

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
(ім'я та прізвище)

(підпис)

«__» __ грудня 2025 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

(підпис)

«__» __ грудня 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми Промислова та фармацевтична
біотехнологія

на тему: Біотехнологія вірусної вакцини проти поліомієліту

Виконав: здобувачка 2 курсу, групи 1

КАМЕНСЬКА Марія Василівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник ЛИЧ Інна Валентинівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент

Семенець Р.О.

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Я як здобувачка Національного університету харчових технологій розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувачка _____
(підпис)

Київ – 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” жовтня 2025 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КАМЕНСЬКА Марина Василівна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологія вірусної вакцини проти поліомієліту
керівник роботи ЛИЧ Інна Валентинівна, к.б.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05.11.2025 року № 911-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 26.11.2025

3. Вихідні дані до роботи кінцевий продукт: вакцина проти поліомієліту, схема виділення та очищення субстанції, опис виробництва готового лікарського засобу

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Загальна характеристика живих вірусних вакцини. Розділ 2. Особливості створення атенуйованих вакцин. Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу. Розділ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів. Розділ 5. Специфікація обладнання отримання субстанції. Розділ 6. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції. Розділ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу. Розділ 8. Контроль виробництва. Розділ 9.

Проект заявки на корисну
модель

5. Перелік графічного матеріалу

Схема виділення та очищення субстанції вірусних часточок – апаратурна та технологічна схеми формату А 1 по 1 листу.

Схема виробництва вакцини проти поліомієліту - апаратурна та технологічна схеми формату А 1 по 1 листу.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 жовтня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Загальна характеристика живих вірусних вакцини.	01.10.2025 – 04.10.2025	
2	Розділ 2. Особливості створення атенуйованих вакцин.	05.10.2025- 10.10.2025	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу.	11.10.2025- 15.10.2025	
4	Розділ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів.	16.10.2025- 21.10.2025	
5	Розділ 5. Специфікація обладнання отримання субстанції.	22.10.2025- 27.10.2025	
6	Розділ 6. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції.	28.10.2025- 03.11.2025	
7	Розділ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу.	03.11.2025- 07.11.2025	
8	Розділ 8. Контроль виробництва .	08.11.2025- 11.11.2025	
9	Розділ 9. Проект заявки на корисну модель	12.11.2025- 17.11.2025	
10	Оформлення графічної частини	18.11.2025- 23.11.2025	
11	Оформлення пояснювальної записки	24.11.2025- 26.11.2025	

Здобувач _____
(підпис)

Марина КАМЕНЬСКА _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Інна ЛИЧ _____
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

This qualification thesis presents an analysis of literature data concerning the production of live viral vaccines for the prophylaxis of poliomyelitis.

The general characteristics of live viral vaccines are reviewed, specifically: peculiarities of live vaccine development, characteristics of the strains used for the production of live poliomyelitis vaccines, the creation of attenuated vaccines for poliomyelitis prevention.

Methods for obtaining attenuated vaccines using various techniques are discussed, including: stabilization of the 5'-UTR in the nOPV2 vaccine by altering the secondary structure of Domain V (G481A substitution, introduction of changes in the 2C gene to reduce recombination with other enteroviruses, introduction of mutations in the 3D gene and codon replacement in the capsid genes.

A techno-economic justification for live viral vaccines for poliomyelitis prophylaxis is provided, along with the technological specifics of vaccine production.

The selection of technological operations used for the isolation and purification of viral particles is justified. The selection of the main technological equipment is also outlined.

The qualification work describes the stages of the technological process for obtaining the attenuated virus for poliomyelitis prophylaxis and the final drug form. Control methods according to regulatory documents are also presented.

The qualification work consists of 94 pages of printed text, includes 7 tables, and cites 92 literature sources.

Keywords: Sabin strain, serotypes, poliomyelitis, cultivation, attenuation, ultracentrifugation, antigenicity, sterilizing filtration.

РЕФЕРАТ

В кваліфікаційній роботі здійснено аналіз літературних даних щодо одержання живих вірусних вакцин для профілактики поліомієліту. Розглянуто загальну характеристику живих вірусних вакцин, а саме особливості створення живих вакцин та характеристика штамів, що використовуються для виробництва живих вакцин проти поліомієліту, створення атенуйованих вакцин для профілактики поліомієліту. Розглянуті методи одержання атенуйованих вакцин різними методами: стабілізацією 5'-UTR у вакцині nOPV2 зміною вторинної структури домену V (заміна G481A), введенням змін у ген 2C для зниження рекомбінації з іншими ентеровірусами, введенням мутацій у ген 3D та заміною кодонів у капсидних генах.

