікування ВГЕ, які, згідно з оцінкою, призводять до 3,3 мільйона симптоматичних випадків захворювання гепатитом Е і 56 600 випадків смерті, пов'язаних з гепатитом Е. За оцінками ВООЗ, в 2015 р від гепатиту Е померло приблизно 44 000 чоловік (що становить 3,3% сукупної смертності від усіх типів вірусного гепатиту) [97,98].

Дане захворювання широко поширене в країнах з низьким і середнім рівнем доходу і обмеженим доступом до базових послуг в галузі водопостачання, санітарії, гігієни та охорони здоров'я. У цих районах захворювання виникає у вигляді як спалахів, так і одиничних випадків. Спалахи зазвичай є наслідком фекального забруднення питної води і можуть зачіпати від декількох сотень до декількох тисяч чоловік. Іноді спалаху гепатиту Е розвиваються в зонах конфліктів і надзвичайних гуманітарних ситуацій, наприклад, в районах військових дій, а також в таборах біженців або внутрішньо переміщених осіб, де санітарно-побутові умови і ситуація з водопостачанням є особливо напруженими [98].

У розвинених країнах інфекція, викликана вірусом гепатиту Е ще недавно вважалася рідкісною, а також переважно перевезеною з ендемічних районів мігрантами або мандрівниками. В останні роки гепатит Е визнаний причиною головним чином автохтонних захворювань в розвинених країнах Європи, хоча джерело та шляхи зараження залишаються багато в чому невизначеними [99].

Показники летальності від гепатиту Е в промислово розвинених країнах Європи виявилася вищою, ніж в традиційно ендемічних районах, так як зараження відбувається частіше у літніх людей з хронічними захворюваннями. Вірус Е може бути причиною хронічного гепатиту і цирозу печінки у хворих з імунодефіцитом і при ВІЛ-інфекції [99,100].

Крім низької якості води і проблем з особистою гігієною, дедалі часіше реєструються випадки, де причиною інфекції є м'ясо інфікованих тварин або моллюсків. Передача інфекції може відбуватися при переливанні крові, під час пологів від матері до дитини. Діагноз підтверджується виявленням в крові антитіл класу IgM до гепатиту Е методом ІФА, або РНК ВГЕ методом ПЛР у фекаліях або в крові [97,100].

Більшість авторів, які вивчали ВГЕ, вказують на такі епідеміологічні закономірності цієї інфекції [100]:

- поширеність в країнах з жарким кліматом, в яких інфекція є антропонозом з фекально-оральним механізмом передачі, що реалізується переважно при вживанні контамінованої вірусом питної води;
- сезонна нерівномірність захворюваності протягом року (в Південно-Східній Азії підйом рівня захворюваності пов'язаний з початком/закінченням сезону дощів, в країнах Центральної Азії пік захворюваності припадає на осінь);
- окреслені спалахи водного походження з високим рівнем захворюваності;
- вибуховий характер спалаху;
- відсутність централізованого водопостачання, каналізації та побутового благоустрою;
- нерівномірність територіального розподілу захворюваності;
- переважне ураження осіб молодого віку (15-29 років), в регіонах з високим рівнем захворюваності ГЕ в цій віковій групі до 96% обстежених мають анти-HEV IgG;

- повторювані підйоми захворюваності на ендемічних територіях з інтервалом 7-8 років.

За останні роки уявлення про епідеміології ГЕ зазнали зміни. Перш за все, це перегляд ендемічності територій (Європа, Японія, Північна Америка) і наявність в них аутохтонних (незавезених) випадків хвороби, незаперечний доказ зоонозних природи ГЕ; існування хронічних форм з тривалою персистенцією вірусу (більше 6 міс). Крім того, з'явилося багато публікацій про субклінічному перебігу інфекції в ряді країн Західної Європи, Північної Америки, а також в деяких державах Південно-Східної Азії і Океанії поряд з ендемічними зонами, які знаходяться за межами України [100].

Тож, можна зробити висновок, що хвороба прогресує і її не можна вважати інфекцією теплих країн, адже в Україні реєструється все більше випадків цього захворювання. По більшій частині – уражені діти та сільське населення, а найгірший перебіг хвороби відчувають на собі вагітні жінки, які за статистикою на третьому семестрі при ВГЕ мають летальність у 70 % [97,98,100].

4.1.3. Вибір форми випуску ЛЗ

Китайська компанія, яка розробила першу ВПЧ-вакцину проти гепатиту Е, а саме Hecolin випускає свою вакцину у вигляді готових ін'єкцій в шприцах.



Рис.4.1. Форма випуску Hecolin [101]

Окрім ін'єкційних форм існують також ампульні вакцини, а також вакцини, які зберігаються у флаконах на певну кількість доз (2,5,10 або 20 доз) [102].



Рис.4.2. Приклад різних форм випуску вакцин проти гепатиту В [103,104]

Для нашої країни доречніше обрати скляні форми упаковки вакцин. Це пов'язано з тим, що в нашій країні доволі невелика кількість людей хворіє гепатитом Е, порівняно з іншими його формами. В скляній тарі вакцина буде зберігатися довше та в деяких моментах безпечніше, ніж в шприці.

Щодо вибору між ампулами та флаконами, то слід надати перевагу саме ампулам. Це пов'язано знову ж таки з ймовірністю захворювання в нашій країні. Ампули забезпечують індивідуальність дози, коли флакони використовуються для вакцинування великої кількості людей. Марна витрата вакцини призводить до великих збитків, що робить форму флаконів не доречною в нашому випадку.

Тож, обираємо форму випуску ампул по 0,5 мл як 1 дози. Вторинна упаковка буде представлена картонною коробкою, яка містить в собі 10 доз вакцини.

4.1.4. Опис лікарського засобу згідно АНД

Медичний імунобіологічний препарат Несолін, який являє собою прозору рідину з очищеним рекомбінантним антигеном (білком) HEV [105].

Склад. Одна доза препарату містить не менше 30 мкг очищеного рекомбінантного антигену HEV. Додаткові речовини представлені наступними компонентами [105]:

Гідроксиду алюмінію (ГОСТ 11841-76) – 0,8 мг

Вода для ін'єкцій (ГОСТ 6709-72)

Призначення. Вакцина для профілактики вірусу гепатиту Е [105]

Форма випуску. 10 ампул в упаковці, по 0,5 мл вакцини у кожній ампулі [105].

СПЕЦИФІКАЦІЯ**Necolin**

Найменування показників контролю	Встановлені значення	Методи контролю
1	2	3
Опис	Прозорий розчин без домішок та осадів	За п. 1 АНД, візуально
Мікробіологічний контроль	Має бути стерильним	За п. 2 АНД, висівом на чашки Петрі ДФУ 2.6.1
Пірогени	Має бути апірогенною	За п.3 АНД, візуально ДФУ 2.6.8
Токсичність	Має бути нетоксичним	За п.4 АНД, ДФУ 2.6.9
Прозорість та каламутність рідини	Має бути прозорою, без включень та каламуті	За п.5 АНД, ДФУ 2.2.1
Контроль домішок	Мають бути відсутніми	За п.6 АНД, ДФУ 2.2.27
Об'єм що витягається	Надлишковий об'єм має становити 0,1 мл	За п.7 АНД, ДФУ 2.9.17
Механічні включення	Не більше 3%	За п. 8 АНД, ДФУ, 2.9.19

Методи контролю**Necolin****1. Опис**

Прозорий розчин, без каламуті, забарвлення, домішок та механічних включень. Визначається візуально [106].

2. Мікробіологічний контроль

Випробування на стерильність проводять за асептичних умов, використовуючи, наприклад, ламінар – бокс класу А, розташований у чистому приміщенні класу В або ізолятор. Заходи, що вживаються для попередження

мікробного забруднення, не мають чинити впливу на мікроорганізми, які можуть бути виявлені у зразку в результаті випробування. Умови треба регулярно контролювати шляхом аналізу проб, відібраних відповідним чином у робочій зоні [106].

Для проведення випробування на стерильність можуть бути використані живильні середовища, наведені нижче. Тіогліколеве середовище призначене для вирощування анаеробних бактерій, однак може бути також використане для виділення аеробних бактерій. Соева-казеїнове середовище призначене для вирощування аеробних бактерій, а також може бути використане для виявлення грибів [106].

Тіогліколеве середовище (г/л)

Гідролізат казеїну - 15,00

Дріжджовий екстракт - 5,00

Глюкоза - 5,50

Натрію хлорид - 2,50

L-цистин - 0,50

Натрію тіогліколят - 0,50

Резазурін - 0,001

Агар-агар - 0,75

Кінцеве значення рН (при 25°C) $7,1 \pm 0,2$

Соево-казеїнове живильне середовище (г/л)

Панкреатичний гідролізат казеїну - 17

Папаїновий гідролізат соєвої муки - 3

Натрію хлорид - 5

Дикалію гідрофосфат – 2,5

Глюкози моногідрат – 2,5

Агар-агар - 0,75

рН після стерилізації 7.3 ± 0.2

Декілька чашок Петрі з живильним середовищем інкубують при наступних температурах: 30-35 °C для визначення бактерій, 20-25 °C для виявлення грибів.

Визначення триває протягом 14 діб. Після закінчення періоду інкубації не має спостерігатися ріст мікроорганізмів [106].

3. Пірогени

Випробування на пірогени полягає у вимірюванні підвищення температури тіла, спричиненого у кроликів внутрішньовенним введенням стерильного розчину випробовуваного лікарського засобу [106].

Добір тварин. Використовують здорових статевозрілих кроликів обох статей масою не менше 1.5 кг, які дістають повноцінне і збалансоване харчування без антибіотиків і не втрачають масу тіла протягом тижня, що передують випробуванню. Кролик не може бути використаний у випробуванні на пірогени [106]:

а) якщо він був використаний у випробуванні на пірогени з негативним результатом протягом попередніх трьох діб;

б) якщо він був використаний у попередні три тижні у випробуванні на пірогени, в якому зразок не витримав випробування.

Попереднє випробування. Після добору тварин, за один-три дні до випробування зразка, тим тваринам, яких не використовували протягом попередніх двох тижнів, вводять внутрішньовенно 10 мл на кілограм маси тіла апірогенний 9 г/л розчин натрію хлориду, підігрітий до температури 38.5 °С. Реєструють температуру тварин, починаючи за 90 хв до ін'єкції і продовжуючи протягом 3 год після ін'єкції розчину. Будь-яка тварина, у якої виявляється зміна температури більш як на 0,6 °С, не використовується в основному випробуванні [106].

Основне випробування. Випробування проводять, використовуючи групу із трьох кроликів. Підготовка і введення випробовуваного зразка. Перед введенням випробовуваний розчин нагрівають приблизно до температури 38,5 °С. Випробовуваний зразок може бути розчинений або розведений в апірогенному розчині 9 г/л натрію хлориду або іншому розчиннику, зазначеному в окремій статті. Розчин повільно вводять у крайову вену вуха кожного кролика протягом

не більше 4 хв. Об'єм , що вводиться, має бути не менш як 0.5 мл і не більш як 10 мл на кілограм маси тіла [106].

Визначення вихідної і максимальної температур."Вихідна температура" кожного кролика - це середнє значення із двох показань температур. Зареєстрованих у кролика з інтервалом 30 хв протягом 40 хв, що безпосередньо передують введенню випробовуваного зразка. "Максимальна температура" кожного кролика є найвищою зареєстрованою температурою даного кролика протягом 3 год після ін'єкції. Температуру кожного кролика реєструють з інтервалом не більше 30 хв, починаючи не раніш як за 90 хв перед введенням ви пробуваного зразка і продовжуючи протягом 3 год після уведення. Різницю між максимальною температурою і вихідною температурою для кожного кролика беруть за його реакцію . Якщо ця різниця від'ємна, результат оцінюють як нульову реакцію. Кроликів, у яких при визначенні вихідної температури виявляють відмінності між двома послідовними температурними показниками більш як на 0,2 °С , вилучають із випробування. У будь-якому випробуванні використовують лише тих кроликів, вихідні температури яких не різняться між собою більш як на 1 °С. Кроликів, що мають вихідну температуру вище 39,8 °С або нижче 38,0 °С, вилучають із випробування [106].

Випробування проводять спочатку на групі із трьох кроликів, якщо необхідно, далі повторюють на наступних групах із трьох кроликів до загальної кількості чотири групи , залежно від одержаних результатів. Якщо сумарна реакція у першій групі не перевищує 1,15 °С зразок витримує випробування. Якщо сумарна реакція перевищує 2,65 °С, випробування повторюють, як зазначено вище [106].

4. Токсичність

Вводять внутрішньочеревна одну людську дозу, але не більше 1 мл кожній із п'яти здорових мишей масою від 17 г до 22 г. Людську дозу зазначають на етикетці випробовуваного лікарського засобу або у супровідному документі. Спостерігають за тваринами протягом семи діб. Зразок витримує випробування, якщо у жодної з тварин не виявляються ознаки інтоксикації. Якщо більш як одна

тварина гине, зразок не відповідає вимогам. Якщо одна з тварин виявляє ознаки інтоксикації або гине, випробування повторюють. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не виявляє ознак інтоксикації або не гине в межах зазначеного часу [106].

Випробування також має бути проведене на двох здорових морських свинках масою від 250 г до 350 г. Вводять внутрішньочеревна кожній тварині одну людську дозу випробовуваного лікарського засобу, але не більше 5 мл. Людську дозу зазначають на етикетці лікарського засобу або у супровідному документі. Спостерігають за тваринами протягом семи діб. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин не виявляє ознак інтоксикації. У випадку загибелі більш як однієї тварини зразок не відповідає вимогам. Якщо одна з тварин виявляє ознаки інтоксикації або гине, випробування повторюють. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не виявляє ознак інтоксикації і не гине протягом зазначеного часу [106].

5. Прозорість та каламутність рідини

Для визначення прозорості і ступеня каламутності рідин використовують однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з плоским дном, що мають внутрішній діаметр від 15 мм до 25 мм. 40-мм шар випробовуваної рідини порівнюють із 40-мм шаром свіжоприготованого, як описано нижче, еталона [106].

Порівняння рідин проводять у розсіяному денному світлі через 5 хв після приготування еталона, переглядаючи зразки вздовж вертикальної осі пробірок на чорному фоні. Розсіяння світла має бути таким, щоб еталон I легко відрізнявся від води, а еталон II легко відрізнявся від еталона I. Випробовувану рідину вважають прозорою, якщо вона витримує порівняння з водою або розчинником, використовуваним при приготуванні випробовуваної рідини при перегляді за описаних вище умов, або її каламутність не перевищує каламутності еталона I [106].

Реактиви [106]

Розчин гідразину сульфату. 1,0 г гідразину сульфату Р розчиняють у воді і доводять об'єм розчину водою до 100.0 мл. Розчин витримують протягом 4 - 6 год.

Розчин гексаметилентетраміну. 2.5 г гексаметилентетраміну розчиняють у 25.0 мл води у колбі місткістю 100 мл зі скляною притертою пробкою.

Вихідна суспензія. 25.0 мл розчину гідразину сульфату додають до приготованого розчину гексаметилентетраміну, перемішують і лишають на 24 год. Суспензія стабільна протягом 2 міс при зберіганні у скляному посуді, що не має дефектів поверхні. Суспензія не має прилипати до скла, і її необхідно ретельно збовтувати перед використанням.

Основна суспензія. 15.0 мл вихідної суспензії поміщають у колбу місткістю 1000.0 мл і доводять водою до позначки. Термін придатності основної суспензії 24 год.

Еталони. Приготування еталонів проводять відповідно до табл.4.2. Основну суспензію і воду перемішують і струшують безпосередньо перед використанням.

Таблиця 4.2.

	Еталон (мл)			
	I	II	III	IV
Основна суспензія	5	10	30	50
Вода	95	90	70	50

6. Контроль домішок

У тих випадках, коли немає підстав вважати якісь домішки особливо токсичними, часто не так важливо знати їхній справжній вміст. Важливо знати, що цей вміст не перевершує певний рівень . У таких випадках використовують метод внутрішньої нормалізації – як розчини порівняння звичайно використовують розчини самої випробовуваної субстанції різної концентрації, а вміст домішок знаходять у перерахунку на цю субстанцію [106].

У залежності від кількості різних розчинів субстанції, що наносять на хроматограму у вигляді розчинів порівняння, контроль загального вмісту домішок може бути однорівневим, дворівневим і трирівневим [106].

Типова регламентація вмісту домішки у трирівневому варіанті виглядає таким чином: "На хроматограмі випробовуваного розчину будь-яка пляма, крім основної плями, не має перевищувати за розміром й інтенсивністю поглинання або забарвлення пляму на хроматограмі розчину порівняння 1(... %), і тільки одна пляма може бути інтенсивнішою за пляму на хроматограмі розчину порівняння 2 (. .. %), і не більше ... плям можуть бути інтенсивнішими за пляму на хроматограмі розчину порівняння 3(. .. %)" [106].

7. Об'єм що витягається

Відбирають один контейнер. Переносять вміст у сухий мірний циліндр такої місткості, щоб визначуваний об'єм заповнив не менше 40 % номінального об'єму циліндра. Вимірюють об'єм, що витягається. Об'єм, що витягається, має бути не меншим за номінальний об'єм зазначений на контейнері [106].

8. Механічні включення

Для контролю використовують прилад, заснований на принципі світлоблокування, який дозволяє автоматично вимірювати кількість і розмір часток. Прилад калібрують, використовуючи дисперсійні зависі ФСЗ сферичних часток розміром від 5 мкм до 25 мкм. Стандартні частки дисперговані у воді, вільній від часток. Необхідно уникати агрепції часток дисперсійної фази [106].

Перемішують вміст зразка, повільно і безперервно перевертаючи контейнер п'ять разів. Якщо необхідно, обережно видаляють етикетки і ковпачки. Зовнішні поверхні контейнера, який розкривають, очищають струменем води, вільної від часток, Рі розкривають контейнер, уникаючи внесення будь-якого забруднення. Для видалення бульбашок повітря дають відстоятися розчину протягом 2 хв [106].

Відбирають чотири проби, не менше 5 мл кожна, і визначають кількість часток з розмірами, що дорівнюють або перевищують значення, зазначені у відповідному нормативному документі. Виключають результат, одержаний для

першої проби, і обраховують середню кількість часток у випробовуваному зразку [106].