Здійснено техніко-економічне обґрунтування щодо живих вірусних вакцин для профілактики поліомієліту та наведено технологічні особливості одержання вакцини.

Обґрунтовано вибір технологічних операцій, що використовуються для виділення та очищення вірусних часточок. Також здійснено вибір основного технологічного обладнання.

В кваліфікаційній роботі наведено опис стадій технологічного процесу одержання атенуйованого вірусу для профілактики поліомієліту та готової лікарської форми. Також наведено методи контролю згідно нормативних документів.

Кваліфікаційна робота складається з 94 сторінок друкованого тексту, містить дві 7 таблиць та 92 літературні джерела.

Ключові слова: штам Сейбін, серотипи, поліомієліт, культивування, атенуація, ультрацентрифугування, антигенність, стерилізуюча фільтрація.

ЗМІСТ

Вступ.....	6
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИВИХ ВІРУСНИХ ВАКЦИНИ.....	9
1.1. Особливості створення живих вакцин.....	9
1.2. Характеристика штамів, що використовуються для виробництва живих вакцин проти поліомієліту.....	14
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СТВОРЕННЯ АТЕНУЙОВАНИХ ВАКЦИН....	18
2.1. Стабілізація 5'-UTR у вакцині nOPV2 зміною вторинної структури домену V (заміна G481A).....	18
2.2. Введення змін у ген 2C для зниження рекомбінації з іншими ентеровірусами.....	22
2.3. Введення мутацій у ген 3D.....	25
2.4. Заміна кодонів у капсидних генах.....	27
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу.....	29
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу, галузей використання, потреби у ньому.....	29
3.2 Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу.....	31
3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції.....	33
3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині.....	37
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів.....	41
4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання біотехнологічного продукту.....	41
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання отримання субстанції.....	53
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення субстанції.....	55

РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу.....	58
7.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу та кількості серій на рік.....	58
7.2. Обґрунтування умов забезпечення виготовлення лікарського засобу.....	59
7.3. Специфікація обладнання.....	68
7.4. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу.....	69
РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва	74
8.1 Контроль субстанції	74
8.2. Опис лікарського засобу згідно АНД.....	78
РОЗДІЛ 9. Проект заявки на корисну модель.....	85
9.1. Галузь і застосування корисної моделі.....	85
9.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки.....	85
9.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення.....	88
9.4. Опис запропонованого способу.....	88
9.5. Формула корисної моделі.....	89
9.6. Реферат.....	90
Висновки.....	91
Список використаних джерел.....	92

ВСТУП

Вакцини проти вірусних захворювань включають цільновірусні вакцини та субодиничні вакцини. Цільновірусні вакцини містять живі вакцини та інактивовані вакцини, а субодиничні вакцини покладаються на субодиниці віріону, представлені білками, ДНК інформаційна РНК (мРНК), вірусні вектори, або антигенні клітини.

Живі вакцини — це ослаблені вакцини, за винятком живих неаттенуйованих вакцин. Живі вакцини, які зазвичай більш ефективні та менш дорогі, запобігають 13 вірусним захворюванням людини, набагато краще, ніж тим, для яких використовуються інактивовані або субодиничні вакцини. Вони є актуальними в розрізі ефективності та вартості, але вони потребують багато часу в розробці та небезпечні для людей з імунodefіцитом. Також слід зазначити, що вони мають ризик реверсії до активних патогенних форм.

Станом на 6 серпня 2020 року живих вакцин не було, але було шість інактивованих вакцин і 25 субодиничних вакцин (сім на основі білків, п'ять на основі ДНК, шість на основі мРНК, чотири на основі вірусних векторів і три на основі антигенних клітин) почали клінічні випробування на COVID-19. Також можна навести приклад, що у Сполучених Штатах Америки жива ослаблена пероральна поліовірусна вакцина більше недоступна, оскільки вона може мутувати до штаму, що викликає поліомієліт, приблизно в одного з кожних 2,4 мільйона людей, які отримують вакцину. Інактивована поліовірусна вакцина — єдина вакцина проти поліомієліту, яка використовується в Сполучених Штатах Америки з 2000 року [1].

Зараз генетична інженерія дозволяє створювати живі вірусні вакцини, які є потенційно безпечними. Деякі конструкції просто модифікують один вірусний геном, щоб покращити давній метод ослаблення, тоді як інші конструкції створюють химери вірусних геномів. Така модифікація має перевагу у підвищенні колективного імунітету вище рівня, досягнутого лише прямою вакцинацією, але

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Каменська М.В.			Вступ			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Лич І.В.								6	100
Реценз.								Кафедра БТМ			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									

також збільшує можливості для еволюції вакцини, що зазвичай знижує ефективність вакцини. Різні конструкції мають різні епідеміологічні наслідки, але також зазнають різної еволюції. Підходи, які поєднують розробку вакцин із розумінням еволюції та епідеміології, отримають найбільшу користь від передачі вакцини.

Ще одним аспектом, на який звертається увага є відношення ефективність/безпечність. Наприклад, безпека та ефективність вакцини проти паротиту є сумнівною, а перша ліцензована вакцина проти ротавірусу була відкликана, коли стало зрозуміло, що вона пов'язана з інвагінацією кишечника [2].

Деякі вакцини необхідно використовувати за певною схемою, щоб досягти максимального ефекту. Наприклад, у тропічних ділянках, де ризик зараження є впродовж року, жива атенуйована вакцина проти поліомієліту повинна вводитися великим групам людей, щоб зменшити кількість людей у групі ризику та перервати передачу вірусу. На відміну від цього, у помірному кліматі передача є сезонною. Таким чином, рутинної імунізації у певному віці достатньо, щоб зменшити кількість людей у групі ризику протягом періоду передачі до такого рівня, що вірус загине. Аналогічно, вакцина проти кору, яка використовується при масовій імунізації, контролює кір, зменшуючи кількість осіб в зоні ризику і, таким чином, розповсюдження вірусу.

Отже, ми можемо зазначити, що хоча живі атенуйовані вакцини проти вірусних захворювань людини були дуже ефективними, існує багато проблем і ускладнень, які вони викликають. Такі проблеми вирішуються сьогодні методами генетичної інженерії, молекулярної біології та іншими міжгалузевими напрямками.

Основою оральної вакцини проти поліомієліту є використання трьох серотипів поліовірусу, оскільки кожен із них викликає різні імунологічні реакції, і вакцина має забезпечувати захист проти всіх трьох. Процес виробництва включає кілька ключових етапів: культивування вірусу, атенуація (ослаблення), стабілізація, тестування та формуляція кінцевого продукту.

Актуальність роботи. Жива оральна вакцина проти поліомієліту має низку переваг, які зробили її незамінною в глобальних програмах імунізації. По-перше, вона стимулює як гуморальний, так і місцевий імунітет у кишечнику, що запобігає

передачі вірусу в популяції. По-друге, її оральне введення не вимагає спеціального обладнання чи підготовки медичного персоналу, що робить її ідеальною для використання в країнах із обмеженим доступом до медичних ресурсів. По-третє, оральна поліомієлітна вакцина має здатність до вторинної імунізації: вакцинний вірус може передаватися від вакцинованої людини до невакцинованих контактів, сприяючи формуванню колективного імунітету.

Новизна роботи. В роботі пропонується використовувати один з серотипів, як компонент вакцини, а саме PRV 7.3 [48], який за 7 год після інфікування клітинної лінії SH-SY5Y дозволив одержати $10^{8,9}$ /мл вірусних часточок, тобто 794328234 вірусних часток в 1 мл на відміну від інших серотипів (IPV та Mahoney), які показали нижчу продуктивність: $10^{8,3}$ /мл та $10^{5,9}$ /мл (199526231 та 794328 вірусних часток в 1 мл) відповідно [49, 50].

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИВИХ ВІРУСНИХ ВАКЦИНИ

1.1. Особливості створення живих вакцин

Багато вірусних вакцин, які зараз використовуються, і ще більше планується, використовують живі віруси. Коли вони вводяться в організм пацієнта, вони викликають пригнічену інфекцію, яка поширюється між клітинами хазяїна, причому інфекції достатньо, щоб викликати імунітет, але не викликати захворювання. Будучи живими, ці вакцини, в принципі, здатні передаватися новим хазяїнам, хоча, можливо, на значно меншому рівні порівняно з вірусами, здатними викликати захворювання.

Якісні наслідки передачі вакцини легко передбачити: підвищений колективний імунітет для даного рівня прямої вакцинації, випадкові реципієнти та можлива еволюція вакцини. Кількісні наслідки менш очевидні, але вони готові для вивчення. Мало уваги приділялося ризику реверсії вакцини, можливо тому, що рідко проводиться поствакцинальний нагляд, за винятком пероральної поліомієлітної вакцини. Чи передача дійсно є рідкісною для інших живих вакцин, чи просто залишилася непоміченою, незрозуміло – передача вакцини проти поліомієліту супроводжується еволюцією до високої вірулентності, створюючи проблеми, які привертають увагу до передачі.