Пакування.

По 10 скляних ампул на 1 мл за ТУ У 480945-005-96 разом з інструкцією по використанню вкладають у пачку за ГОСТ 64–071–89 з картону коробочного (хром-ерзац) за ГОСТ 7933–89 [107,108].

Групова та транспортна тара відповідно до ГОСТ 17768–90 [109].

Маркування.

На ампулі українською мовою нанесено: назву препарату, номер серії, термін придатності.

На пачці та етикетці групової тари українською мовою нанесено: «Україна», виробник, товарний знак та адресу, назву препарату латинською, українською та російською мовами, лікарську форму, кількість доз, кількість флаконів, «Для застосування внутрішньом'язово», умови зберігання, «Зберігати у недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер в країні імпортерів (за необхідності).

Номер серії та термін придатності допускається наносити на боковій стороні пачки методом тиснення.

На етикетці групової тари додатково вказують кількість упаковок.

Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192–96 [110].

Примітка. При поставці товару на експорт допускається текст маркування зазначати мовою, оговореною в контракті.

Транспортування.

Транспортування в закритих транспортних засобах всіма видами критого транспорту при температурі від 2°C до 8°C відповідно до ГОСТ 17768–90 [109].

Зберігання.

Зберігати у недоступному для дітей місці при температурі не вище 25 °C. [105].

Термін придатності.

3,5 роки. Для поліпропіленового контейнера: Зберігати не більше 2-х тижнів після першого відкриття контейнера [105].

Фармакологічні властивості.

Код АТС. J07BC01.

Фармакодинаміка. Після введення антигени активно починають взаємодіяти з організмом, викликаючи вимушену імунну відповідь у вигляді антитіл проти гепатиту Е [105].

Фармакокінетика. Механізм дії цього лікарського засобу є фізичним та не залежить від абсорбції у системний кровообіг [105].

Показання до застосування. Профілактика гепатиту Е [105].

Способи застосування та дози. Лікарський засіб призначений для внутрьшньом'язового введення. Одна ампула дорівнює 1 дозі вакцини [105].

Побічні дії. Можлива локальна побічна реакція у місці введення [105].

Протипоказання. Цей лікарський засіб протипоказаний дитям молодше 16 років [105].

Особливості застосування. Курс вакцинації становить 3 дози. Після першої вакцинації наступна відбувається через місяць. Остання вакцинація відбувається після 6 місяців від уведення першої дози [105].

Застосування у період вагітності або годування груддю. Нешкідливий. Не відрізняється від звичайного застосування [105].

Взаємодія з іншими лікарськими засобами. Не визначено [105].

Вплив на здатність управляти автотранспортом. Не впливає [105].

Умови зберігання. Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С в недоступному для дітей місці [105].

Строк придатності. 3,5 роки [105].

Умови відпуску. Без рецепта [105].

Упаковка. По 10 скляних ампул в упаковці [105].

4.1.5. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік

За даними на 2020 рік, найбрудніша вода в Україні знаходиться на Харківщині. Як зазначалось вище, ВГЕ прогресує та може передаватись через брудну воду. Тому, можна не безпідставно вважати, що жителі Харківської області знаходяться у групі ризику [111].

Найбруднішим за водою вважається Лозівський район. Відхилення від норми становлять 74,6%. А в районному центрі, місті Лозові, даний показник є ще вищим та складає 83,8%. За статистикою на 2021 рік, середня чисельність населення в даному районі становить близько 150 тис. жителів [111,112].

Як вже вище зазначалось, вакцина рекомендована для застосування особам від 16 років та старше. Тому, від загальної кількості населення відраховуємо близько 20%, що складають діти до 16 років. Загальна кількість населення становитиме 120 тисяч.

Зважаючи на кліматичні умови району, забрудненість води, громадську свідомість населення, які знають та притримуються правил особистої гігієни, кількість селищ, припускаємо мінімальний за статистикою показник захворюваності на ВГЕ, а саме 7% населення:

$$\frac{120 \cdot 7}{100} = 8,4 \text{ тис.}$$

Для повної імунізації рекомендується використання трьох доз у проміжку після першої через місяць та пів року [113]. Тож, необхідна кількість доз на хворе населення:

$$8400 \cdot 3 = 25200 \text{ доз}$$

Враховуючи те, що у коробці знаходиться 10 ампул (доз), кількість упаковок становить:

$$\frac{25200}{10} = 2520 \text{ упаковок}$$

Оскільки за одну серію одержується близько 100 упаковок, то кількість серій на рік становить:

$$\frac{2520}{100} \approx 26 \text{ серій}$$

4.2. Розрахунок потреби у субстанції для вакцини

4.2.1. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників субстанції.

Стосовно розробки ВПЧ-вакцин, Україна не розроблює власних ін'єкційних препаратів. Тому доречно проаналізувати, що нині пропонує світовий ринок вакцин та за яку ціну. Такий аналіз представлено в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Аналіз світового ринку ВПЧ-вакцин проти ВГЕ

Виробник, країна	Назва	Ціна за 1 дозу	Джерело
Xiamen Innovax Biotech Co., Ltd., Китай	Hecolin®	500 - 800 грн	[114]
GlaxoSmithKline, Бельгія	rHEV	1000 грн	[115]
Changchun Institute of Biological Products Co. Ltd., Китай	p179	-	[116]

Отже, як показано в табл.1.1. на ринку присутня замала кількість вакцин проти ВГЕ, а основним виробником є Китай. І це не дивно, адже КНР була одна із перших країн, хто почав розробляти ВПЧ-вакцини, а також стала першою, хто випустив вакцину проти ВГЕ [117].

Тож, робимо висновок, що виробництво таких вакцин є замалим та малодоступним. Тому, спираючись на цей фактор, а також на вартість 1 дози існуючих вакцин, можна запропонувати виробництво ВПЧ-вакцини проти ВГЕ в Україні.

4.2.2. Розрахунок річної потужності виробництва вірусного білку, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Спираючись на загальну статистику, в Україні хворих на ВГЕ 2-7%. В залежності від регіону ця цифра може змінюватись та досягати 12% та більше [96].

Для виробництва власної ВПЧ-вакцини проти ВГЕ пропонується спиратися на склад китайської вакцини Hecolin®. Основним компонентом є білок, який культивується в експресованій клітині *E. coli.*, та становить 30 мкг на 1 дозу

(0,5 мл). За приписанням до вакцини, препарат рекомендується для введення особам від 16 років.

В одній дозі міститься 30 мкг протеїну, як основної діючої речовини. Отже, необхідна кількість білку становить:

$$25200 \cdot 30 = 756\ 000 \text{ мкг} = 756 \text{ г}$$

Загальна інформація представлена в табл.4.4.

Таблиця 4.4

Узагальнені данні

Продукт	Кількість протеїну в 1 дозі, мкг	Кількість хворого населення Лозівського району, осіб	Особливості імунізації	Необхідна кількість протеїну
Несолін	30	8400	3 дози, проміжком в місяць та пів року	756 г

Річна потреба в протеїні була зазначена раніше і становить 144 г. За даними статті утворюється близько 30 мкг/л протеїну. Окремо треба зазначити, що в статті зазначено вже кількість очищеного протеїну, тому розраховувати кількість втрат цільового продукту при виділенні не потрібно.

Кількість культуральної рідини необхідної для отримання 144 г протеїну становить:

$$\frac{756}{0,3} = 2,52 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 2,52 м³ культуральної рідини необхідно 230 робочих трудоднів (Т_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 2,52 / 230 \approx 11 \text{ л}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (V_{крц}):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 11 \cdot 11 / 24 \approx 5,6 \text{ л},$$

де T_{цф} - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1 год, перевірку на герметичність – 1 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1 год,

охолодження ферментеру – 2 год, завантаження поживного середовища – 1 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 4 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 11 години. K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$).

Геометричний об'єм ферментера для отримання 5,6 культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{\Gamma} = V_{\text{цк}}/K_{\text{зап}} = 5,6/0,6 \approx 9,3 \text{ л,}$$

де $K_{\text{зап}}$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Отже, вибираємо стандартний ферментер об'ємом $V_{\Phi} = 10$ л

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зф}} = V_{\text{цк}}/V_{\Phi} = 5,6/10 = 0,56$$

За виробничий цикл отримують $V_{\text{кр}} = 5,6$ л культуральної рідини.

Кількість поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом з врахуванням втрат в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря (10%) становитиме:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}}/(1-E_{\Phi}) = 5,6/(1-0,1) = 6,2 \text{ л,}$$

де E_{Φ} – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

Виробничий біосинтез здійснюють у ферментері з робочим об'ємом $V_{\text{роб.1}} = 6,2$ л.

При вибраному коефіцієнті заповнення $K_{\text{зап}} = 0,6$ можливий геометричний об'єм ферментера $V_{\Phi.1} = 6,2/0,6 = 10,3$ л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{\text{сф}} = 10$ л та уточнюємо прийнятий раніше коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап.1}} = V_{\text{роб.1}}/V_{\text{сф}} = 6,2/10 \approx 0,62$$

Уточнений коефіцієнт дозволяється для ферментерів з аерацією.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища. Тоді кількість поживного середовища у ферментері становитиме:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}}/(1+X_{\Phi}) = 6,2/(1+0,1) \approx 5,6 \text{ л}$$

де X_{Φ} – доза посівного матеріалу для ферментера.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить:

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пс1}} = 6,2 - 5,6 = 0,6 \text{ л}$$

0,6 л посівного матеріалу ми можемо отримати використовуючи колби об'ємом 750 мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Кількість колб становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм2}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зап}}) = 600 / (750 \times 0,2) = 4 \text{ шт.}$$

Таким чином, для одержання посівного матеріалу необхідно 6 колб.

Отже, процес одержання посівного матеріалу для забезпечення виробничого культивування у ферментері об'ємом 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6 буде проходити у 1 етап.

РОЗДІЛ 5

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ВІРУСНОГО БІЛКУ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ

5.1. Обґрунтування вибору біологічного агента, поживного середовища для його культивування

Для промислового виробництва ВПЧ-вакцин використовуються різноманітні експресійні системи, представлені бактеріальними, дріжджовими або рослинними клітинами, а також клітинами комах та ссавців. Щодо бактеріальних систем, найбільш вживаними вважаються клітини *Escherichia coli*. Щодо дріжджових, тут вибір біологічного агента дещо ширший і представлений клітинами *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* та *Hansenula polymorpha*. З грибів для експресії за часту використовують *Aspergillus niger*, наприклад, для виробництва ВПЧ вакцини проти гепатиту В [94,118].

Використання *E. coli* для виробництва ВПЧ-вакцин виправдано тим, що дана бактерія має повністю розшифрований геном, а також виведені комерційні штами для виробництва таких засобів. Клітини даної бактерії використовуються для виробництва вакцин проти Еболи, BFD вірусу папуг, гепатиту В та Е, вірусу папіломи людини, бактеріофагу MS2, норовірусу, вірус фізалісу, поліомавірусу та ін. [94].

E. coli є найбільш широко використовуваною системою експресії також через більшу кількість переваг, до яких входить низька вартість, швидке зростання, високий рівень експресії та ін. Однак ще не всі гени вірусів можливо експресувати в системі кишкової палочки. Відомо, що ротавірус VP2 при експресії в клітині *E. coli* не утворював ВПЧ. У випадку з VP6 тіла включення утворювались після експресії, а великі скупчення спостерігались під час процесу повторної очистки. Як показують дослідження 2014 року, стійкість

					НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Губецький А.С.				РОЗДІЛ 5 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ ВІРУСНОГО БІЛКУ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Стабнікова О.В.						60	105
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

і однорідність ВПЧ можна покращити, оптимізуючи умови очистки, такі як рН, іонна сила та температура [119].

Тож, доречно розглянути платформу *E. coli* для виробництва ВПЧ вакцини проти ВГЕ. Порівняння біологічних агентів представлено в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Порівняльна характеристика різних біологічних агентів для виробництва ВПЧ-вакцини проти ВГЕ

Біологічний агент	Поживне середовище, г/л	Умови культивування	Концентрація білку, мг/л*	Література
<i>E. coli</i> BL21 (плазміда - рЕТ30а-ORF2.2)	Триптон - 11,8 Дріжджовий екстракт - 23,6 Дикалій гідрофосфат - 9,4 калій дигідрофосфат - 2,2 гліцерин - 4 канаміцин – 0,05 ШПТГ – 0,24	37 °С 4 год 250 об/хв рН=7	1	[120]
<i>E. coli</i> BL21 (плазміда - рЕТ-23а)	Триптон - 16 Дріжджовий екстракт - 10 NaCl – 5 Ампіцилін – 0,1	37 °С 12 год 180 об/хв рН=7	1	[121]
<i>E. coli</i> BL21 (плазміда - ORF2)	KCl – 0,186 MgSO ₄ – 2,4 NaCl – 0,5 Триптон – 20 Дріжджовий екстракт – 5	37 °С 4 год 180 об/хв рН=7	30	[122]

Примітка*: в таблиці зазначено концентрацію очищеного продукту

З табл.5.1. видно, що найкраще підібрано умови для *E. coli* BL21, трансформований плазмідом ORF2. Але, дана таблиця не висвітлює повністю собівартість культивування та умовної вартості 1 г продукту. Таке порівняння представлено в таблицях 5.2. та 5.3.

**Розрахунок та порівняння вартості поживних середовищ для
культивування біологічних агентів**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>E. coli</i> BL21 (плазміда - рЕТ30а-ORF2.2)	Триптон - 11,8	850	10,03	1
	Дріжджовий екстракт - 23,6	1100	25,96	2
	Дикалій гідрофосфат - 9,4	186	1,75	3
	Калій дигідрофосфат - 2,2	120	0,27	4
	Гліцерин - 4	120	0,48	5
	Канаміцин – 0,05	7195	0,36	6
	ІПТГ – 0,24	410	0,10	7
Вартість 1 л поживного середовища - 38,95 грн				
<i>E. coli</i> BL21 (плазміда - рЕТ-23а)	Триптон - 16	850	13,6	1
	Дріжджовий екстракт - 10	1100	11	2
	NaCl – 5	4,80	0,03	8
	Ампіцилін – 0,1	980	0,10	9
Вартість 1 л поживного середовища – 24,73 грн				
<i>E. coli</i> BL21 (плазміда - ORF2)	Триптон – 20	850	17	1
	Дріжджовий екстракт – 5	1100	5,5	2
	MgSO ₄ – 2,4	84	0,21	10
	NaCl – 0,5	4,80	0,003	8
	KCl – 0,186	40	0,007	11
Вартість 1 л поживного середовища – 22,72 грн				

Примітка (ціни наведено станом на 01.06.2021): 1 - <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>, 2 - <https://prom.ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 3 - <https://prom.ua/p1058099172-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>?, 4 - <https://prom.ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>, 5 - <https://prom.ua/p263888006-glitserin-dow-chemical.html>?, 6 - https://www.sigmaaldrich.com/UA/ru/search/kanamycin?focus=products&page=1&perPage=30&sort=relevance&term=Kanamycin&type=product_name, 7 - <https://russian.alibaba.com/product-detail/manufacture-supply-isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside-cas-367-93-1-iptg-367-93-1-1600279035281.html?spm=a2700.8699010.29.16.296c6670FPzHUu>, 8 - https://prom.ua/p1274957839-hlorid-natriya.html?token=v2%3A8UO8XHru36pQa-97k8Q1c9JsseOX1rBde54gTXF8Eb0OY8z6ds9XIFR19FuXz99Z5o-q5gYuvCH4zj9H6FluQoSIDsIswS79DE7JZqyNO3uYjnorg&campaign_id=2346336&product_id=1274957839&source=prom%3Asearch%3Aserp&locale=ru&primelead=Mw&from_spa=true, 9 - <https://vettorg.info/veterinarnie-preparati/antibakterialnie-preparati/ampitsillin-plyus-1000-g-avico>, 10 - https://klebrig.com.ua/p1323818049-sulfat-magniia-farm.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjw55-HBhAHEiwARMCszh0iXMrhBVyqDRU1COM4vRkgoJ9dsBXRwAPTWxrjZF-xAKCSea9choC-TcQAvD_BwE, 11 - <https://prom.ua/p907647978-kalij-hloristyj-melkozernistyj.html?&primelead=MC43NQ>

Узагальнююча характеристика

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація білку, мг/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного білку за годину, г/год
<i>E. coli</i> BL21 (плазмідна - рЕТ30а-ORF2.2)	38,95	1	38950	4	0,00025
<i>E. coli</i> BL21 (плазмідна - рЕТ-23а)	24,73	1	24730	12	0,00008
<i>E. coli</i> BL21 (плазмідна - ORF2)	22,72	30	745,7	4	0,0075

Тож, як видно з таблиць 5.2. та 5.3., найкращим продуцентом є *E. coli* BL21 трансформований плазмідною ORF2, який має ряд переваг. Даний штам культивується на найдешевшому середовищі, має найнижчу умовну вартість за 1 г білку та культивує найбільшу кількість цільового продукту за 1 годину. Тож, подальший опис будемо вести само по цьому штаму.

5.2. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

E. coli BL21 – це факультативний анаероб. Тобто бактерія може жити як в аеробних так і в анаеробних умовах. Для культивування цього біологічного агенту з ціллю отримання ВПЧ-вакцини застосовуються кисневі умови. Тому, обираємо культивування в аеробних умовах. Ступенева аерація 1,0 об/хв створить необхідні умови для культивування. Для забезпечення диспергування кисню в усьому об'ємі середовища та для інтенсифікації масообміну ферментер треба оснастити мішалкою.

Оскільки для культивування не потрібно інтенсивного перемішування (зазначено 180 об/хв), а в середовищі для культивування немає в'язких компонентів у великих концентраціях, то доречно обрати звичайну та просту лопатеву мішалку, яка повністю забезпечить усі необхідні умови культивування.

Як спосіб культивування доречно обрати саме глибинний, оскільки він має ряд переваг перед поверхневим. І слід зазначити, що використання поверхневого способу культивування для *E. coli* взагалі не застосовується.

Дані бактерії не потребують постійної підтримки в експоненційній фазі, оскільки білок синтезується на стаціонарній. Тож, цей факт виключає використання безперервного способу культивування і призводить до вибору щодо періодичного.

Щодо температурного режиму, *E. coli* це мезофільний мікроорганізм. В статті зазначено температуру культивування в 37 °С, що відповідає оптимальній температурі для культивування даного біологічного агента.

Отже, для культивування кишкової палички використовується постійне продування киснем, перемішування лопатевою мішалкою при оптимальній температурі росту. Культивування проводять глибинним методом, періодичним способом.

Оптимальні умови культивування наступні: рН = 7, тривалість - 4 години, температура культивування - 37 °С, кількість обертів - 180 об/хв, продування киснем.

Культивування *E. coli* BL21 відбувається на двох середовищах. Середовище №1 використовується для накопичення біомаси, та має наступний склад (г/л):

Пептон – 10,
Дріжджовий екстракт – 5,
NaCl – 5.

Середовище №2 використовується для отримання білку та має наступний склад:

Триптон – 20,
Дріжджовий екстракт – 5,
MgSO₄ – 2,4,
NaCl – 0,5,
KCl – 0,186.

Поживні середовища попередньо стерилізують. Для цього, компоненти розбиваються на композиції, оскільки мають різний температурний режим та/або небажані реакції, такі як випадання в осад нерозчинних солей.

Як вже було вище зазначено, середовище №1 використовується для накопичення біомаси. Ця стадія проходить безпосередньо в колбах. Принцип поділу на композиції зазначено вище:

Композиція А: пептон, дріжджовий екстракт. Режим стерилізації – 121 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: NaCl. Режим стерилізації – 131 °С, 0,15 МПа протягом 40 хв.

Для виробничого біосинтезу використовується середовище №2 та має наступний поділ на композиції:

Композиція А: триптон, дріжджовий екстракт. Режим стерилізації – 121 °С, 0,05 МПа протягом 30 хв.

Композиція Б: MgSO₄, NaCl, KCl. Режим стерилізації – 131 °С, 0,15 МПа протягом 40 хв.

5.3. Обґрунтування стадій виділення і очищення вірусного білку для виробництва вакцини

Особливістю технологій виділення та очистки вакцин є їх специфіка виробництва, а саме лабораторні умови, оскільки в промисловому масштабі такі препарати не виробляють. Пов'язано це не лише з культивуванням самого вірусу, а й з методикою очистки самого цільового продукту, яка передбачає використання висоочисного обладнання та різних розчинників для виготовлення самої вакцини. Тому, цей факт дозволяє розглядати технологічні рішення очистки для даних препаратів, які неможливо використовувати у промисловому масштабі.

Загальна схема для очистки ВПЧ-вакцин була запропонована в 2016 році та виглядає наступним чином [123]:

1. Пробірки для ультрацентрифуги стерилізуються з відкритим верхом 25 мм × 89 мм із 70% етанолом у витяжці з біобезпеки. Перед використанням переконуються, що етанол висох.

2. Завантажують до 32 мл надосадової рідини в чисту пробірку. Рекомендується мінімальний об'єм 25 мл для запобігання колапсу та пошкодження неналежним чином заповнених ультрацентрифужних пробірок.

3. Обережно доливають супернатанти зі стерильним 3 мл 20% гліцерину в PBS (об./об.). Переконаються, що пробірки збалансовані.

4. Проводять центрифугування при 135000 обертів протягом 4 годин при 4 °С.

5. Надосадову рідину зливають, стежачи за тим, щоб гранулюваний осад не впливав з пробірки.

6. Ресуспендують осаджені ВПЧ на дні пробірок зі стерильним PBS шляхом інтенсивного піпетування. Кількість PBS, необхідна для ресуспендування ВПЧ, залежить від загального виходу білка та подальших застосувань. Як правило, ресуспендують кожний осад ВПЧ щонайменше в 100 мкл.

7. Зберігають зразки 4 °С для короткочасного зберігання та -80 °С для тривалого зберігання

Звісно така схема є доволі узагальненою та не передбачає індивідуальну специфіку кожної вакцини. Тому доречно розглянути технологічні рішення очистки конкретної ВПЧ-вакцини проти гепатиту Е.

В 2018 році вакцину очищали наступним чином. Культуральну рідину центрифугують при 4000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С. Для очищення білка бактеріальний осад ресуспендують в буфері для лізису, що містить 50 мМ трибази (рН 8,0), 300 мМ NaCl, 10 мМ імідазолу, 1 мМ PMSF та 10% (об./Об.) гліцерину. Клітини лізують ультразвуком на льоду, а клітинні фракції очищують центрифугуванням при 12000 об/хв протягом 20 хвилин при 4 °С. Подальше очищення рекомбінантного білка проводять за допомогою афінної хроматографії з Ni-NTA. Чистий білок елюють буфером для елюції, що містить 50 мМ NaH₂PO₄, 300 мМ NaCl та 10 мМ імідазолу, що знижує градієнт рН (8, 6, 5 і 4) відповідно. Чистоту білка підтверджують 12,5% SDS-PAGE-аналізом, а загальну концентрацію білка вимірювали методом Бредфорда. Після перевірки SDS-PAGE зібрані чисті фракції діалізують проти 50 мМ PBS (рН 7,2–7,4) обережним

перемішуванням протягом ночі при 4 °С і. Зберігають готовий білок при -70 °С до використання [124].

В 2014 році методика була схожа, але має певні відмінності. Індуковані клітини з культури збирали центрифугуванням при 4000 об/хв при 4 °С протягом 20 хв. Клітинні гранули суспендували в 10 мл сольового розчину, забуференого фосфатами (PBS), а потім лізували 3 циклами в рідкому азоті та холодній воді (4 °С) та обробляли ультразвуком 3 рази за 10 секунд. Лізат центрифугували при 15000 об/хв при 4 °С протягом 30 хв. Для розчинення білків, осад ресуспендували в буфері для лізису (6 М гуанідину HCl, 20 мМ NaH₂PO₄, 500 мМ NaCl, pH 8,0) і перемішували протягом 30 хв при кімнатній температурі. Суспензію очищали центрифугуванням при 15 000 об/хв протягом 30 хвилин при 4 °С. Один мілілітр агарози Ni-NTA (Qiagen) врівноважували з буфером для лізису і додавали до прозорої надосадової рідини. Суспензію зразка агарози обережно струшували при кімнатній температурі протягом 30 хв, щоб білок зв'язався з агарозою, а потім центрифугували при 1000 об/хв протягом 2 хв. Надосадову рідину видаляли, і агарозу послідовно промивали 3 рази 10 об'ємами буфера для зв'язування (8 М сечовина, 20 мМ NaH₂PO₄, 500 мМ NaCl, pH 8,0). Потім агарозу переносили на колонку і послідовно двічі промивали 3 обсягами промивного буфера (буфер для зв'язування з лінійним градієнтом pH 8,0, 6,5 і 6,0). Білок, зв'язаний з агарозою Ni-NTA, елюювали 4 об'ємами буфера для елюції (буфер зв'язування з лінійним градієнтом pH 5,0, 4,5 і 4,0). Елюат повторно обробляли шляхом діалізу в 500 мл PBS, що містить 10% гліцерину, при 4 °С протягом 4 годин і концентрували за допомогою відцентрового фільтрувального блоку Amicon Ultra-4 з молекулярною масою 30 кДа (EMD Millipore, Billerica, MA, США) [125,126].

Як видно з описаних вище технологічних рішень, за 4 роки очистка ВПЧ-вакцини проти гепатиту Е дещо спростилася. Але основні моменти залишилися незмінними, а це:

1. Відокремлення біомаси
2. Руйнування клітин
3. Очистка від уламків клітин

4. Очищення білку

Обґрунтування відокремлення біомаси

Існує різноманітна кількість різних методів відділення біомаси. Основними виділяють фільтрацію, флотацію, центрифугування та сепарування. За рядом переваг та недоліків будемо здійснювати вибір того чи іншого методу. Спираємось на те, що по завершенню даного процесу нам необхідно отримати біомасу, а не супернатант.

Фільтрація призначення для відділення твердої та рідкої фази за допомогою напівпроникних мембран. Але, такий метод не є ефективним для відокремлення біомаси, оскільки він передбачає великі втрати, що є основним недоліком. Тому, даний метод застосовувати недоцільно для ВПЧ-вакцини [127].

Флотація – це відділення різних фракцій з рідин за допомогою продування газом. Метод можна застосовувати в безперервних процесах, але головним недоліком є велика втрата біомаси, що не дозволяє застосовувати це технологічне рішення для наших цілей [127].

Центрифугування – звичайний та загальноживаний варіант відокремлення біомаси. Порівняно з минулими методами – не має на стільки значних втрат необхідної маси. Але, порівняно з сепаруванням вважається менш ефективним [127].

Сепарування є подібним до центрифугування, але як «розділювач» виступає міжтарільчастий простір, коли в попередньому варіанті використовується сітка, тканина, або просто звичайна відцентрова сила з використанням флаконів та інших ємностей. До недоліків сепарування відноситься його можливий механічний вплив на клітини, що доволі суттєво може вплинути на очистку вакцин [127].

Тож, при аналізі методів відокремлення біомаси найкращим варіантом явно є саме метод центрифугування. До того ж, в зазначених технологічних рішеннях щодо вакцини проти гепатиту Е саме такий тип відділення й використовується. Тому, залишаємо наш вибір саме на методі центрифугування.

Обґрунтування методу руйнування клітин

За загальною схемою руйнування клітин відбувається за допомогою лізису клітин. Існує кілька способів такої обробки, які можна розділити на механічні та хімічні методи, які включають використання детергентів або розчинників, застосування високого тиску або використання кульового млина або французького преса. Найбільш проблематичним недоліком цих методів є складний контроль і регулювання параметрів процесу і, тим самим, вплив [128].

Наприклад, метод заморозки є доволі ефективним та поширеним, але головним його недоліком є тривалість процесу, який включає безпосередньо заморожування клітин та їх подальше розморожування [128].

Хімічний та ензиматичний лізис має певну специфічність щодо оброблювального продукту. Вони можуть мати як негативний так і позитивний вплив на дослідний зразок. Ще й за часту потребують комбінованого застосування з іншими методами [128,129].

Гомогенізація під високим тиском передбачає високовартісне обладнання та ще його належне обслуговування. Пов'язано це з отворами, які дуже легко забиваються після кожного процесу обробки, але доволі важко відмиваються [128].

Найчастіше, для кишкової палички використовують саме ультразвуковий лізис. Ультразвукове порушення клітин бактерій *E.coli* є швидким, простим, надійним і відтвореним [129].

Переваги ультразвукового лізису [129]:

- точний контроль лізису (інтенсивність, амплітуда, температура)
- оптимальна адаптація до конкретних зразків
- контроль температури для дуже маленьких і дуже великих зразків (мкл до літрів)
- чисто механічна обробка
- лінійне масштабування від лабораторії до виробництва

Оскільки технологію ми обираємо для виробництва вакцин, які виготовляються в лабораторних умовах, тож доречно обрати саме метод ультразвуку як найкращий варіант.

Обґрунтування методу видалення зруйнованих клітин

Уламки клітин видаляють за допомогою звичайних методів відокремлення твердих та рідких фаз одна від одної. Порівняння таких методів вже було наведено вище.

Тож, для видалення будемо обирати метод центрифугування, оскільки в наведених схемах очистки ВПЧ-вакцин зазначено саме цей метод а також за його простоту та практичність.

Обґрунтування методів очистки білку

За наведеними технологічними схемами наступним кроком є очистка за допомогою хроматографії та поточне промивання отриманого елюату діалізом.

Загальні методи фракціонування білків зазначено на рис. 5.1.

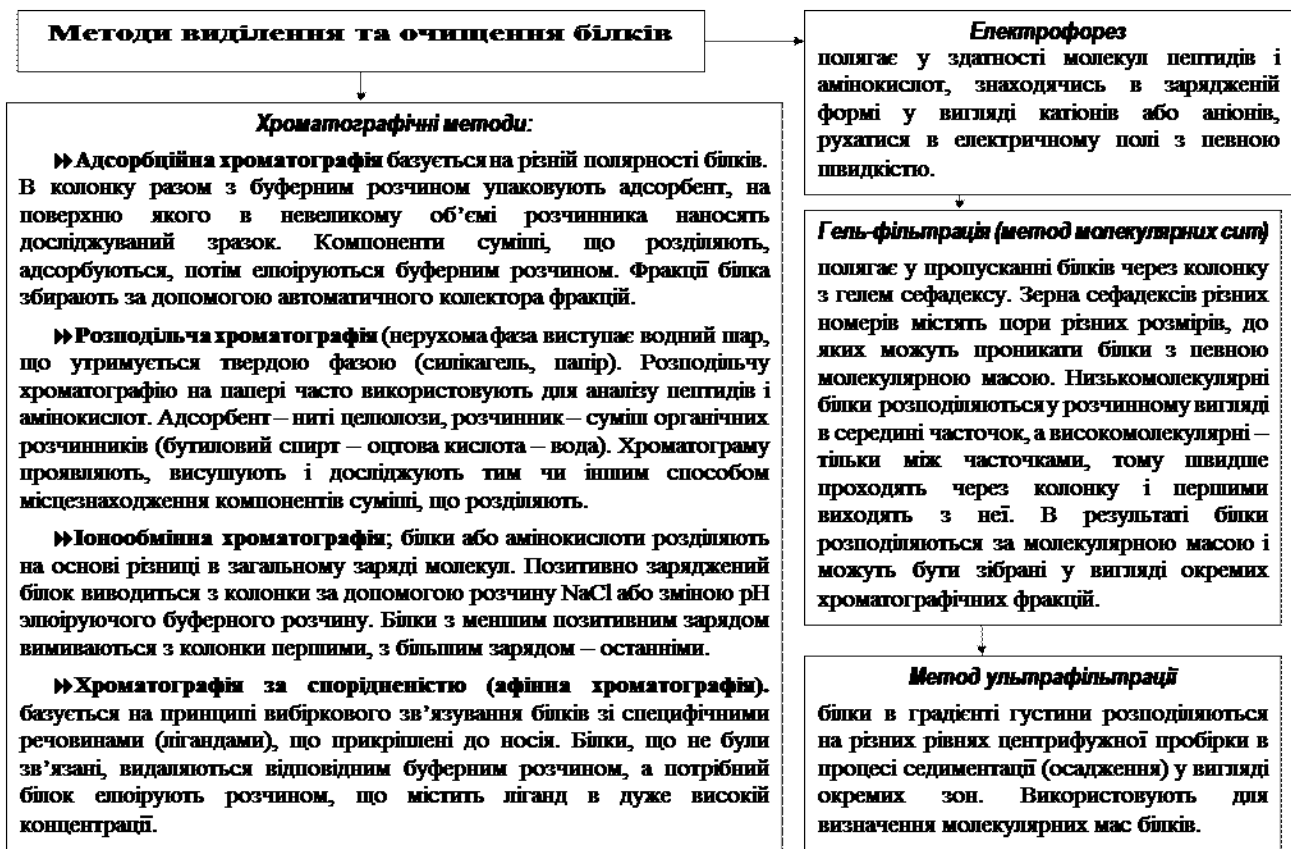


Рис 5.1. Загальні методи фракціонування білків [130]

Проаналізувавши літературу, яка стосується безпосередньо виробництва ВПЧ-вакцин проти гепатиту Е та просто проти різних типів гепатиту можна зробити висновок, що саме для цього цільового продукту застосовується лише афінна хроматографія, після якої йде обов'язковий діаліз. Інших варіантів

можливої очистки просто не передбачено. Тому, розглядати інші методи у розрізі цього питання не є коректним [124-126,131,132].

5.4. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва вакцини, вибору первинної упаковки

Обґрунтування вибору чистих приміщень

Для виробництва вакцин передбачається чисте приміщення класу чистоти А. Це локальні зони для технологічних операцій, що потребують найменшого ризику контамінації, наприклад зони приготування лікарських форм, наповнення, закупорки, вскриття стерильних ампул і флаконів, змішування інгредієнтів в асептичних умовах. Умови класу А передбачають робоче місце з ламінарним потоком повітря ($0,45 \pm 20$ %)м/с [133].

Підготовка води очищеної

Для виробничих потреб передбачено отримання та використання води очищеної. За своїми показниками вона відповідає вимогам Державної Фармакопеї України. Даний тип води отримується з мережі міського водопостачання [134].

Методи отримання, зберігання та транспортування води очищеної виконуються відповідно до СТП 01-06 «Вода очищена в цеху по виробництву лікарських засобів». Для забезпечення потреб виробництва водою очищеною використовують систему поетапного очищення питної водопровідної води за допомогою системи подвійного осмосу. Система забезпечує стабільні показники очищеної води при умовах виконання параметрів та режимів роботи технологічного обладнання [134].

Підготовка персоналу

Обслуговуючий персонал приступає до роботи, попередньо провівши санітарну підготовку і пройшовши санітарно-гігієнічну обробку в чистому технологічному одязі. Одяг попередньо проходить стадії прання, сушіння, термічної обробки та пакування.

Для запобігання мікробного забруднення в процесі роботи персонал отримує правила виробничої санітарної та особистої гігієни, дотримує технологію виробництва, передбачену нормативно-технічною документацією.

При проведенні технологічного процесу персонал дотримує правила охорони праці. Перед початком роботи проводять огляд підготовки всього обладнання до проведення технологічного процесу. Експлуатацію всього обладнання ведуть відповідно до інструкцій з експлуатації та інструкцій з технічного обслуговування.