Незалежно від здатності передачі сучасних вакцин, генетична інженерія розширила можливості для створення нових вакцин.

Розуміння наслідків передачі зараз є важливим питанням. Технологія генетичної інженерії прогресувала стрімко, створюючи багато нових трансмісивних дизайнів вакцин. Навпаки, розуміння епідеміологічних та еволюційних наслідків передачі перебуває в зародковому стані [3].

Живі аттенуйовані віруси забезпечили один із двох стовпів розробки вакцини, інший — інактивовані (вбиті) віруси. Рекомбінантні векторні вакцини, інша форма живих вакцин, здається, є третім стовпом, який швидко розвивається.

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Каменська М.В.			РОЗДІЛ 1 ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИВИХ ВІРУСНИХ ВАКЦИНИ		Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Лич І.В.						9	100
Реценз.				Кафедра БТМ					
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

Живі ослаблені вакцини є генетично «ослабленими» версіями дикого типу. Вони мають медичну перевагу над убитими вакцинами у створенні відповідної імунної відповіді, оскільки вони інфікують клітини, а отже, можуть викликати як гуморальний, так і клітинний захист. Вони також інфікують ті ж тканини, що й патогенний дикий тип [4].

Історично серйозним недоліком атенуйованих вакцин було те, що для їх створення використовувалися випадкові методи [1]. Вірус вирощували в неприродних умовах, можливо, за нових температур, нових господарів або нових клітин-господарів. Адаптація до нових умов погіршила здатність до росту вірусу в природному хазяїні, що призвело до зниження швидкості росту вірусу, що придушило інфекцію настільки, щоб уникнути захворювання. Кінцева точка адаптації була обрана методом проб і помилок, з незначним уявленням про властивості вакцини до перевірки на фактичному хазяїні. Таким чином, було неможливо свідомо генерувати різні вакцини-кандидати, що відрізняються ступенем аттенуації. Отже, діапазон ослаблення, сумісний з авірулентністю та імуногенністю, ніколи не був розроблений. Але той факт, що адекватний імунітет і авірулентність часто досягалися таким неточним методом, свідчить про те, що прийнятний діапазон рівнів ослаблення є широким, а дозу інокулята завжди можна регулювати, щоб компенсувати різні рівні ослаблення.

Генетична інженерія тепер забезпечує «регульоване» ослаблення, що дозволяє конструювати широкий діапазон проміжних продуктів у всьому спектрі від росту дикого типу до нульового росту, хоча залишається проблема знайти правильний баланс між ослабленням та імуногенністю. Три багатообіцяючі методи (які не дають химерних геномів різних вірусів) включають заміну синонімічного кодону, перебудову геному та введення нелетальних делецій [5].

Синонімічна заміна кодону

Мабуть, найцікавішим новим дизайном є створення багатьох синонімічних змін кодонів у кодуючих послідовностях вірусного білка [6]. У деяких випадках існуючі кодони для кожної амінокислоти просто обмінюються один з одним, створюючи нові пари кодонів, але не змінюючи номери кожного кодону. Білкові послідовності не змінені порівняно з диким типом, але експресія білка та

внутрішньоклітинний ріст знижені (через механізми, які не повністю вивчені, але, ймовірно, включають знижену трансляцію). Більше ослаблення досягається за допомогою більшої кількості змін синонімічних кодонів, що забезпечує дуже точне налаштування. Цей метод може бути застосований до частин або всього геному будь-якого вірусу. Цей тип ослаблення дуже повільний для відновлення високої активності [3].

Перебудова геному

Простий підхід полягає в тому, щоб змінити порядок генів у геномі, основний ефект, ймовірно, полягає в регуляції генів [7]. Вибірковість і контрольованість дії забезпечується різними перебудовами, але не заміною кодону. Експерименти з вірусом, вирощеним у культурі, свідчать про те, що перегрупування стабільні і що, здавалося б, постійне ослаблення можна досягти, незважаючи на постійне зростання вірусу. Цей метод може бути важко реалізувати в малих геномах і в тих, що експресуються як поліпротеїни [8].

Видалення ділянки, що відповідає за патогенез

Несуттєві гени або частини генів можуть бути видалені з геному, щоб зменшити швидкість росту вірусу [9]. Можливість налаштування забезпечується різними видаленнями. Експерименти з вірусом, вирощеним у культурі, свідчать про те, що ефект пристосування делецій можна принаймні частково відновити шляхом еволюції, а РНК-віруси з делеціями інколи еволюціонували для відновлення втрачених послідовностей [10].