Вибір миючих та дезінфікувальних засобів

На виробництві для прибирання приміщень використовують спектр наступний мийних та дезінфікувальних засобів:

1) мийний засіб Meratem– лужний засіб для миття робочих зон та обладнання. Забезпечує ефективну та довготривалу гігієну. Легко змивається. Не має барвників та запахів [135];

2) мийний засіб Calgonit CF 312– лужний пінний миючий засіб з активним хлором і дезінфікуючим ефектом. Стійкий до жорсткої води, створює стійку піну, легко змивається. Видаляє олійно-жирові, білкові забруднення, а також інші стійкі органічні відкладення [136];

3) мийний засіб PRIMA МК – висококонцентрованою кислотний пінний миючий засіб, що представляє собою оптимізовану суміш ПАВ і комплексоутворюючих речовин. Застосовується для очищення технологічного обладнання, варильних термокамер, різних ємностей, резервуарів, куттерів, шприців, столів, стін, підлог і т. д [137];

4) дезінфікуючий засіб для поверхонь Дезмарк – дезінфекції поверхонь в приміщеннях, предметів обстановки, промислового обладнання при інфекціях бактеріальної, вірусної та грибкової етіології у вогнищах інфекційних захворювань, а також застосовують для боротьби з пліснявими грибами [138];

5) Засіб дезінфікуючий для поверхонь DEZALDUM – засіб для дезінфекції та миття поверхонь, для боротьби з пліснявими грибами. Засіб ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, виявляє протівірусну дію до вірусу поліомієліту та, відповідно, до менш стійких вірусів, зокрема - грипу, вірусу імунодефіциту людини, кору, епідемічного паротиту, вірусних гепатитів А, В, С, D, норо-, аденовірусів, ротавірусних гастроентеритів,

ЕCHO, Коксакі, коронавірусів людини, в тому числі SARS-CoV-2, що викликає COVID-19, та інших вірусів [139];

б) Засіб дезінфікуючий для поверхонь ДЕЗО «Дезосепт» – призначений для прибирання приміщень. У складі містить 17-18% надоцтової кислоти [140];

Засоби чергують з періодичністю в 3 місяці для запобігання утворенню резистентних штамів мікроорганізмів. Для кожного прибирання застосовують одну і ту саму концентрацію мийно-дезінфекційного засобу. Рішення про підвищення концентрації розчину приймається лише в тому випадку, якщо результати мікробіологічного контролю чистоти приміщення являються незадовільними.

Обґрунтування вибору первинної упаковки ЛЗ та її підготовки

Залежно від якісного і кількісного складу, а також отриманих властивостей нині розрізняють два класи і декілька марок скла, що використовується у виробництві ін'єкційних лікарських форм [141].

До вітчизняних марок (сортів) ампульного скла належать НС — нейтральне й АБ — безборне скло. Ампульне скло марки НС-3 є найбільш хімічно стійким із нейтральних стекол завдяки великій кількості бору оксиду (6 %). Це скло використовується для виготовлення ампул і флаконів для розчинів речовин, що піддаються гідролізу, окиснюванню тощо (наприклад розчини солей алкалоїдів). Нейтральне скло марки НС-1 містить більшу кількість бору оксиду і меншу натрію оксиду порівняно з марками НС-2 і НС-2А і використовується для ампулування лікарських речовин, менш чутливих до лугів (розчини натрію хлориду, магнію сульфату, кальцію хлориду тощо). Нейтральне скло марок НС-2 і НС-2А в наш час використовуються в основному для виготовлення флаконів для крові та інфузійних препаратів. Безборне ампульне скло марки АБ-1 є лужним і використовується для виготовлення ампул і флаконів, в які поміщають стійкі в масляних розчинах речовини, тому при цьому вилужування практично не відбувається [141].

Тож, обираємо ампулу НС-3 за її стійкість та стабільність.

Миття ампул є однією із самих відповідальних стадій ампульного виробництва. Вона складається із зовнішнього і внутрішнього миття [133].

Для зовнішнього миття ампул застосовується напівавтомат типу АП-2М2 Маріупольського ЗТО. Напівавтомат являє собою апарат із кришкою, в який на підставку, що вільно обертається, установлюється касета з ампулами. Над касетою розташований душувальний пристрій, через який на ампули подається фільтро-вана гаряча вода. Під дією струменів води касета обертається, завдяки чому досягається рівномірне миття ампул. Продуктивність автомата з обробки ампул місткістю 1—2мл досягає 30тис. ампул за годину [133].

Внутрішнє миття ампул здійснюють такими способами: ва-куумним, ультразвуковим і віброультразвуковим, термічним і шприцевим [133].

Турбовакуумний спосіб характеризується більш ефективним миттям за рахунок миттєвого погашення розрідження і ступінча-стого вакуумування. Процес проводять в турбовакуумному апараті з автоматичним управлінням за заданими параметрами [133].

Усередину апарата поміщають касети з ампулами капілярами вниз, закривається кришка, і створюється розрідження. Робоча ємкість апарата заповнюється гарячою водою демінералізованою так, щоб капіляри були занурені в ній. Розрідження підвищується приблизно в 2рази, й усередині ампули також створюється вакуум. Потім швидко відчиняють повітряний електромагнітний клапан великого діаметра, й в апарат миттєво надходить профільтроване стерильне повітря. Це створює різкий перепад тиску, і вода спрямовується всередину ампул у вигляді турбулентного потоку, що фонтанує, відділяючи від поверхні забруднення і переводячи їх у завислий стан. Далі повітряний клапан закривають, апарат з'єднують з вакуумною лінією, розрідження знову підвищується, і вода зі завислими частинками з великою швидкістю видаляється з ампул і з робочої ємкості апарата. Висока швидкість видалення води перешкоджає затримці механічних частинок на стінках і пари або твердих частинок. Пульсуючі кавітаційні бульбашки відшаровують частинки забруднень.

Оптимальними параметрами цього процесу є частота ультразвуку 18—22кГц і температура мийної води 30—60 °С [133].

Перевагою цього способу перед іншими, крім високої ефективності видалення міцно утримуваних забруднень (головним чином частинок скла), є можливість відбракування ампул із мікротріщинами, які під дією ультразвуку руйнуються [133].

Висушування і стерилізація ампул

Для висушування і стерилізації на великих фармацевтичних підприємствах використовують тунельні сушарки, в яких касети з ампулами переміщуються по транспортеру при нагріванні інфрачервоними променями в сушильній частині до 170 °С, а в стерилізаційній — до 300 °С [133].

Більш ефективно для стерилізації ампул застосовувати нові види стерилізаторів із ламінарним потоком нагрітого стерильного повітря. У них повітря з невеликим надлишковим тиском за допомогою вентилятора подається в калорифер, нагрівається до температури стерилізації 180—300 °С, фільтрується і через розподільний пристрій надходить у стерилізаційну камеру у вигляді ламінарного потоку по всьому її перерізу, що створює рівномірне температурне поле по всьому перерізу камери. Фільтрування через стерилізаційні фільтри і невеликий підпор повітря гарантує відсутність механічних забруднень і мікрофлори в зоні стерилізації [133].

РОЗДІЛ 6
ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО
БІОСИНТЕЗУ

6.1. Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. графічна частина), наведено у табл. 6.1.

Таблиця 6.1.

Специфікація ділянки допоміжних робіт та виробничого біосинтезу
рекомбінантного білку *E. coli* B21

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ - 1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металефою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф- 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний фільтр, клас очистки G2 - G4. Розмір: 592x592x292 мм. Робоча температура до 80 °С. Фільтруючий матеріал: відкритопористий пінополіуретан. Виробник: «TWE group» (Германія) ¹
К- 3	Компресор	1	Компресор з об'ємом ресивера на 50 літрів, оснащений однопоршневим двигуном. Потужність двигуна - від 1500 до 1900 Вт. Продуктивність - від 150 до 206 л/хв. Виробник: «DNIPRO-M» (Україна) ²
Т-4 Т-6	Теплообмінник-охолоджувач Теплообмінник-нагрівач	2	Мідноалюмінієвий теплообмінник в трьохрядному виконанні, з крапле-вловлювачем і піддону з патрубками для відводу конденсату, теплоносій-пара або вода. Матеріал ламелей – алюміній. Товщина ламелей 0,2 мм, крок 2,5 мм. Виробник ООО «ОЛІТАН плюс» (Україна) ³
Р-5	Ресивер	1	Повітряний ресивер, об'ємом 500 л, з зливом конденсату. Виробник: ООО «Юниверсал Солюшн» (Україна) ⁴
Ф-7	Індивідуальний фільтр	1	Фільтр (Р)–GSL N. Фільтруючий матеріал – нержавіюча сталевна сітка, швидкість фільтрування – 0,025 м/с, Е = 95 %. Виробник: «Donaldson» (США) ⁵

НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Губецький А.С.		
Перевір.		Стабнікова О.В.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ				
		Лім.	Арк.	Аркушів
			76	105
Кафедра БТМ				

ФР-8	Ферментер	1	Ферментер Biostat® Cplus на 10 л. Розмір, м: 1,0x1,9x0,75. Матеріал – сталь AISI 304. Оснащений сорочкою, мішалкою та барботером. Швидкість обертів: 20 – 1500 об/хв. Виробник: «Sartorius AG» (Германія) ⁶
Н-9	Насос перистальтичний	1	Перистальтичний насос PTL05, продуктивність 2,5-10 л/год. Корпус – алюміній, тиск – макс. 4 бар. Виробник: «Tarlo AB» (Швеція) ⁷
Ц-10	Центрифуга	1	Центрифуга Sorvall BIOS A. Максимальна місткість – 10 л. Максимальна швидкість 6250 об/хв. Габарити (в×ш×д, мм): 1015×816×990. До комплекту входять ротор кутовий Fiberlite F6-10x1000 LEX, ємності на 1000 мл (2 шт. в комплекті) з поліпропілену або полікарбонату, змінна кришка для ротора, комплект для обслуговування ротора. Виробник: «Thermo Fisher Scientific Inc.» (США) ⁸
УЗ-11	Ультразвуковий диспергатор	1	Ультразвуковий диспергатор УЗДН-М1200Т 1200Вт. Наконечник ø20. Об'єм диспергування 50-1000 мл. Має датчик температури та процесорне управління. Виробник: ООО "НПП "Академприбор" (Україна) ⁹
Ц-12	Центрифуга	1	Настільна високошвидкісна великовантажна центрифуга з охолодженням AWTech H2050R. Максимальна швидкість 20500 об/хв. Максимальна місткість - 4×750 мл. Габарити (в×ш×д, мм): 440×560×800. Виробник: АНО «АВТех» (Росія) ¹⁰
Ц-13	Центрифуга	1	Настільна високошвидкісна великовантажна центрифуга з охолодженням AWTech H2500R. Максимальна швидкість 25000 об/хв. Максимальна місткість - 6×100 мл. Габарити (в×ш×д, мм): 450×710×560. Виробник: АНО «АВТех» (Росія) ¹¹
К-14	Колонка для афінної хроматографії	1	Колонка Agilent SEC3. Внутрішній діаметр 21,2 мм. Довжина 300 мм. Розмір пор 300Å. Виробник: «Agilent Technologies, Inc.» (США) ¹²
Д-15	Мембранна трубка	1	Мембранна трубка OrDial D35. Молекулярна маса затримуваних часток = 3500. Ширина 25 мм, довжина 15 м, діаметр 16 мм. Виробник: «ORANGE SCIENTIFIC» (Бельгія) ¹³
З-16	Збірник на 10 л	1	Реактор з нержавіючої сталі об'ємом 10 літрів. Робочий тиск 3,4 бар або повний вакуум, робоча температура -28 ° С до 176 ° С. Ємність реактора обладнана сорочкою з робочим тиском 8,6 бар або вакуум, температура від -20 ° С до 176 ° С. Виробник: «Perry Videx» (Англія) ¹⁴

Примітка: 1 - <https://ventfilter.kiev.ua/p/252584136-filtr-gruboy-ochistki-vozduha-panelnyy/>, 2 - https://dnipro-m.ua/uk/kompressory-i-aksessuary/voz dusnye-kompressory/?gclid=CjwKCAjw55-NBhANEiwARMCszn5QyYogDZ oefA0gS0_DcisFcFew_pOy bD2-

[d85KmbKJyOHKFET9jhoCvD0QAvD_BwE](https://alltan.com.ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html), 3 - <https://alltan.com.ua/p2090292-teploobmennik-vodyanoj.html>,
4 - <https://unisol.in.ua/p633970838-resiver-vozdushnyj-500.html>, 5 - <https://www.donaldson.com/ru-ru/compressed-air-process/products/compressed-air-gas/filter-elements/competitive-fit-filters/>, 6 -
<https://www.sartorius.com/download/9612/broch-biostat-cplus-sbi1505-e-data.pdf>, 7 -
<https://tapflo.ua/products/hose-pumps/seriya-ptl#oglyad>, 8 - <https://www.dia-m.ru/catalog/lab/centrifugi-vysokoproizvoditelnye-bolee-6-l/tsentrifuga-sorvall-bios-a-s-okhlazhdeniem-6250-ob-min-ob-min-12000g-napolnaya/>, 9 -
<https://prom.ua/p2870284-ultrazvukovye-dispergatory-uzdn.html>, 10 -
<https://www.awt.ru/catalog/centrifugi-laboratornye-medicinskie/h2050rrr/#content>, 11 -
<https://www.awt.ru/catalog/centrifugi-laboratornye-medicinskie/h2500r/#content>, 12 -
<https://www.agilent.com/en/product/biopharma-hplc-analysis/aggregate-fragment-analysis/agilent-bio-sec-3>, 13
- <https://dv-expert.org/laboratornoe-oborudovanie/pcr/orange+scientific/membrannaya-trubka-orange-scientific-dlya-dializa-ordial>, 14 - <https://perryvidex.eu/product/10-ltr-3-fv-bar-int-8-fv-bar-jkt-0-25kw-agit-11268-02>,

6.2. Опис технологічної схеми виробничого біосинтезу

Технологічна схема синтезу протеїну ВГЕ передбачає допоміжні роботи, а саме підготовку аераційного повітря та приготування та стерилізація поживних середовищ. До технологічного процесу відноситься підготовка посівного матеріалу та виробниче культивування.

Технологічна схема виробництва білку *E. coli* BL21 зазначено в *графічній частині* курсового проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря

Необхідний об'єм атмосферного повітря забирають на висоті 15 м.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Повітря пропускають через набивний фільтр, де відбувається затримка пилу та інших крупних часточок бруду до ступеня очищення $E = 75\%$. Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволока.

ДР 1.3. Компресування повітря

Відбувається стиснення повітря у компресорі до температури 220-250 °C і тиску 0,4 МПа.

ДР 1.4. Охолодження повітря

У теплообміннику температура повітря знижується до 25-30 °C.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для унеможливлення конденсації пари на волокнах головного та індивідуальних фільтрів охолоджене повітря у теплообміннику (Т-8) нагрівають до температури 35 °С.

ДР 1.6. Головне тонке очищення повітря

Повітря пропускають через головний фільтр, в якому фільтрувальним матеріалом є нержавіюча сталеві сітка. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту в колбах на качалках

На цій стадії необхідно приготувати 540 мл поживного середовища (600 з врахуванням інокуляту). Вміст та розрахунок компонентів представлено в табл.6.2.

Таблиця 6.2.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 540 мл середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 540 мл середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Пептон	10	5,4	А	400
Дріжджовий екстракт	5	2,7		
NaCl	5	2,7	Б	140

ДР 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 5,4 г пептону та 2,7 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 500 мл, за допомогою мірного циліндру на 500 мл доливають 392 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 121 °С упродовж 30 хв.

ДР 2.1.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 2,7 г NaCl. Наважку поміщають у колбу об'ємом 250 мл. За допомогою мірного циліндру на 250 мл, додають 137 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація поживного середовища для виробничого біосинтезу в ферментері на 10 л

На цій стадії необхідно приготувати 5,4 л поживного середовища (6 л з врахуванням інокуляту, що надійшов з минулої стадії). Вміст та розрахунок компонентів представлено в табл.6.3.

Таблиця 6.3.

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 5,4 л середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л	Вміст компонента у 5,4 л середовища, г	Композиція	Об'єм композиції, мл
Триптон	20	108	А	1000
Дріжджовий екстракт	5	27		
MgSO ₄	2,4	13	Б	4400 (10% конденсат)
NaCl	0,5	2,7		
KCl	0,186	1,1		

ДР 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 108 г триптону та 27 г дріжджового екстракту. Наважки поміщають у колбу об'ємом 2 л, за допомогою мірного циліндру на 1 л доливають 865 мл дистильованої води і перемішують. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 121 °С упродовж 30 хв.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 13 г MgSO₄, 2,7 г NaCl та 1,1 г KCl. Наважку поміщають у робочий ферментер на 10 л. За допомогою мірного циліндру на к л,

додають 3943 мл дистильованої води і перемішують. Стерилізацію проводять при температурі 131 °С упродовж 40 хв.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *E. coli* BL21 зберігають у пробірках зі скошеним LB-агаром. Пересіви здійснюють кожні 3-4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП 3.2. Одержання робочої культури на агаризованих середовищах

Колекційну культуру, що зберігається на скошеному LB-агарі, пересівають петлею в пробірки зі скошеним середовищем того ж складу і вирощують 24 години при температурі 37 °С.

ТП 3.3. Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у попередньо простерилізовану колбу об'ємом 1 л в асептичних умовах вносять 400 мл розчину композиції А (від ДР 2.1.1), 140 мл розчину композиції Б (від ДР 2.1.2). Перемішують і розливають по 135 мл у 4 стерильних качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою *E. coli* BL21, вирощену на LB-агарі, асептично вносять 3 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і переносять у колбу. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію, одержану з трьох пробірок. Бактерії вирощують у колбах на качалці (37 °С, швидкість перемішування 100 об/хв) упродовж 12 годин.

Періодично (кожні 4 год) відбирають пробу культуральної рідини для мікробіологічного контролю відсутності сторонньої мікробіоти.

ТП 4. Виробничий біосинтез

ТП 4.1. Виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 10 л

Ферментер об'ємом 10 л вже містить 4,4 л простерилізованого розчину композиції Б (від ДР 2.2.2). Потім, за допомогою зйомного засівного пристрою, у

ферментер подають 1 л розчину композиції А (від ДР 2.2.1) і вмикають перемішувач. Посівний матеріал (від ТП 3.3) подають через засівну колбу. Для цього у попередньо простерилізовану засівну колбу об'ємом 1 л в боксі зливають посівний матеріал з 4 качалочних колб. Засівну колбу під факелом з'єднують з окремим штуцером і самопливом передають вміст колби в інокулятор.

Температура культивування 37 ± 1 °С, швидкість перемішування становить 180 об/хв, витрати повітря 1 л/л·хв. Тривалість культивування становить 4 годин.

Періодично відбирають пробу КР для мікробіологічного контролю відсутності сторонньої мікробіоти. Відпрацьоване повітря передають на стадію знешкодження відходів (до ЗВ 12.1).

ТП 5. Відокремлення біомаси

Культуральну рідину вручну заливають у ємності для центрифуги, обов'язково врівноважуючи кожен ємність. Підготована культуральна рідина потрапляє до центрифуги (Ц-2). Встановлюється режим центрифугування: 4000 об/хв при 4 °С протягом 20 хв. Супернатант подається на утилізацію (до ЗВ 12.2). Отримана біомаса піддається наступній обробці.