Передача аттенуованих вакцин зазвичай не розглядалася при їх розробці – імуногенність і авірулентність були важливими проблемами і їх досить важко збалансувати без урахування третьої змінної. Прикладом може бути пероральна вакцина проти поліомієліту, хоча є окремі повідомлення про передачу через інші ослаблені вакцини; передача вакцин, призначених для дикої природи, добре задокументована в кількох випадках. Точну спрямованість дії, яку тепер забезпечує генетична інженерія, може нарешті дозволити навмисно створювати атенуовані вакцини, які є авірулентними та також передають. Крім того, якщо вірусний геном містить несуттєві гени, які впливають на вірулентність, делеції можуть досягти авірулентності, дозволяючи передачу [6].

Рекомбінантні векторні вакцини

Дещо новим дизайном вакцини є жива рекомбінантна векторна вакцина (РВВ), химера двох вірусних геномів [11]. Існує багато їх різновидів, і ми зосереджені на живих вакцинах, що самовідтворюються, у яких вектором є нешкідливий вірус, геном якого залишається майже недоторканим, за винятком вставок чужорідних генів. Його геном сконструйований для перенесення одного або кількох антигенних генів патогена (рис.1.1).

Ad-вектори (аденовіруси) є найефективнішими засобами доставки генів для перенесення чужорідних антигенів до клітин хазяїна. Порівняно з іншими системами доставки генів на основі вірусів, такими як лентівірус, ретровірус та AAV, вони є більш імуногенними та активують як вроджену, так і адаптивну імунну відповідь [12].

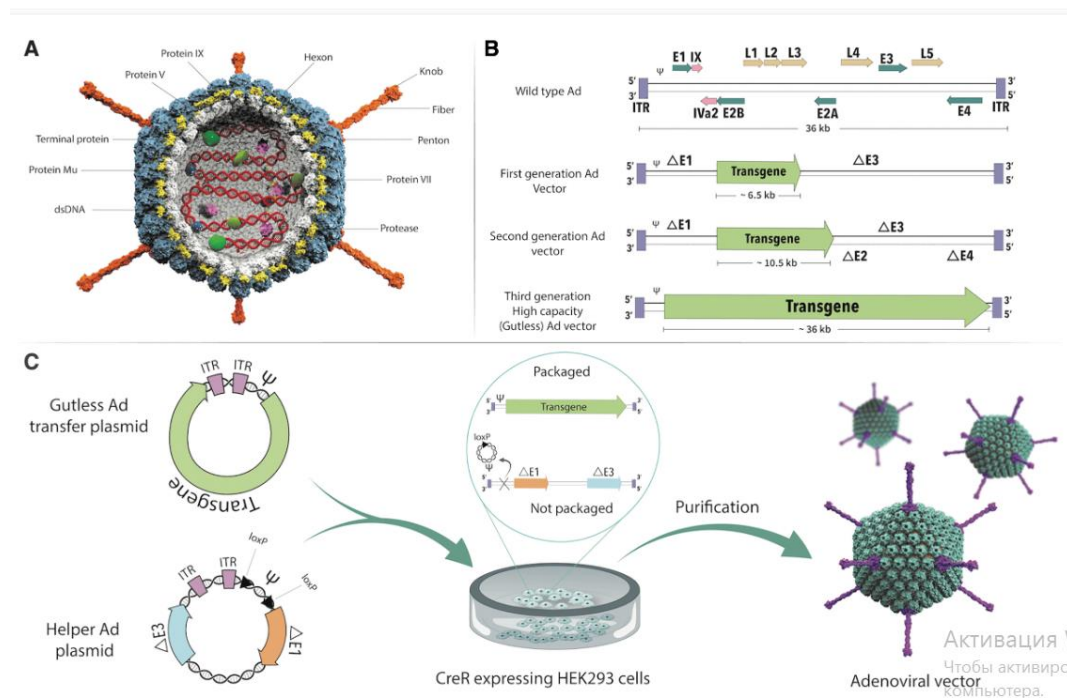


Рис. 1.1. Структура Ad та стратегія дизайну вектора

Мета полягає в тому, щоб викликати імунітет проти антигенів збудника, а вектор просто забезпечує засоби для ампліфікації цих антигенів у хазяїні. На відміну від аттенуйованої вакцини, «рекомбінантний вектор» цього типу є внутрішньо безпечним, оскільки він містить лише невелику частину геному збудника. Однак навіть імовірно доброякісні переносники можуть бути

патогенними для осіб з ослабленою імунною системою, тому РВВ може бути безпечним лише для деяких осіб. РВВ вже давно використовуються в дикій природі (наприклад, деякі вакцини проти сказу), деякі випробовуються на людях, а багато інших розглядаються [12].