ТП 6. Руйнування клітин

Осад, у вигляді біомаси, вивантажують вручну в скляну ємність. Біомасу ресуспендують в буфері для лізису, що містить 50 мМ триази (рН 8,0), 300 мМ NaCl, 10 мМ імідазолу, 1 мМ PMSF та 10% (об./об.). Клітини лізують ультразвуком на льоду за допомогою ультразвукового диспергатора (УЗ-3), щонайменше 3 рази протягом 10 секунд. Загальний час обробки становить 1 хв. Рідкі відходи на утилізацію (до ЗВ 12.2).

ТП 7. Очищення від уламків клітин

Після обробки ультразвуком, клітинні фракції очищують за допомогою центрифуги (Ц-4). Встановлюється режим центрифугування: 12000 об/хв протягом 20 хвилин при 4 °С. Отримані відходи утилізують (до ЗВ 12.3)

ТП 8. Афінна хроматографія

ТП 8.1. Попередня обробка та центрифугування

30 мілілітрів агарози Ni-NTA змішують з дистильованою водою і додають до прозорої надосадової рідини. Суспензію зразка агарози обережно струшують при кімнатній температурі протягом 30 хв, щоб білок зв'язався з агарозою. Суспензію заливають у флакони центрифуги (Ц-5) та центрифугують при 1000 об/хв протягом 2 хв. Надосадову рідину видаляють (до ЗВ 12.2).

ТП 8.2. Промивання на колонці

Білок зв'язаний з агарозою вручну переносять на колонку (К-6) та послідовно промивають 3 рази 10 об'ємами буфера для зв'язування (8 М сечовина, 20 мМ NaH₂PO₄, 500 мМ NaCl, рН 8,0). Після чого, двічі промивають 3 обсягами промивного буфера (буфер для зв'язування з лінійним градієнтом рН 8,0, 6,5 і 6,0). Білок, зв'язаний з агарозою Ni-NTA, елюють 4 об'ємами буфера для елюції (буфер зв'язування з лінійним градієнтом рН 5,0, 4,5 і 4,0). Рідкі відходи на утилізацію (до ЗВ 12.2).

ТП 9. Діаліз

Елюат повторно обробляють в 500 мл 50 мМ PBS, що містить 10% гліцерину, при 4 °С протягом 4 годин (Д-7). Рідкі відходи на утилізацію (до ЗВ 12.2).

ТП 10. Перерозчинення

Діалізований елюат перерозчиняють в буферному розчині у збірнику на 10 л (З-), який містить 0,8 мг гідроксиду алюмінію.

ТП 11. Зберігання

Отриманий розчин заливають у скляну тару на 7 л та закупорюють для подальшої роботи. Зберігають готовий білок при -70 °С.

ЗВ 12. Знешкодження відходів

ЗВ 12.1. Знешкодження повітряних відходів

Відходи, що надійшли з ТП 4.1. знешкоджуються у системі очистки повітря та виводяться в атмосферу.

ЗВ 12.2. Знешкодження рідких відходів

Відходи, що надійшли з ТП 5, ТП 6, ТП 8.1, ТП 8.2., ТП 9 знешкоджуються в очисних спорудах та виводяться до каналізації.

ЗВ 12.1. Знешкодження твердих відходів

Відходи, що надійшли з ТП 7. знешкоджуються компостуванням.

6.3. Контроль ділянки біосинтезу

Мікробіологічний контроль

Культивування *E. coli* BL21 проводиться в строго асептичних умовах. Тому є необхідність проводити мікробіологічний контроль, щоб впевнитись у відсутності контамінації. Періодично, з ферментера відбирають зразки культуральної рідини для аналізу.

Мікробіологічний контроль здійснюється двома шляхами: прямий висів на агаризовані поживні середовища і мікроскопіювання.

Культуральну рідину розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) – для виявлення дріжджів і грибів.

Для мікроскопіювання використовують метод мікроскопіювання з імерсійною системою. Мікроскопіювання проводять у світловому мікроскопі з імерсійною системою.

Для приготування препарату на чисте знежирене предметне скло, в асептичних умовах, за допомогою стерильної петлі наносять невелику краплину культуральної рідини. Краплю, яка містить мікроорганізми, розподіляють по склу за допомогою бактеріальної петлі (діаметр мазка близько 1 см). Мазок висушують без нагрівання, при кімнатній температурі, до повного випаровування вологи. Потім на абсолютно сухий препарат за допомогою скляної палички наносять 1–2 краплини імерсійного масла, фіксують і розглядають з об'єктивом х90. Після роботи ватю, змоченою етиловим спиртом, знімають залишки масла з імерсійного об'єктива [22].

Колонії *E. coli* на поживному агарі можуть бути гладкими (тип S), низько опуклими, з блискучою поверхнею, цілим краєм, сірого кольору. Можуть зустрічатися R-типу або мукоїдні форми. Зростає на простих поживних середовищах, таких як поживний агар або поживний бульйон. Для гемолізу

використовують триптоказосоевий агар з додаванням 5-ти % овечої крові. На селективних середовищах мають наступний вигляд: GEAM/Levine - чорні колонії з металеву поверхнею, агар Mac Conkey - червоні колонії, агар Rambach - синьо-зелені колонії, Leifson - червоні колонії, Istrati-Meiert - жовті колонії [23].

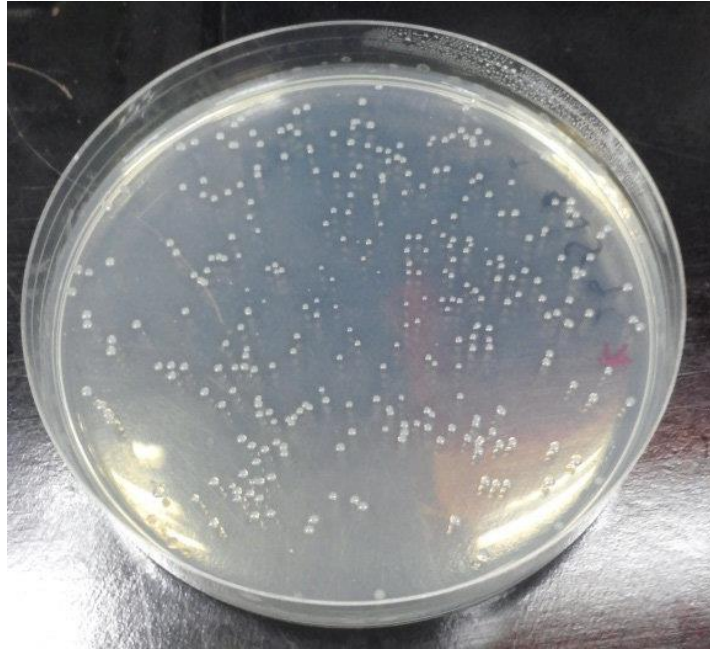


Рис.6.1. Колонії *E. coli* BL21 на LB-агарі [24]

Під мікроскопом представляють собою прями палички або коккобацили. Розміри: 0,5-1,5 x 2,0-6,0 мкм. Фарбування за грамом – негативне. Не спороутворювальні. Бактеріях рухомі перитриховими джгутиками або нерушливі взагалі [23].

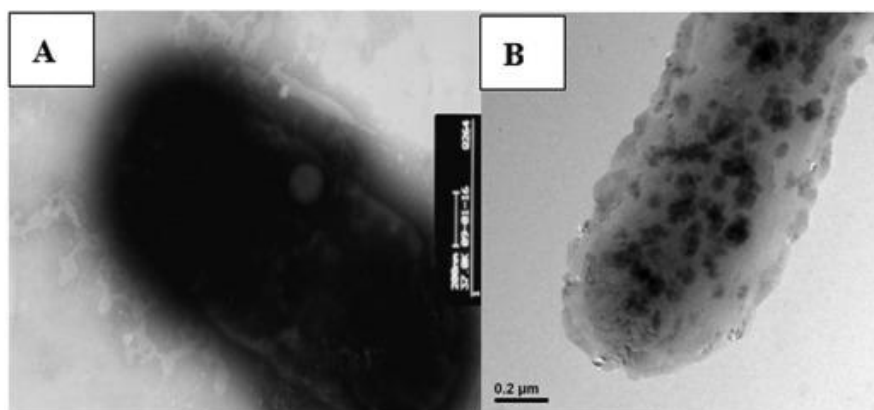


Рис.6.2. Клітини *E. coli* BL21 під мікроскопом: А – звичайна клітина; В – клітини з рекомбінантним білком [25]

Показники росту і синтезу *E. coli* BL21

Визначення концентрації біомаси

Від культуральної рідини відбирають 1 мл та розчиняють в 9 мл дистильованої води. Отриманий зразок заливають у кювету, як контроль беруть дистильовану воду та вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 595 нм. Отримані результати переводять по калібрувальному графіку.

Визначення концентрації протеїну

Для визначення концентрації білка застосовується метод Бредфорда. Метод заснований на реакції барвника кумасі (Coomassie Brilliant Blue G-250) з аргініном та гідрофобними амінокислотними залишками. Розчин має блакитне забарвлення з максимумом поглинання при 595 нм. Таким чином збільшення світлопоглинання розчину при довжині хвилі, що дорівнює 595 нм, пропорційно кількості білка в розчині [26].

Методика визначення концентрації протеїну. Для початку, культуральну рідину центрифугують на 10 000 об/хв протягом 20 хв при 4 °C (Eppendorf 5804-R, Німеччина). Рекомбінантні поліпептиди очищають нікелево-хелатною афінною хроматографією за допомогою мітки His6. Біомасу обробляють ультразвуком у буфері для лізису гуанідинію (6 М гуанідин-НСl, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-Cl, рН 8,0). Поліпептиди, зв'язані з нікелем, елюють денатураційним буфером (8 М сечовини, 100 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Tris-Cl, рН 3,5). Перед аналізом поліпептиди розбавляють карбонатно-бікарбонатним буфером (рН 9,6) для ренатурації. До 0,1 мл дослідного зразка додають 5 мл реактиву Бредфорда. Отриману субстанцію перемішують до стійкого блакитного кольору. Після чого, дослідний зразок аналізують на спектрофотометрі на довжині хвилі 595 нм. Отримані результати звіряються з калібрувальним графіком по бичачому сироватковому альбуміну (BSA) [21,26,27].

Визначення концентрації вуглецю

Джерелом вуглецю при культивуванні є триптон та дріжджовий екстракт, тож необхідно визначити концентрацію вуглецю в амінокислотах. Таке визначення проводять методом ВЕРХ.

Методика визначення концентрації вуглецю. Культуральну рідину центрифугують протягом 10 хв при 10°C і 4000 оборотах на хвилину в Heraeus

Megafuge. Отриманий супернатант розбавляють дистильованою водою і пропускають через мембрану з діаметром пор 0.22 мкм. Подальше визначення проводять методом ВЕРХ. Обладнання складається з колонки Shimpack (250 мм × 4,6 мм), оснащеною захисною стінкою, що містить один і той же пакувальний матеріал (12,5 мм × 4,6 мм, 4 мкм). Колонку термостатували при температурі 37 °С, зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв, ін'єкційний об'єм 5 мкл. Рухомою фазою А є 0,3 М розчин ацетату натрію, що містить 5% ацетонітрилу (рН 6.5); рухомою фазою В є суміш ацетонітрилу, метанолу та води Milli-Q (20:60:20, об/об/об, система Milli-Q плюс, Millipore Corporation, США). Перед початком аналізу колонку зрівноважували в 100% розчині А протягом 10 хв. Виявлення флуоресценції здійснювалось λ випромінюванням при збудженні 250 нм і довжині хвилі випромінювання 395 нм [28].

Визначення концентрації азоту

В якості джерела азоту в середовищі виступають триптон та дріжджовий екстракт. Для визначення азоту амінокислот використовується метод формольного титрування (або титрування по Серенсену).

Принцип методу ґрунтується на здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних амінокислот. Аміногрупи при цьому втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином луку [29].

Методика визначення амінного азоту. До 1 мл супернатанту додають 9 мл води. При необхідності розчин нейтралізують до рН=7 шляхом додавання 0,1 М розчину NaOH або 0,1 М розчину HCl. Після, додають 2 мл розчину формальдегіду, перемішують і титрують 0,1 М розчином NaOH до значення рН 9,1, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо рожевого забарвлення (індикатор – 1% розчин фенолфталеїну). Паралельно проводять контрольний дослід (паралельно титрують дистильовану воду). 1 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 1,4 мг амінного азоту [30].

Карту постадійного контролю представлено в табл.6.4.

Таблиця 6.4.

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.2. Груба очистка повітря	Атмосферне повітря, ступінь чистоти повітря на виході з фільтру	Аналіз повітря до і після фільтрації	До та після проходження повітря через фільтр грубого очищення	$E = 80 \%$
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, тиск	Манометр	Після компресора	$P = 0,4 \text{ МПа}$
Кт 1.4 Охолодження повітря та видалення зайвої вологи	Охолоджене повітря, температура, вологість	Термометр Психометричний метод	На виході з теплообмінника – охолоджувача та ресивера	$t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $W = 60 \%$
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр	Після нагрівання повітря	$t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$
Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь чистоти повітря на виході з фільтру, перепад тиску	Перевірка ступеня очищення Манометр	До та після проходження повітря через головний фільтр	$E = 95 \%$ ΔP згідно технічних характеристик

Продовження табл.6.4.

1	2	3	4	5
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь чистоти повітря на виході з фільтру	Перевірка ступеня очищення	До та після проходження повітря через індивідуальний фільтр	$E = 99,99998 \%$
Кт, Км 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=121^{\circ}\text{C}$ $P = 0,05 \text{ МПа}$ $\tau = 30 \text{ хв,}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, фільтрування, асептика	Фільтр, мікробіологічний контроль	Стерилізація через вакуум фільтр, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=131^{\circ}\text{C}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$ $\tau = 40 \text{ хв,}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, тиск, температура, час витримки, стерильність	Манометр, годинник, мікробіологічний контроль	Тиск визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=121^{\circ}\text{C}$ $P = 0,05 \text{ МПа}$ $\tau = 30 \text{ хв,}$ відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, фільтрування, асептика	Фільтр, мікробіологічний контроль	Стерилізація через вакуум фільтр, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t=131^{\circ}\text{C}$ $P = 0,15 \text{ МПа}$ $\tau = 40 \text{ хв,}$ відсутність мікробіоти

Продовження табл.6.4.

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.1. Підтримання колекційної культури	Колекційна культура, температура, частота пересівів, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура протягом зберігання. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 4^{\circ}\text{C}$, τ пересів = 1-3 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.2. Одержання робочої культури <i>E. coli</i> BL21 на агаризованому середовищі	Колекційна культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.3. Вирощування робочої культури <i>E. coli</i> BL21 на агаризованому середовищі	Робоча культура, температура, тривалість вирощування, мікробіологічна чистота	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час вирощування. Мікробіологічна чистота після вирощування культури	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км 3.4. Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, частота обертів качалки, мікробіологічна чистота культури	Годинник, термометр технічний, тахометр, мікробіологічний контроль	Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування. Мікроскопіювання – після вирощування культури в колбах	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 12$ год, $\omega = 100$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Закінчення табл.6.4.

1	2	3	4	5
<p>Кх, Кт, Км 4.1. Виробничий біосинтез</p>	<p>Поживне середовище в ферментері, рН, культуральна рідина, температура тривалість культивування, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота, концентрація білку</p>	<p>Датчик рН годинник термометр технічний, тахометр, витратомір, манометр, мікроскоп, метод Бредфорда</p>	<p>рН визначають і регулюють після змішування всіх компонентів поживного середовища в ферментері. Температура і швидкість обертання контролюються і підтримуються автоматично весь час вирощування Мікроскопіювання – під час вирощування культури у ферментері. Відбір проб культуральної рідини – кожні 4 год</p>	<p>рН=7 t = 37°C, τ = 4 год, ω= 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти, кінцева концентрація білку = 30 мг/л</p>

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ

7.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва вакцини

Специфікацію обладнання, зображеного на апаратурній схемі (див. *графічна частина*), наведено у табл. 7.1.

Таблиця 7.1.