Конструкція РВВ є універсальною. Для будь-якого набору генів патогенів вектор можна вибрати з багатьох кандидатів, щоб бути авірулентним; методи створення зниженої вірулентності при збереженні передачі не потрібні. Але оскільки лише один або кілька генів збудника впроваджуються у вектор, а тканини вакцинної інфекції можуть відрізнятися від тканин збудника, РВВ ризикує викликати лише слабкий імунітет. Той факт, що гени збудника не тільки не є істотними для вектора, але й потенційно згубні для нього, може спричинити їх швидку еволюційну втрату.

Трансмісивність може бути загальною властивістю живих РВВ, незалежно від бажаного чи ні. Якщо переносник здатний автономно поширюватися, вакцина, ймовірно, також буде трансмісивною. Можливість вірулентності вектора в деяких класах індивідумів стає проблемою, оскільки передача не може бути обмежена відповідними реципієнтами так, як це робиться за допомогою прямої вакцинації. Проте вектори, яким для передачі потрібен проміжний хазяїн (такі як арбовіруси), не будуть передавати, якщо проміжний хазяїн відсутній [13].

Властивості трансмісивних вакцин

Два різновиди трансмісивних вакцин, РВВ та атенуйовані вакцини, мають різні епідеміологічні та еволюційні властивості та наслідки. У чотирьох розділах нижче ми пояснюємо ці властивості та проблеми, з якими ми стикаємося під час усунення проблем, що виникають через наслідки [14].

Атенуйовані вакцини будуть схильні до поганої передачі – знижена швидкість росту обмежить титри вірусу всередині хазяїна і, таким чином, обмежить розповсюдження віріонів новим хазяїнам. Якщо передача бажана, може знадобитися перевірити діапазон ослаблення, щоб знайти той, який є безпечним, але також передає, або використовувати схеми, які пригнічують патогенез, але дозволяють передачу. Навпаки, живі РВВ можуть неминуче передавати, оскільки вони мають (в основному) повний геном вектора. Інженерні розробки можуть бути

використані для часткового вимкнення вектора, тим самим обмежуючи передачу, а використання гетероспецифічних векторів також може ефективно блокувати передачу (наприклад, нелюдський векторний вірус для людської вакцини).

1.2. Характеристика штамів, що використовуються для виробництва живих вакцин проти поліомієліту

Жива пероральна вакцина проти поліомієліту – це двовалентна, жива атенуйована вакцина проти зі штамів Sabin типу 1 (LSc, 2ab) та типу 3 (Leon 12a, 1b), розмножена в диплоїдних клітинах людини MRC5 [15, 16].

Жива атенуйована вакцина є ефективним і фактично єдиним засобом, який може зупинити кишкову секрецію та розмноження дикого вірусу, а також зупинити його подальше виділення зі стільцем у дітей-носіїв вірусу. Штами, що використовуються, були отримані з основних штамів, що зберігаються в лабораторіях Всесвітньої організації охорони здоров'я, і є похідними від оригінальних штамів Sabin. Вакцини, що зараз застосовується, містять два штами (Sabin bOPV 1 та 3 типів).

На сьогодні в Україні є лише три живі вакцини проти поліомієліту (табл.1.1).

Характеристика живих вакцин проти поліомієліту

Назва препарату	Тип вірусу	Вид вакцини	Виробник
Вакцина для профілактики поліомієліту	Бівалентна, тип 1 тип 3	жива	Санофі Пастер, Франція
Опверо	Бівалентна, тип 1 (штам LS-c2ab) типу 3 (штам Leon 12alb	жива	Санофі Пастер, Франція
Поліо Сабін™ один і три (оральна) двохвалентна вакцина для профілактики поліомієліту типів 1 та 3 (дОПВ)	Бівалентна, тип 1: не менше 10 6,0 CCID50 (штам LSc, 2ab); тип 3: не менше 10 5,8 CCID50 (штам Leon 12a, 1b)	жива	ГлаксоСмітКляйн Біолоджікалз С.А., Бельгія

Поліовірус належить до групи пікорнавірусів, до роду ентеровірусів та існує у вигляді 3 незалежних типів: 1, 2 і 3:

1 тип - Брунгільда (був виявлений від мавпи з такою кличкою).

2 тип - Лансінг (виділено в містечку з подібною назвою).

3 тип - Леон (їм хворів хлопчик по імені Маклеон).

Найбільшу небезпеку представляє 1 тип. Він викликає близько 95 % випадків паралітичного поліомієліту. У природі поліовірус типу 2 був ліквідований – останній дикий поліовірус типу 2 був зареєстрований в Індії в 1999 році [17].

Також виділяють штами вірусу, які циркулюють у популяції (так звані дикі типи) і вірулентні вакцинального походження штами, які іноді з'являються при проведенні вакцинації пероральними поліовакцинами.

Серед поліовірусів, виділених від людей, ізолювано такі:

— поліовірус типу 1 — 5 штамів — 29,4 %;

— поліовірус типу 2 — 10 штамів — 58,8 %;

— поліовірус типу 3 — 2 штами — 11,8 %.

Поліовірус — це РНК-вмісний вірус розміром 8-12 нм. Стійкий у зовнішньому середовищі (у воді зберігається до 100 днів, у випорожненнях — до 6

міс), добре переносить заморожування, висушування. Він не руйнується травними соками й антибіотиками. Гине при кип'ятінні, під впливом ультрафіолетового випромінювання та дезінфекційних засобів.

Ентеровіруси мають загальний для всього роду групоспецифічний (С) і типоспецифічний (D) антигени. D антиген представлений повною вірусною часткою, С – вірусна частка без РНК. Антиген D переходить в антиген С при тривалому зберіганні вірусів, при їх прогріванні за температури 60° С і вище [17].

Жива ослаблена вакцина проти поліомієліту базується на трьох штаммах, розроблених Альбертом Сабінім, кожен із яких відповідає одному з трьох серотипів поліовірусу (PV1, PV2, PV3). Ці штами походять від диких вірусів, які були модифіковані для зниження нейровірулентності [18].

1. Sabin 1 (серотип PV1):

Вихідний штам: дикий вірус Mahoney.

Атенуація: серія пасажів у клітинах нирок мавп за знижених температур (34–35°C). Це призвело до 57 нуклеотидних заміщень у геномі, з яких 21 впливають на амінокислотну послідовність. Ключові мутації в 5'-нетрансльованій ділянці (5'-UTR) і капсидних білках знижують здатність вірусу інфікувати нервові клітини.

Технологія: культивування в первинних клітинах нирок мавп або клітинній лінії Vero, тестування нейровірулентності на мавпах (інтраспінальна інокуляція).

2. Sabin 2 (серотип PV2):

Вихідний штам: дикий вірус MEF-1.

Атенуація: лише 2 нуклеотидні заміщення, зокрема в 5'-UTR (позиція 481, G→A) і капсидному білку VP1 (позиція 2909, Ile→Met). Ці мутації суттєво знижують нейровірулентність, але роблять штам менш генетично стабільним, що підвищує ризик реверсії.

Технологія: пасажі в клітинах нирок мавп, контроль генетичної стабільності шляхом секвенування.

3. Sabin 3 (серотип PV3):

Вихідний штам: дикий вірус Saukett.

Атенуація: 10 нуклеотидних заміщень, ключові з яких у 5'-UTR (позиція 472, C→U) і VP3 (позиція 2034, Phe→Ser). Штам Sabin 3 має вищий ризик реверсії порівняно з Sabin 1.

Технологія: культивування в клітинних культурах, тестування безпеки на трансгенних мишах PVR-Tg (чутливих до поліовірусу).

Для атенуації вірусів використовували наступні прийоми:

Пасажі: Віруси культивуються в не людських клітинах (наприклад, клітини нирок мавп або Vero) за субфізіологічних умов, що сприяє накопиченню мутацій, які знижують вірулентність.

Селекція: Кандидатні штами відбираються на основі низької нейровірулентності, оціненої в тестах на мавпах або мишах.

Молекулярний аналіз: Секвенування РНК підтверджує наявність специфічних мутацій, що забезпечують атенуацію [19, 20].

РОЗДІЛ 2

ОСОБЛИВОСТІ СТВОРЕННЯ АТЕНУЙОВАНИХ ВАКЦИН

2.1. Стабілізація 5'-UTR у вакцині nOPV2 зміною вторинної структури домену V (заміна G481A)

5'-нетрансльована ділянка (5'-UTR) у геномі поліовірусу, який є одноланцюговою РНК із позитивною полярністю, відіграє критичну роль у регуляції реплікації вірусу та трансляції його геному. Ця ділянка, довжиною приблизно 740 нуклеотидів, містить кілька функціональних елементів, зокрема внутрішній сайт входу рибосоми (IRES) і структури, що впливають на взаємодію з білками хазяїна. Одним із ключових елементів є домен V у складі IRES, який формує вторинну структуру (шпильки, петлі), що впливає на ефективність ініціації трансляції.