Специфікація ділянки післяферментаційних процесів виробництва ВПЧ-вакцини проти гепатиту Е

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
ПЗ - 1	Повітрязабірник	1	Обладнаний металефою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф- 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр грубої очистки G3 - G4. Розмір: 592мм x 892мм. Робоча температура до 100 °С. Фільтруючий матеріал: хімволокно, поліестер. Виробник: «ТОВ "АИС-КЛИМАТ" (Україна) ¹
К- 3	Компресор	1	Компресор Matarì M340C22-1. Потужність двигуна – 2,2 кВт. Продуктивність – до 420 л/хв. Виробник: «Matarì» (Японія) ²
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Охолоджувач Вентс ОКВ 400x200-3. Розмір: 400x200 мм. Матеріал – оцинкована сталь. Виробник: «VENTS» (Україна) ³
Ф-5	Фільтр тонкого очищення	1	Фільтр тонкої очистки Н-11. Розмір: 592мм x 892мм.. Фільтруючий матеріал: мельблоун. Матеріал – оцинкована сталь. Ступінь очищення – більше 95%. Виробник: ТОВ "АИС-КЛИМАТ" (Україна) ⁴
Ф-6	Фільтр недефективного очищення	1	Фільтр ФяС-У класу U-15. Матеріал – алюміній та скловолокно. Робоча температура до 80 °С. Ступінь очищення – більше 99%. Виробник: "Фолтер-Україна" (Україна) ⁵

<i>НУХТ БТЕК 02.02.03 КР ПЗ</i>				
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Губецький А.С.</i>			
<i>Перевір.</i>	<i>Стабнікова О.В.</i>			
<i>Реценз.</i>				
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>			
РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ				
		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
			92	105
<i>Кафедра БТМ</i>				

Продовження табл.7.1

Ф-7	Піщаний фільтр	1	Піщаний фільтр. Продуктивність – 10 м ³ /год. Діаметр фільтру – 500 мм. Робочий тиск – 3,5 бар. Виробник: «Hayward» (США) ⁶
Ф-8	Фільтр вугільний	1	Вугільний фільтр Ecosoft FPA-1054-СТ. Продуктивність – 0,6 м ³ /год. Розмір: 260 x 1580 мм. Робочий тиск – 3,5 бар. Виробник: «Ecosoft» (Україна) ⁹
3-9 3-13	Збірник на 200 л	2	Збірник на 200 л. Матеріал – нержавіюча сталь AISI 304. Виробник: ООО «САН-ТЕХНО» (Україна) ⁷
Н-10 Н-14	Насос перистальтичний	3	Насос перистальтичний МР-6118.12. Продуктивність – 226 л/год. Тиск до 1,4 бар. Потужність двигуна 0,09 кВт. Виробник: «DEBEM» (Італія) ⁸
Ф-11	Фільтр для пом'якшення води	1	Фільтр Ecosoft FU 2472CE15. Продуктивність системи до 14,6 м ³ /год. Розмір: 130 x 650 x 2600 мм. Виробник: «Ecosoft» (Україна) ¹⁰
УФ-12	Установка зворотнього осмосу	1	Установка зворотнього осмосу Aquarum AMRO-250 ECO. Продуктивність – 200-300 л/год. Матеріал корпусу – нержавіюча сталь AISI 304. Пори фільтрелементу – 1 мкм. Виробник: «Aquarum» (Україна) ¹¹
A-15	Автоматична лінія для миття, сушки, стерилізації, наповнення, запайки ампул	1	Устаткування для миття, сушіння, наповнення та запаювання ампул ВХАЗ. Дане обладнання включає ультразвукову миючу машину CLQ, установку для сушіння та стерилізації ампул RSM та установку для наповнення та запаювання ампул AGF. Продуктивність до 15000 ампул/год. Температура стерилізації до 320 °С. Точність наповнення ±2%. Виробник: «Shanghai IVEN Pharmatech Engineering Co., Ltd.» (Китай) ¹²
C-16	Стерилізатор прохідного типу	1	Паровий стерилізатор автоклав типу M1-ST. Стерилізаційна камера та парогенератор виготовлена з корозійностійкої сталі AISI321, товщиною стінки 3 мм. Кришку парогенератора виготовлено з корозійностійкої сталі AISI321, товщиною стінки 10 мм. Трубопроводи виготовлено з корозійностійкої сталі AISI304. Залишкова вологість не більше 1%. Виробник: «Полтава Медоборудование» (Україна) ¹³
C-17	Інспекційна машина для ампул і флаконів	1	Інспекційна машина для ампул і флаконів Strunk Bosch KVL B06. Кількість робочий місць – 1. Виробник: «Bosch» (Німеччина) ¹⁴
E-18	Етикувальна машина	1	A205 машина для горизонтального етикетування циліндричних флаконів та вкладання їх в лоток. Автоматизована лінія. Габарити (д×ш×в, мм): 4050×1440×1450. Виробник: «Colamark Technologies Limited» (Китай) ¹⁵

Закінчення табл.7.1

ПМ-19	Пакувальна та маркувальна машина	1	JDZ-260P Автоматична машина для пакування ампул та флаконів. Продуктивність – до 260 упаковок. Габарити (д×ш×в, мм): 4800×1600×1860. Виробник: «Hunan Grand Packing Machinery Co., Ltd» (Китай) ¹⁶
ГП – 20	Автомат групової упаковки	1	Автомат для групового упаковки в картони серія 710. Максимальна продуктивність – 20 коробів за хв. Виробник: «Трепко Group» (Польща) ¹⁷

Примітка: 1 - <https://prom.ua/p203201321-filtr-karmannyj-gruboj.html>, 2 - <https://storgom.ua/product/kompressor-matari-m340c22-1.html#properties-tab>, 3 - https://moystroy.com.ua/okv-400h200-3?gclid=CjwKCAiA24SPBhB0EiwAjBgkhhCfmMINKNBUQFaPKZohlVIK-QbnptvtKju-QOVybFYSN2pU8ZSdhoCpG8QAvD_BwE, 4 - <https://prom.ua/ua/p206908809-filtr-karmannyj-tonkoj.html>, 5 - <https://prom.ua/p658357123-filtry-ulpa-sverhvysokoeffektivnoj.html>, 6 - <https://prom.ua/p620661218-filtr-peschanyj-pro.html?&primelead=MS42>, 7 - <https://prom.ua/p1144927320-reaktor-200l-parovoj.html>, 8 - https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-6/, 9 - https://filter.ua/shop/bytovaya_voda/magistralnye/ot_khlora_i_organiki/ecosoft_fra-1054-ct_ugolnyy_filtr.html, 10 - <https://xn--80afdezrft5a5ph.com.ua/p1177323485-promyshlennaya-sistema-umyagcheniya.html>, 11 - <https://www.aqua-room.com.ua/sistema-obratnogo-osmosa-aquarum-amro-250-eco>, 12 - <http://pharm-equipment.ru/6-ampoule-washing-drying-machine.html>, 13 - <https://medsolve.com.ua/meditsinskim-uchrezhdeniyam/oborudovanie/sterilizatsionnoe->, 14 - <https://intimac.it/poderzannye-masiny/ecbda8/-strunk-bosch-kvl-b06/>, 15 - http://www.colamark.com/products/A205R_ru.html, 16 - <https://ru.grand-packing.com/JDZ-260P-%D0%90%D0%B2%D1%82%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F-%D0%BC%D0%B0%D1%88%D0%B8%D0%BD%D0%B0-%D0%B4%D0%BB%D1%8F-%D1%83%D0%BF%D0%B0%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%BA%D0%B8-%D0%B0%D0%BC%D0%BF%D1%83%D0%BB-%D0%B8-%D1%84%D0%BB%D0%B0%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D0%B2-pd74381477.html>, 17 - <http://www.trepko.com/ru/nashe-predlozhenie/sistemy-gruppovoj-upakovki/seria-710-avtomat-dlya-gruppovoj-upakovki-v-kartony.html>

7.2. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ

До технологічної схеми відносяться технологічний процес (відокремлення біомаси, руйнування клітин, очищення від уламків клітин, афінна хроматографія, діаліз та перерозчинення).

Технологічна та апаратурна схеми представлені в *графічній частині* роботи.

7.2.1. Опис допоміжних робіт

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.1 Підготовка обладнання

ДР 1.1.1 Приготування мийного розчину Meratem

Готується 0,1% робочий розчин Meratem. Для цього у переносну ємність, об'ємом 10 л, вносять 1 мл концентрату Meratem та додають 10 л води.

ДР 1.1.2 Приготування робочого розчину Дезмарк.

Для щоденного прибирання потрібна кількість робочого розчину 0,1% становить 20 л. Для цього у переносну ємність об'ємом 30 л вносять 2 мл дезрозчину, додають 20 л питної води та перемішують до повного розчинення.

За генерального прибирання приміщень необхідна кількість розчину становить 25 л. Для приготування однієї порції мийного розчину у переносну емальовану ємність вносять 2,5 мл Дезмарку, додають 25 л питної води та перемішують до повного розчинення.

ДР 1.2 Підготовка виробничих приміщень

ДР 1.2.1 Щоденне прибирання.

Прибирання проводиться за допомогою деззасобу Дезмарк (від ДР 1.1.2.) концентрацією 0,1%.

ДР 1.2.2 Генеральне прибирання

Для обробки приміщень при ген.прибиранні застосовують розчин Дезмарк (від ДР 1.1.2.) концентрацією 0,1%. Окремо перевіряється показник мікробного обнасінення поверхонь, значення КУО має бути меншим за 1000.

ДР 1.3 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.3.1 Миття та ополіскування обладнання

Для миття обладнання та комунікацій застосовують мийні розчин (від ДР. 1.1.1). Для миття застосовується СІР-мийка. Робочий розчин подають насосом на миття обладнання у відповідності з виставленим режимом миття: 15 хв промивання, 30 хв миття розчином, 15 хв ополіскування. Мийний розчин циркулюється, і повторно використовується для миття наступного обладнання.

ДР 1.3.2 Технічний огляд

Після миття та ополіскування ємкісного обладнання ретельно проводять його огляд для виявлення можливих неущільнень в комунікаціях та запірній арматурі на обладнанні. У разі їх виявлення проводять підтягування різьбових з'єднань.

ДР 1.3.3 Перевірка обладнання на герметичність

Закривають усю запірну арматуру ємнісного обладнання і закачують насосом повітря до рівня надлишкового тиску $P = 0,1-0,2$ МПа. Далі перекривають вентиль подачі повітря і фіксують показання манометра на кришці апарату та час витримки (30-60 хв) в операційному журналі. Апарат вважається герметичним, якщо падіння тиску не перевищує 0,01 МПа.

ДР 1.3.4 Стерилізація обладнання

Нагрів апарата. Попередньо в сорочку апарата подають пару і прогривають обладнання до температури 80-90 °С.

Стерилізація. Відкривається вся запірну арматура і подається гостра пара. При досягненні в апараті температури стерилізації 130-135 °С закривають усю арматуру, крім парової, і витримують 1,5 год (тиск 0,15 МПа).

Охолодження. Закривають усю запірну арматуру подачі пари в апарат. Далі у сорочку подають холодну воду. Процес здійснюють до досягнення температури 30-40 °С.

ДР 1.4 Підготовка персоналу

Проводиться навчання персоналу, та санітарно-гігієнічна підготовка у вигляді навчання правил застосування засобів для миття рук, миття обладнання, приміщень, тощо.

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Забирання повітря передбачається в найменш забрудненій зоні. Свіже повітря всмоктується вентилятором через ґрати у фасаді (ПЗ-1).

ДР 2.2. Грубе очищення повітря

Повітря потрапляє на фільтр грубої очистки. Від повітря відділяється основна маса пилу розміром 3-5 мкм. Для очищення застосовуються рулонні коміркові фільтри з промасляною сіткою (Ф-2). Ефективність очищення повітря становить більше 90 %.

ДР 2.3. Компресування повітря

На цій стадії використовуються турбокомпресори, в яких стиснення повітря здійснюється за допомогою відцентрової сили. Стиснення повітря супроводжується його нагріванням до 90-100 °С (К-3). Тому після цього повітря поступає в кондиціонер для регуляції термодинамічних показників повітря.

ДР 2.4. Регуляція термодинамічних показників повітря

Повітря надходить у кондиціонер (Т-4), де охолоджується до кімнатної температури. З повітря конденсується волога. Одеражне повітря надходить на систему фільтрації, що складається із фільтрів тонкої та надтонкої очистки.

ДР 2.5. Тонке очищення повітря

Тонке очищення повітря здійснюється фільтрами комірковими складчастими (Ф-5). Ефективність очистки повітря цими фільтрами становить більше 95 %. Заміну фільтра тонкого очищення проводять по мірі його забруднення.

ДР 2.6. Надефективне очищення повітря

На цій стадії застосовують НЕРА-фільтри (Ф-6), які використовуються для видалення з повітря частинок розміром 0,3 мкм. Ефективність очищення повітря такими фільтрами становить більше 99%.

ДР 3. Приготування води очищеної

ДР 3.1. Механічна фільтрація

Очищення водопровідної води від механічних домішок здійснюється на піщаних фільтрах (Ф-7), які забезпечують видалення більш крупних часточок розміром 5 мкм.

ДР 3.2. Глибинна фільтрація

На даній стадії відбувається очищення питної води від механічних домішок розміром 1-3 мкм. Даний процес здійснюється на вугільних фільтрах (Ф-8), які працюють паралельно або взаємозамінно.

ДР 3.3. Пом'якшення води

Пом'якшення води здійснюється методом осадження. Відбувається переведенні іонів кальцію і магнію в малорозчинні з'єднання шляхом додавання до води розчинів розрахованих кількостей гідрату окису кальцію, їдкою натрію,

кристалічного карбонату натрію (З-9). Після декількох годин взаємодії сполук, що утворюють накип з вказаними реактивами утворюються осадки, що потім видаляються відстоюванням або фільтруванням (Ф-11). Для фільтрування можливе використання піщаних фільтрів.

ДР 3.4. Зворотній осмос

Після чого, отриману воду пропускають через напівпроникну мембрану під дією зовнішнього тиску. Надлишковий робочий тиск сольового розчину набагато більший осмотичного. Установа зворотного осмосу, як правило, складається з насоса високого тиску, пермеатора (мембранної установки) і блоку регулювання, який підтримує оптимальний робочий режим (УФ-12). На оптимальних установках вихід пермеату складає близько 75 % від вихідної води, утворений концентрат складає 25 %. Установки зворотного осмосу з виходом пермеату 50 % і менше є неекономічними.

ДР 3.5. Зберігання води очищеної

З установки, отримання води очищеної (УФ-12), вода очищена поступає в ємкість (З-13), де зберігається при температурі $58 \pm 3^\circ\text{C}$. З ємкості вода очищена розподіляється за допомогою насоса (Н-14).

ДР 4. Підготовка ампул

ДР 4.1. Миття ампул

Одержані зі складу ампули попередньо візуально проглядають. У процесі переглядання відбраковують неліквідні ампули. Ампули, що залишились, завантажують у лоток попередньо підготовленої до роботи автоматичної лінії для підготовки ампул (А-15).

Шнек машини безперервно забирає із лотка ампули і передає їх на горизонтальний барабан з чарунками. Ампули окунають у теплову водяну ванну з ультразвуковим пристроєм, де омивається зовнішня та внутрішня поверхня ампул водою з температурою $60 \pm 5^\circ\text{C}$.

Після чого, ампули передають на миючу систему, де в них через голки вприскується 3 рази вода очищена, відфільтрована на вмонтованому фільтрувальному пристрої.

Вимиті ампули подаються у випускний бункер миючої машини, звідки поступають в тунель для сушіння і стерилізації.

ДР 4.2. Сушка і стерилізація ампул

Вимиті ампули поступають в сушильно-стерилізаційний тунель, де сушаться і стерилізуються при температурі 320 °С протягом 30 хвилин. На виході ампули охолоджуються до температури 20-25 °С повітрям. Чисті сухі ампули із тунелю поступають на стрічку машини для наповнення і запайки ампул.

7.2.2. Опис основних стадій процесу виробництва вакцини

ТП 5. Наповнення та запайка ампул

Насоси, що дозують, і голки наповнення промивають у розібраному вигляді водою для ін'єкцій, вкладають у медичний стерилізатор і стерилізують в автоклаві при температурі 120 °С та тиску 0,11 МПа протягом 45 хвилин.

Простерилізовані насоси, що дозують, збирають, встановлюють у наповнювально-дозуючій машині (А-15), підключаючи стерильними силіконовими шлангами. Збірник розчину (специфікація до біосинтезу: 3-16) з'єднують з всмоктувальними силіконовими шлангами, відкривають вентиль від збірника розчину, включають машину в роботу.

Чисті, сухі ампули надходять до восьми точок продування азотом, потім – до п'яти точок наповнення розчином, до п'яти точок наповнення азотом і до п'яти точок запайки ампул. Розчин вакцини подається до вище зазначених п'яти точок наповнення розчином наповнювально-дозуючої машини.

Після наповнення ампули запаюються в потоці азоту. Інтенсивність полум'я регулюють вентилями подачі газу і кисню. Під час процесу перевіряють якість запайки. У процесі запайки здійснюють контроль за тиском природного газу (0,01-0,07 МПа), кисню (0,01-0,07 МПа) та азоту не більше (0,3 МПа).

Наповнені і запаяні ампули збирають у касети і разом з відповідною ідентифікаційною карткою передають на стерилізацію.

ТП 6. Стерилізація та перевірка ампул з розчином на герметичність і контроль на механічні включення

ТП 6.1. Стерилізація ампул з розчином

Касети з заповненими та запаяними ампулами завантажують на візку в стерилізатор (С-16). Ампули стерилізують при температурі $110 \pm 0,5$ °С протягом 60 хвилин. Після завершення програми стерилізації включається програма перевірки ампул на герметичність.

У стерилізаційній камері утворюється вакуум в межах 0,053-0,04 МПа. У камеру дозувальним пристроєм подається концентрат метиленового синього, що входить в комплект стерилізатору. Концентрат в стерилізаційну камеру завантажується із розрахунку концентрації розчину метиленового синього 0,005 %. Завантаженням води очищеної від насосу (Н-14) стерилізаційна камера заповнюється по верхньому рівню. Після витримки протягом 3-5 хвилин відпрацьований 0,005 % розчин метиленового синього самопливом зливається в каналізацію.

Потім для миття ампул в стерилізатор подається вода очищена із збірника (З-13). Після миття ампул вода зливається у каналізацію.

Після перевірки герметичності ампул відбирають пробу для визначення рН розчину, вмісту кальцію глюконату, стерильності препарату, токсичності, пірогенності. На час проведення аналізу препарат зберігають на карантинному складі або в зоні карантину в умовах відповідних до вимог АНД. Касети з ампулами разом з відповідною ідентифікаційною карткою направляють на *ТП 6.2* для контролю на механічні вклучення.

ТП 6.2. Контроль на механічні вклучення

Контроль здійснюють на контрольних столах С-17 за методикою, що наведено в АНД. Ампули, що пройшли контроль, збирають у лотки з відповідною ідентифікаційною карткою і направляють на стадію на *ПМВ 7*.

ПМВ 7. Маркування та пакування

ПМВ 7.1. Маркування ампул

Ампули з лотків вручну завантажують в бункер машини Е-18. При проходженні стрічки з етикетками через друкарський пристрій на етикетку наноситься номер серії та термін придатності. Машина автоматично проводить маркування ампул, а також пакує їх у пластикові лотки.

ПМВ 7.2. Пакування ампул в пачку

Підготовка та робота автомату для виготовлення та наповнення картонних пачок ПМ-19 проводиться відповідно до інструкції з експлуатації.

В приймальні пристрої вкладаються пачки та листки-вкладиші. Установлюють набір цифр, які складають номер серії та термін придатності в механізмі друку автомату. Обов'язково кладеться ніж для розкриття ампул або скарифікат ампульний. Пачки заповненні ампулами транспортером передаються до машини для пакування пачок у ящики.

ПМВ 7.3. Пакування пачок з ампулами в групову упаковку

На установку (ГП-20) поміщають пустий ящик і вмикають її. Заповнений пачками ящик з транспортеру переносять на пакувальний стіл. Заклеюють ящик клейовою стрічкою та прикріплюють групову етикетку. Вручну штампом наносять номер серії та термін придатності.

При отриманні позитивних результатів вимогам АНД та відповідності всіх результатів аналізу досьє серії, оформляється сертифікат якості та дозвіл на реалізацію. Після цього вся серія продукції ідентифікується зеленими картками «Дозволено до реалізації». Передають готову продукцію на склад тимчасового зберігання до відправки споживачу.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження рідких відходів

Розчини мийно-дезінфікувальних засобів утилізують.

ЗВ 8.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи направляють в загальноцеховий збірник-контейнер для горючих відходів з наступним направленням на загальнозаводську установку термічного знешкодження відходів виробництва.

Відпрацьовані фільтри направляють в загальноцеховий збірник-контейнер з наступним направленням на полігон.

Відбраковані ампули збирають і передають в загальноцеховий збірник-контейнер для склобою з наступним направленням в організації «Вторсировини» для переробки.

7.3. Контроль ділянки виробництва ЛЗ

Карта постадійного контролю представлена в таблиці 7.2

Таблиця 7.2

Карта постадійного контролю

Контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Метод контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проби	Характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кх 1.1.1. Приготування мийного розчину Meratem	Meratem, концентрація	Хімічний метод	Після повного перемішування	C=0,1%
Кх 1.1.2. Приготування дезінфікуючого розчину Дезмарк	Дезмарк, концентрація	Хімічний метод	Після повного перемішування	C=0,1%
Кт 1.2.1. Щоденне прибирання	Прибирання, пил, бруд	Візуальний	Після прибирання	Відсутність пилу та бруду
Кт 1.2.2. Генеральне прибирання	Прибирання, пил, бруд, мікробіологічний показник	Візуальний, мікробіологічний метод	Після прибирання	Відсутність пилу та бруду, КУО/см ³ ≤ 1000
Кт 1.3.1. Миття та обполіскування обладнання	Температура, час	Термометр, годинник	Під час миття	τ=60 хв, t= 55 °С
Кт 1.3.3 Перевірка обладнання на герметичність	Час, тиск	Годинник, манометр	Під час перевірки	τ=30-60 хв, P= 0,1 – 0,2 МПа
Кт 1.3.4. Стерилізація обладнання	Температура, час, тиск	Термометр, годинник, манометр	Під час стерилізації	t= 130-135 °С τ=1,5 год, P= 0,15 МПа
Кт 2.2. Грубе очищення повітря	Ефективність очистки	Відбір проб	Постійно	E=65 %
Кт 2.3. Компресування повітря	Температура нагрівання повітря	Термометр	Постійно	t=90 – 100 °С
Кт 2.4. Регуляція термодинамічних показників повітря	Температура охолодження повітря	Термометр	Постійно	t=28 °С

Продовження табл.7.2

1	2	3	4	5
Кт 2.5. Тонке очищення повітря	Ефективність очистки	Відбір проб	Постійно	E>95 %
Кт 2.6. Надефективне очищення повітря	Ефективність очистки	Відбір проб	Постійно	E>99 %
Кт 3.1 Механічна фільтрація	Наявність механічних домішок	Фільтрування на піщаних фільтрах	Постійно	Відсутність механічних домішок розміром 5 мкм
Кт 3.2. Глибинна фільтрація	Наявність механічних домішок	Фільтрування на вугільних фільтрах	Постійно	Відсутність механічних домішок розміром 1-2 мкм
Кт 3.3. Пом'якшення води	Наявність іонів кальцію і магнію	Переведення в розчинні сполуки	Постійно	Відсутність іонів кальцію і магнію
Кт 3.4. Зворотній осмос	Наявність мікроорганізмів, розчинених солей	Фільтр	Постійно	Відсутність мікроорганізмів і розчинених солей
Кт 3.5. Зберігання води очищеної	Температура води	Термометр	Постійно	t=58±3 °C
Кт 4.1. Миття ампул	Температура води для ін'єкцій при промивці ампул	Термометр	Кожну операцію	t=60-70 °C
Кт 4.2. Сушка і стерилізація ампул	Температура стерилізації ампул Тривалість стерилізації ампул	Термометр, годинник	Кожну операцію	t=320 °C τ=30 хвилин
Кт 5.1. Наповнення та запайка ампул	Контроль за подачею і тиском природного газу, кисню і азоту	Манометр	Під час процесу	P ₁ =0,01-0,07 МПа, P ₂ = 0,05-0,3 МПа.

Закінчення табл.7.2.

1	2	3	4	5
Кт 6.1.1. Стерилізація ампул з розчином та перевірка їх на герметичність	Температура стерилізації ампул з розчином, тривалість процесу, вакуум	Термометр, годинник, манометр	Кожну операцію	$t=109-112\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau=30$ хвилин $P=0,053-0,04$ МПа
Кт 6.2.1. Контроль на механічні включення	Чистота розчину	За АНД	Кожну серію	Не більше 2 % ампул з механічними включеннями.
Кт 7.1.1. Маркування ампул	Текст на етикетці	Візуально	Кожну серію	Відповідність тексту на оригінал-макеті згідно АНД тексту на етикетці
Кт 7.2.1 Пакування ампул в пачки	Набір цифр, що складають номер серії та термін придатності, текст напису на пачці	Візуально	Кожну серію	Вірність набору цифр, що складають номер серії та термін придатності
Кт 7.3.1. Пакування пачок і ампулами в групову упаковку	Текст напису на груповій етикетці.	Візуально	Кожну серію	Відповідність тексту на оригінал-макеті згідно АНД тексту на груповій етикетці

ВИСНОВОК

Вірус-подібні частинки широко використовуються при доставці ліків, генній терапії та розробці вакцин. Як імуноген, вони підходять за розмірами і мають морфологічну структуру подібну до природних вірусів, і тому можуть викликати сильну імунну відповідь. Як наноносій, ВПЧ не тільки відображають сторонні антигени, але також можуть бути модифіковані для експресії химер генів за допомогою хімічної або генетичної технології синтезу, що забезпечує створення перехресного нейтралізаційного захисту від різних вірусних штамів. Цільова доставка маломолекулярних ліків та нуклеїнових кислот через ВПЧ покращується біодоступність доставлених речовин. Хоча десятки ВПЧ були успішно підготовлені та використані на лабораторному етапі, існує ще багато проблем, які слід вирішити при розробці ефективної вакцини та носіїв. Залишається визначити: як поліпшити експресію ВПЧ для забезпечення масштабного виробничого процесу, як ефективно відбирати ВПЧ та як зменшити імунна відповідь, спричинену ВПЧ, коли ті використовуються як транспортний засіб. Постійний прогрес у розробці вакцин на основі ВПЧ надасть нові можливості для лікування численних вірусних інфекцій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Макарова О. Є., Пенчук Ю. М., Гергель М. В. Сучасний стан розробки та застосування вакцин. 2011.
2. Чернишова Л. І., Лапій Ф. І. Сучасні технології виготовлення вакцин. *Новости медицины и фармации*. 2015, (6): 30-32.
3. Mazalovska M., Kouokam J. C. Progress in the Production of Virus-Like Particles for Vaccination against Hepatitis E Virus. *Viruses*. 2020, 12(8): 826. doi:10.3390/v12080826
4. Соломевич, Д. О., & Шарун, О. В. Здоров'я населення та його перспективи. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Вища освіта в медсестринстві: проблеми і перспективи» (Житомир, 25-26 жовтня 2018 р). С. 366-368.
5. Михайлов М. И., Малинникова Е. Ю., Кюрегян К. К., Поляков А. Д. Гепатит Е—актуальные проблемы изучения (2016–2018). *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение*. 2019, 8(1(28)): 74-83. doi: 10.24411/2305-3496-2019-11010
6. Lua L. H. L., Connors N. K., Sainsbury F., Chuan Y. P., Wibowo N., Middelberg A. P. J.. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 111(3): 425–440. doi: 10.1002/bit.25159 .
7. Abdoli Asghar et al. Human Papillomavirus Type16- L1 VLP Production in Insect Cells. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2013, 16(8): 891-895.
8. Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Martínez M, Blanco J, Gòdia F, Segura MM. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *J Biotechnol*. 2013, 166:152–65, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.05.001
9. Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: successes and challenges. *Protein Expr Purif*. 2013, 90: 104–116. doi: http: 10.1016/j.pep.2013.05.00.
10. Hu G, Wang N, Yu W, Wang Z, Zou Y, Zhang Y, et al. Generation and immunogenicity of porcine circovirus type 2 chimeric virus-like particles displaying

porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 epitope B. *Vaccine*. 2016, 34:1896–1903. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.047.

11. Yan D, Wei YQ, Guo HC, Sun SQ. The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015, 99: 10415–32. doi: 10.1007/s00253-015-7000-8 .

12. Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2010, 9: 1149–1176, doi: 10.1586/erv.10.115

13. Mariz F. C., Coimbra E. C., Jesus A. L. S., Nascimento L. M., Torres F. A. G., Freitas A. C. Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16 L1 Capsid Protein Using the *Pichia pastoris* PGK1 Promoter. *BioMed Research International*. 2015: 1–11. doi: 10.1155/2015/594120

14. 9. Debbink K., Costantini V., Swanstrom J., Agnihothram S., Vinjé J., Baric R., Lindesmith L.. Human Norovirus Detection and Production, Quantification, and Storage of Virus-Like Particles. *Current Protocols in Microbiology*. 2013: 15K.1.1–15K.1.45. doi: 10.1002/9780471729259.mc15k01s31

15. Saraswat S., Athmaram T. N., Parida M., Agarwal A., Saha A., Dash P. K.. Expression and Characterization of Yeast Derived Chikungunya Virus Like Particles (CHIK-VLPs) and Its Evaluation as a Potential Vaccine Candidate. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016, 10(7): e0004782. doi: 10.1371/journal.pntd.0004782

16. Luna J., Plata M., Gonzalez M., Correa A., Maldonado I., Nossa C., et al. Long-Term Follow-up Observation of the Safety, Immunogenicity, and Effectiveness of Gardasil™ in Adult Women. *PLoS ONE*. 2013, 8(12): e83431. doi: 10.1371/journal.pone.0083431

17. Felberbaum R. S. The baculovirus expression vector system: a commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol J*. 2015, 10: 702–714. doi: 10.1002/biot.201400438

18. Metz S.W., Gardner J., Geertsema C., Le T.T., Goh L., Vlak J.M., et al. Effective chikungunya virus-like particle vaccine produced in insect cells. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013, 7. doi: 10.1371/journal.pntd.0002124.

19. Poteet E., Lewis P., Li F., Zhang S., Gu J., Chen C., et al. A Novel Prime and Boost Regimen of HIV Virus-Like Particles with TLR4 Adjuvant MPLA Induces Th1 Oriented Immune Responses against HIV. *PLOS ONE*. 2015, 10(8). doi: 10.1371/journal.pone.0136862
20. Yang L, Song Y, Li X, Huang X, Liu J, Ding H, et al. HIV-1 virus-like particles produced by stably transfected drosophila S2Cells: a desirable vaccine component. *J Virol*. 2012, 86:7662–7676, doi: 10.1128/JVI.07164-11
21. Quan F.-S., Lee Y.-T., Kim K.-H., Kim M.-C., Kang S.-M.. Progress in developing virus-like particle influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2016, 15(10): 1281–1293. doi: 10.1080/14760584.2016.1175942
22. Shen X., Hacker D.L., Baldi L., Wurm F.M. Virus-free transient protein production in Sf9 cells. *J Biotechnol*. 2013, 171: 61–70. doi: 10.1109/BIBM.2013.6732461
23. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnol Adv*. 2012, 30: 1158–1170, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.022
24. O’Flaherty R., Bergin A., Flampouri E., Mota L. M., Obaidi I., Quigley A., et al. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances*. 2020: 107552. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107552
25. Kim J. Y., Kim Y.-G., Lee G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 93(3): 917–930. doi: 10.1007/s00253-011-3758-5
26. Li C., Liu F., Liang M., Zhang Q., Wang X., Wang T., et al. Hantavirus-like particles generated in CHO cells induce specific immune responses in C57BL/6 mice. *Vaccine*. 2010, 28: 4294–4300. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.04.025
27. Fontana D., Kratje R., Etcheverrigaray M., Prieto C. Immunogenic virus-like particles continuously expressed in mammalian cells as a veterinary rabies vaccine candidate. *Vaccine*. 2015; 33: 4238–4246, doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.088

28. Thompson C.M., Petiot E., Lennaertz A., Henry O., Kamen A. Analytical technologies for influenza virus-like particle candidate vaccines: challenges and emerging approaches. *Virol J.* 2013, 10: 141. doi: 10.1186/1743-422X-10-141
29. Gutiérrez-Granados S., Cervera L., Segura M. de las M., Wölfel J., Gòdia F. Optimized production of HIV-1 virus-like particles by transient transfection in CAP-T cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016, 00:3935–3947. doi: 10.1007/s00253-015-7213-x
30. Carlsson, Magnus. Production of human heme-binding proteins in plants for potential pharmaceutical and nutritional uses. Diss. (sammanfattning/summary) Sveriges lantbruksuniv. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.* 2020, 1652-6880: 34.
31. Latif S., Gottschamel J., Syed T., Younus I., Gull K., Sameeullah M., Batool N., Lössl A.G., Mariz F., Müller M., Mirza B., Waheed M.T.. Inducible expression of human papillomavirus-16 L1 capsomeres in the plastomes of *Nicotiana tabacum*: Transplastomic plants develop normal flowers and pollen. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2021: 1–16. doi: 10.1002/bab.2136
32. D’Aoust M.A., Couture M.M.J., Charland N., Trépanier S., Landry N., Ors F., et al. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J.* 2010, 8: 607–619. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x.
33. Pastor A. R., González-Domínguez G., Díaz-Salinas M. A., Ramírez O. T., Palomares L. A. Defining the multiplicity and time of infection for the production of Zaire Ebola virus-like particles in the insect cell-baculovirus expression system. *Vaccine.* 2019, 37(47): 6962-6969. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.06.029
34. Cervera L., Gutiérrez-Granados S., Berrow N.S., Segura M.M., Gòdia F. Extended gene expression by medium exchange and repeated transient transfection for recombinant protein production enhancement. *Biotechnol Bioeng.* 2015, 112: 934–946. doi: 10.1002/bit.25503.
35. Eibl R., Kaiser S., Lombriser R., Eibl D. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010, 86: 41–49. doi: 10.1007/s00253-009-2422-9.

36. Chroboczek J., Szurgot I., Szolajska E. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim. Pol.* 2014, 61: 531–539. doi: 10.18388/abp.2014_1875
37. Karayiannis P. Hepatitis B virus: Virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatol. Int* 2017; 500–508. doi: 10.1007/s12072-017-9829-7
38. Splawn L.M., Bailey C.A., Medina J.P. Heplisav-B vaccination for the prevention of hepatitis B virus infection in adults in the United States. *Drugs Today*. 2018, 54: 399–405. doi: 10.1358/dot.2018.54.7.2833984
39. Chathuranga L. S., Noordeen F., Abeykoon A. M. S. B. Immune response to hepatitis B vaccine in a group of health care workers in Sri Lanka. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013, 17(11): e1078–e1079. doi: 10.1016/j.ijid.2013.04.009
40. Savoy M. What's New in Vaccine Science. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2020. doi: 10.1016/j.pop.2020.05.006
41. Zhao Q., Towne V., Brown M., Wang Y., Abraham D., Oswald C. B., et al. In-depth process understanding of RECOMBIVAX HB® maturation and potential epitope improvements with redox treatment: Multifaceted biochemical and immunochemical characterization. *Vaccine*. 2011, 29(45): 7936–7941. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.070
42. Qawasmi M., Samuh M., Glebe D. Age-dependent decrease of anti-HBs titers and effect of booster doses using 2 different vaccines in Palestinian children vaccinated in early childhood. *Hum. Vaccines Immunother.* 2015, 11: 1717–1724. doi: 10.1080/21645515.2015.1041687
43. Jama N.J. A Two-Dose Hepatitis B Vaccine for Adults (Heplisav-B). *JAMA*. 2018, 319: 822–823.
44. Halperin S.A., Ward B., Cooper C. Comparison of safety and immunogenicity of two doses of investigational hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide and three doses of a licensed hepatitis B vaccine in healthy adults 18–55 years of age. *Vaccine*. 2012, 30: 2556–2563. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.087

45. Hoebe C. J. P. A., Vermeiren A. P. A., Dukers-Muijters N. H. T. M. Revaccination with Fendrix® or HBVaxPro® results in better response rates than does revaccination with three doses of Engerix-B® in previous non-responders. *Vaccine*. 30(48): 6734–6737. 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.08.074
46. Zhu Fengcai, Deckx Henri, Roten Raphaela, Michiels Bart, Sarnecki Michal. Comparative Efficacy, Safety and Immunogenicity of Hepavax-Gene TF and Engerix-B Recombinant Hepatitis B Vaccines in Neonates in China. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2017, 36: 94-101. doi: 10.1097/INF.0000000000001361
47. Tomljenovic L., Shaw C. A. Too Fast or Not Too Fast: The FDA's Approval of Merck's HPV Vaccine Gardasil. *The Journal of Law, Medicine & Ethics*. 2012, 40(3): 673–681. doi: 10.1111/j.1748-720X.2012.00698.x
48. Cox M. M. J. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*. 2012, 30(10): 1759–1766. 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.01.016
49. Iversen O.E. Miranda, M.J.; Ulied, A. Immunogenicity of the 9-Valent HPV Vaccine Using 2-Dose Regimens in Girls and Boys vs a 3-Dose Regimen in Women. *JAMA*. 2016, 316: 2411–2421.
50. Gu Y., Wei M., Wang D. Characterization of an Escherichia coli-derived human papillomavirus type 16 and 18 bivalent vaccine. *Vaccine*. 2017, 35: 4637–4645. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.06.084
51. Qiao Y.L., Wu T., Li R.C. Efficacy, safety, and immunogenicity of an Escherichia coli-produced bivalent human papillomavirus vaccine: An interim analysis of a randomized clinical trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 2020, 112: 145–153. doi: 10.1093/jnci/djz074
52. Wei M., Wang D., Li Z. N-terminal truncations on L1 proteins of human papillomaviruses promote their soluble expression in Escherichia coli and self-assembly in vitro. *Emerg. Microbes Infect.* 2018, 7: 160. doi: 10.1038/s41426-018-0158-2
53. Zhu F.C., Zhang J., Zhang X.F. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: A large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2010, 376: 895–902. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61030-6

54. Li S.-W., Zhao Q., Wu T., Chen S., Zhang J., Xia N.-S. The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2015, 11(4): 908–914. doi: 10.1080/21645515.2015.1008870
55. Cao Y.F., Tao H., Hu Y.M. A phase 1 randomized open-label clinical study to evaluate the safety and tolerability of a novel recombinant hepatitis E vaccine. *Vaccine*. 2017, 35: 5073–5080. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.072
56. Shinde V., Fries L., Wu Y. Improved Titers against Influenza Drift Variants with a Nanoparticle Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2018, 378: 2346–2348. doi: 10.1056/NEJMc1803554
57. Portno A.D., Patel N., Massare M.J. Influenza Hemagglutinin Nanoparticle Vaccine Elicits Broadly Neutralizing Antibodies against Structurally Distinct Domains of H3N2 HA. *Vaccines*. 2020, 8: 99. doi: 10.3390/vaccines8010099
58. Low J.G., Lee L.S., Ooi E.E. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine: Results from a double-blinded, randomized Phase I clinical trial in healthy Asian volunteers. *Vaccine*. 2014, 32: 5041–5048. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.011
59. Pillet S., Aubin E., Trepanier S. Humoral and cell-mediated immune responses to H5N1 plant-made virus-like particle vaccine are differentially impacted by alum and GLA-SE adjuvants in a Phase 2 clinical trial. *NPJ Vaccines*. 2018, 3: 3. doi: 10.1038/s41541-017-0043-3
60. von Seidlein L., Hanboonkunupakarn B., Jittamala P. Combining antimalarial drugs and vaccine for malaria elimination campaigns: A randomized safety and immunogenicity trial of RTS,S/AS01 administered with dihydroartemisinin, piperaquine, and primaquine in healthy Thai adult volunteers. *Hum. Vaccines Immunother.* 2020, 16: 33–41. doi: 10.1080/21645515.2019.1643675
61. Collins K.A., Snaith R., Cottingham M.G. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Sci. Rep.* 2017, 7: 46621. doi: 10.1038/srep46621

62. Blazevic V., Lappalainen S., Nurminen K. Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine*. 2011, 29: 8126–8133. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.026
63. Malm M., Heinimäki S., Vesikari T. Rotavirus capsid VP6 tubular and spherical nanostructures act as local adjuvants when co-delivered with norovirus VLPs. *Clin. Exp. Immunol.* 2017, 189: 331–341. doi: 10.1111/cei.12977
64. Groome M.J., Koen A., Fix A. Safety and immunogenicity of a parenteral P2-VP8-P subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in South Africa: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2017, 17: 843–853. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30242-6
65. Kushnir N., Streatfield S. J., Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*. 2012, 31(1): 58–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083
66. Leroux-Roels G., Cramer J.P., Mendelman P.M. Safety and Immunogenicity of Different Formulations of Norovirus Vaccine Candidate in Healthy Adults: A Randomized, Controlled, Double-Blind Clinical Trial. *J. Infect. Dis.* 2018, 217: 597–607. doi: 10.1093/infdis/jix572
67. Kim H.J., Son H.S., Lee S.W. Efficient expression of enterovirus 71 based on virus-like particles vaccine. *PLoS ONE*. 2019, 14: e0210477. doi: 10.1371/journal.pone.0210477
68. Zhang W., Dai W., Zhang C. A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity. *Emerg. Microbes Infect.* 2018, 7: 94. doi: 10.1038/s41426-018-0094-1
69. Zhang T.Y., Guo X.R., Wu Y.T., Kang X.-Z., Zheng Q.-B., Qi R.-Y., Chen B.-B., Lan Y., Wei M., Wang S.-J., et al. A unique B cell epitope-based particulate vaccine shows effective suppression of hepatitis B surface antigen in mice. 2019, 69: 343–354. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317725
70. Wei M., Wang D., Li Z. N-terminal truncations on L1 proteins of human papillomaviruses promote their soluble expression in *Escherichia coli* and self-assembly in vitro. *Emerg. Microbes Infect.* 2018, 7: 160. doi: 10.1038/s41426-018-0158-2

71. Mohsen M.O., Zha L., Cabral-Miranda G. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* 2017, 34: 123–132. 2017. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.014
72. Chabeda A., van Zyl A.R., Rybicki E.P. Substitution of Human Papillomavirus Type 16 L2 Neutralizing Epitopes Into L1 Surface Loops: The Effect on Virus-Like Particle Assembly and Immunogenicity. *Front. Plant Sci.* 2019, 10: 779. doi: 10.3389/fpls.2019.00779
73. Li Z., Wang D., Gu Y. Crystal Structures of Two Immune Complexes Identify Determinants for Viral Infectivity and Type-Specific Neutralization of Human Papillomavirus. *MBio.* 2017, 8.
74. Wu T., Li S.W., Zhang J. Hepatitis E vaccine development: A 14 year odyssey. *Hum. Vaccines Immunother.* 2012, 8: 823–827. doi: 10.4161/hv.20042
75. Cai W., Tang Z.M., Wen G.P. A high-throughput neutralizing assay for antibodies and sera against hepatitis E virus. *Sci. Rep.* 2016, 6: 25141. doi: <https://doi.org/10.1038/srep25141>
76. Li S.W., Zhao Q., Wu T. The development of a recombinant hepatitis E vaccine HEV 239. *Hum. Vaccines Immunother.* 2015, 11: 908–914. doi: <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1008870>
77. Tagliamonte M, Visciano ML, Tornesello ML, De Stradis A, Buonaguro FM, Buonaguro L. HIV-Gag VLPs presenting trimeric HIV-1 gp140 spikes constitutively expressed in stable double transfected insect cell line. *Vaccine.* 2011, 29: 4913–4922. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.004.
78. Herbst-Kralovetz M., Mason H.S., Chen Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2010, 9: 299–307. doi: <https://doi.org/10.1586/erv.09.163>
79. Morrison C. Landmark green light for Mosquirix malaria vaccine. *Nat Biotechnol.* 2015, 33:1015–1016. doi: 10.1038/nbt1015-1015.
80. Marsian J., Lomonossoff G.P. Molecular pharming-VLPs made in plants. *Curr Opin Biotechnol.* 2016, 37: 201–206. doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.007

81. Zhang N., Li C., Jiang S., Du L. Recent Advances in the Development of Virus-Like Particle-Based Flavivirus Vaccines. *Vaccines*. 2020, 8: 481. doi: 10.3390/vaccines8030481
82. Lukacs N.W., Malinczak C. A. Harnessing Cellular Immunity for Vaccination against Respiratory Viruses. *Vaccines*. 2020, 8: 783. doi: 10.3390/vaccines8040783
83. Thrane S., Aves K.L., Uddbäck I.E.M., Janitzek C.M., Han J., Yang Y.R., et al. A Vaccine Displaying a Trimeric Influenza-A HA Stem Protein on Capsid-Like Particles Elicits Potent and Long-Lasting Protection in Mice. *Vaccines*. 2020, 8: 389. doi: 10.3390/vaccines8030389
84. Gonelli C., King H., Mackenzie C., Sonza S., Center R., Purcell D. Immunogenicity of HIV-1-Based Virus-Like Particles with Increased Incorporation and Stability of Membrane-Bound Env. *Vaccines*. 2021, 9: 239. doi: 10.3390/vaccines9030239
85. Thomas S.J., Barrett A. Zika vaccine pre-clinical and clinical data review with perspectives on the future development. *Hum. Vaccines Immunother.* 2020, 16: 2524–2536. doi: 10.1080/21645515.2020.1730657
86. Hobson-Peters J., Harrison J.J., Watterson D., Hazlewood J.E., Vet L.J., Newton N.D., et al. A recombinant platform for flavivirus vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus. *Sci. Transl. Med.* 2019, 11: eaax7888. doi: 10.1126/scitranslmed.aax7888
87. Hazlewood J.E., Rawle D.J., Tang B., Yan K., Vet L.J., Nakayama E. et al. Zika Vaccine Generated Using the Chimeric Insect-Specific Binjari Virus Platform Protects against Fetal Brain Infection in Pregnant Mice. *Vaccines*. 2020, 8: 496. doi: 10.3390/vaccines8030496
88. Gonzalez-Dominguez I., Puente-Massaguer E., Cervera L., Godia F. Quality Assessment of Virus-Like Particles at Single Particle Level: A Comparative Study. *Viruses*. 2020, 12: 223. doi: 10.3390/v12020223
89. Balke I., Zeltins A. Recent Advances in the Use of Plant Virus-Like Particles as Vaccines. *Viruses*. 2020, 12: 270. doi: 10.3390/v12030270

90. Aves K.L., Goksoyr L., Sander A.F. Advantages and Prospects of Tag/Catcher Mediated Antigen Display on Capsid-Like Particle-Based Vaccines. *Viruses*. 2020, 12: 185. doi: 10.3390/v12020185
91. Perotti M., Perez L. Virus-Like Particles and Nanoparticles for Vaccine Development against Hcmv. *Viruses*. 2020, 12: 35. doi: doi.org/10.3390/v12010035
92. Імунізація. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/imunizaciya/zagalna-informaciya>
93. Hyman P., Trubl G., Abedon S. T. Virus-like particle: evolving meanings in different disciplines. *Therapy, Applications, and Research*. 2021, 2(1): 11-15. doi: 10.1089/phage.2020.0026
94. Roldão A., Mellado M. C. M., Castilho L. R., Carrondo M. J., Alves P. M. Virus-like particles in vaccine development. Expert review of vaccines. 2010, 9(10): 1149-1176. doi: 10.1586/ERV.10.115
95. Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Molecular biotechnology*. 2013, 53(1): 92-107. doi: 10.1007/s12033-012-9598-4
96. Мороз Л. В., Чічірельо-Константинович К. Д., Гаврилюк А. О. Клініко-морфологічні зміни печінки при вірусному гепатиті Е: досвід власного спостереження. *Гепатологія*. 2019, (1): 24-34.
97. Гепатит Е. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://h-clinic.ru/articles/gepatit-e/>
98. Саухат С. Р., Фомина Н. Г., Шемшура А. Б., Асмолова Н. Ю., Хоменко И. Ю., Хоменко О. И., и др. Серозеппидемиология и клинические случаи гепатита е в Ростовской области. *Инфекция и иммунитет*. 2012, 2(1-2): 457.
99. Гепатит Е. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
100. Малый В.П., Шепилева Н.В., Брядко Н.В., Тарасенко С.М. Вирусный гепатит Е в Украине. *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія*. 2015, 7(86): 5-8.

101. Hecolin. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://innovax.en.drugdu.com/product_314326.html
102. Безопасное обращение с вакцинами, холодовая цепь и иммунизация. Пособие для стран СНГ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/64776/www9801.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
103. Вакцина Регевак В. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.diavax.ru/vaccines/regevak-v/>
104. Вакцина Эувакс В. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pediatrya.ru/uslugi/privivki/gepatit-b/euvax>
105. Hepatitis E Vaccine: Composition, Safety, Immunogenicity and Efficacy A document prepared for Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE) by the Hepatitis E Vaccine Working Group. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2014/october/2_HepEvaccsafety_immunogenicity_efficacy_final_1Oct2014.pdf
106. Державна фармакопея України. Видання 1. Харків, 2001.
107. Медицинское стекло. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://astgmu.ru/wp-content/uploads/2020/04/Farm.tehnologiya_4-kurs_lectsiya_15.04.20.pdf
108. ГОСТ 7933-89. Картон для потребительской тары.
109. ГОСТ 17768-90. Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.
110. ГОСТ 14192-96. Маркировка грузов.
111. Стало известно, где самая грязная вода на Харьковщине. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kh.depo.ua/rus/kh/stalo-vidomo-denaybrudnisha-voda-na-kharkivshchini-202002071109493>
112. Чисельність населення (за оцінкою) на 1 травня 2021 року та середня чисельність у січні–квітні 2021 року. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://kh.ukrstat.gov.ua/index.php/chyselnist-naselennia-shchomisiachna-informatsiia>

113. Wu X., Chen P., Lin H., Hao X., Liang Z. Hepatitis E virus: current epidemiology and vaccine. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2016, 12(10): 2603-2610. doi: 10.1080/21645515.2016.1184806
114. Park S. B. Hepatitis E vaccine debuts. *Nature News*. 2012, 491(7422): 21.
115. rHEV. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://likarni.com/clinic/medicinskij-centr-eurolab/price>
116. Julin C. H., Hjortaas K., Dembinski J. L., Sandbu S., Øverbø J., Stene-Johansen K., Dudman S. Hepatitis E in Pregnant Women and the Potential Use of HEV Vaccine to Prevent Maternal Infection and Mortality. *Current Tropical Medicine Reports*. 2019, 6(4): 197-204. doi: 10.1007/s40475-019-00193-y
117. В Китае выпущена первая в мире вакцина против гепатита E. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.bbc.com/russian/rolling_news/2012/10/121027_rm_china_drug_hepatitis
118. Qian C., Liu X., Xu Q., Wang Z., Chen J., Li T., et al. Recent progress on the versatility of virus-like particles. *Vaccines*. 2020, 8(1): 139. doi: 10.3390/vaccines8010139
119. Li T., Lin H., Zhang Y., Li M., Wang D., Che Y., et al. Improved characteristics and protective efficacy in an animal model of *E. coli*-derived recombinant double-layered rotavirus virus-like particles. *Vaccine*. 2014, 32(17): 1921-1931. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.093
120. Farshadpour F., Taherkhani R., Makvandi M., Memari H. R., Samarbafzadeh A. R. Codon-optimized expression and purification of truncated ORF2 protein of hepatitis E virus in *Escherichia coli*. *Jundishapur journal of microbiology*. 2014, 7(7): e11261. doi: 10.5812/jjm.11261
121. Khateri M., Abdoli A., Motevalli F., Fotouhi F., Bolhassani A., Arashkia A., et al. Evaluation of autophagy induction on HEV 239 vaccine immune response in a mouse model. *IUBMB life*. 2018, 70(3): 207-214. doi: 10.1002/iub.1719
122. Pan J. S., Zhang K., Zhou J., Wu C., Zhuang H., Zhou Y. H. Application of truncated immunodominant polypeptide from hepatitis E virus (HEV) ORF2 in an

assay to exclude nonspecific binding in detecting anti-HEV immunoglobulin M. *Journal of clinical microbiology*. 2010, 48(3): 779-784. doi: 10.1128/JCM.01671-09

123. Arevalo M. T., Wong T. M., Ross T. M. Expression and purification of virus-like particles for vaccination. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2016, (112): e54041. doi:10.3791/54041.

124. Khateri M., Abdoli A., Motevalli F., Fotouhi F., Bolhassani A., Arashkia A., et al. Evaluation of autophagy induction on HEV 239 vaccine immune response in a mouse model. *IUBMB life*. 2018, 70(3): 207-214. doi: 10.1002/iub.1719

125. Farshadpour F., Taherkhani R., Makvandi M., Memari H. R., Samarbafzadeh A. R. Codon-optimized expression and purification of truncated ORF2 protein of hepatitis E virus in *Escherichia coli*. *Jundishapur journal of microbiology*. 2014, 7(7): e11261. doi: 10.5812/jjm.11261

126. Taherkhani R., Makvandi M., Farshadpour F. Development of enzyme-linked immunosorbent assays using 2 truncated ORF2 proteins for detection of IgG antibodies against hepatitis E virus. *Annals of laboratory medicine*. 2014, 34(2): 118-126. doi: 10.3343/alm.2014.34.2.118

127. Черепанський В. В., Грегірчак Н. М. Особливості технологічного процесу виробництва пробіотичного препарату на основі лактобацил. 2020, 26(3): 45-59

128. Lysis. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.hielscher.com/ru/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm>

129. Ультразвуковою лизис *E. coli*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.hielscher.com/ru/ultrasonic-lysis-of-e-coli.htm>

130. Біохімія. Опорні лекції. Статична біохімія для спеціальності „Виробництво хліба, кондитерських, макаронних виробів та харчових концентратів” / Циклова комісія природничо-наукових дисциплін. – Миколаїв : ФКЕХТ, 2010. – с. 6.

131. Huynh N. H. A statistical methodology to optimise soluble production of virus-like particle protein by fermentation of *Escherichia coli*: Doctoral dissertation. Adelaide, 2021. 25-101 p.

132. Boigard H., Cimica V., Galarza J. M. Dengue-2 virus-like particle (VLP) based vaccine elicits the highest titers of neutralizing antibodies when produced at reduced temperature. *Vaccine*. 2018, 36(50): 7728-7736. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.10.072

133. Технологія ліків промислового виробництва: Підруч. для ТЗ8 студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III—IV рівнів акредитації /В. І.Чуєшов, Л. М.Хохлова, О. О. Ляпунова та ін.; За ред. В. І.Чуєшова —Х.:Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. — 720с.

134. СТП 01-06. Вода очищена в цеху по виробництву лікарських засобів

135. Щелочное средство Meratem для мытья рабочих зон, оборудования и поверхностей. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://rozetka.com.ua/maratem-8693239281344/p315922390/?gclid=Cj0KCQiAuP-OBhDqARIsAD4XHpeVcwxCwnIJHtR_Mfo_jsaxsVBMv-cexm7s7FPkp1nppNSQOCoxco4aAu3zEALw_wcB

136. Щелочное пенное моющее средство Calgonit CF 312. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mikronagro.com.ua/uk/product/luzhniy-pinniy-miyuchiy-zasib-calgonit-cf-312>

137. Кислотний пінний миючий засіб, концентрат PRIMA МК. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://svyrydova.com.ua/ua/p1183533647-kislotnij-pinnij-miyuchij.html?source=merchant_center

138. Дезінфікуючий засіб для поверхонь Дезмарк. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://limonad.com.ua/uk/dezmark-1000-ml-dez.sredstvo-kod-8952-uk.html>

139. Засіб дезінфікуючий для поверхонь DEZALDUM. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://aveal.com.ua/item_N3789.htm

140. Засіб дезінфікуючий для поверхонь ДЕЗО «Дезосепт». [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://rozetka.com.ua/207251221/p207251221/>

141. Класи й марки ампульного скла. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mybiblioteka.su/3-89979.html>