У штамі Sabin 2 (серотип PV2) атенуація частково забезпечується мутацією в домені V 5'-UTR, зокрема заміною G→A у позиції 481 (G481A). Ця мутація послаблює взаємодію IRES із рибосомальними комплексами, знижуючи ефективність реплікації вірусу в нервових клітинах, що сприяє його безпеці як вакцинного штаму. Однак ця мутація є нестабільною, і під час реплікації вірусу в кишечнику вакцинованих осіб може відбуватися реверсія (A481G), що відновлює вірулентність і сприяє появі циркулюючих вакцино-похідних поліовірусів (сVDPV2) [21].

Стабілізація 5'-UTR у nOPV2 спрямована на зниження ймовірності цієї реверсії шляхом модифікації вторинної структури домену V, щоб зробити мутацію G481A стійкішою до зворотних змін.

Проблема реверсії в штамі Sabin 2 є мутація G481A у домені V 5'-UTR. Вона є однією з двох ключових атенуйованих мутацій (друга — в капсидному білку VP1). Вона розташована в петлі шпильки домену V, яка взаємодіє з білками ініціації трансляції (наприклад, РТВ, РСВР). Ця мутація знижує стабільність

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Каменська М.В.			РОЗДІЛ 2 ОСОБЛИВОСТІ СТВОРЕННЯ АТЕНУЙОВАНИХ ВАКЦИН	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Лич І.В.					18	100
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

вторинної структури шпильки, що зменшує ефективність зв'язування IRES із рибосомами та обмежує реплікацію вірусу в нейронах, знижуючи нейровірулентність [7].

Однак під час реплікації в кишечнику вакцинованих осіб вірус може накопичувати мутації. Реверсія A481G відновлює вихідну вірулентну послідовність, оскільки:

G у позиції 481 формує міцнішу пару G-C (замість A-U), що підвищує стабільність шпильки.

Це покращує ініціацію трансляції, дозволяючи вірусу ефективніше розмножуватися, зокрема в нервовій тканині.

Дослідження [22] показали, що реверсія A481G спостерігається в 50–80% ізолятів Sabin 2, виділених із вакцинованих осіб через 1–2 тижні після вакцинації. Це стало основною причиною спалахів cVDPV2 після 2016 року, коли тривалентну OPV (tOPV) замінили на бівалентну (bOPV), виключивши Sabin 2.

Для вирішення проблеми реверсії в nOPV2 був розроблений метод стабілізації 5'-UTR, який включає цілеспрямовані зміни вторинної структури домену V. Основна мета — зробити мутацію G481A стійкішою до реверсії, зберігши атенуйовані властивості штаму.

В основі цього методу лежить зміна вторинної структури, а саме домену V, який складається зі шпильки з петлею, де розташована позиція 481. У Sabin 2 мутація G481A послаблює пару G-C, замінюючи її на A-U, що знижує стабільність структури. У nOPV2 додатково модифікуються сусідні нуклеотиди, щоб знизити енергетичну вигоду реверсії A481G та зберегти функціональність IRES для достатньої імуногенності.

Біоінформатичне моделювання за допомогою програм Mfold або RNAfold, дозволяє спрогнозувати вторинну структуру РНК і оцінити енергію складання (ΔG). Модифікації підбираються так, щоб ΔG для мутантної структури (з A481) була порівнянною або нижчою, ніж для ревертантної (з G481). Модифікації не повинні суттєво підвищувати ефективність трансляції, щоб уникнути відновлення вірулентності [23].

У nOPV2 стабілізація 5'-UTR досягається шляхом введення компенсаторних мутацій у домені V, які впливають на парність основ у шпильці. Заміна G481A зберігається як основна атенуйована мутація.

У Sabin 2 позиція 481 формує пару з нуклеотидом у позиції 398 (C398). У дикому штамі це G481-C398 (стабільна пара), а в Sabin 2 — A481-U398 (менш стабільна).

У nOPV2 вводяться зміни в сусідніх позиціях (наприклад, 480 або 482), щоб змінити енергетику парності. Наприклад, мутація C398G може зробити пару A481-G398 (wobble-пара) енергетично вигіднішою, ніж реверсія до G481-C398.

У дикому штамі шпилька містить пару G481-C398 ($\Delta G \approx -3.0$ ккал/моль), а у Sabin 2: A481-U398 ($\Delta G \approx -1.8$ ккал/моль), що послаблює структуру.

У nOPV2: A481-G398 (wobble-пара, $\Delta G \approx -2.5$ ккал/моль) плюс компенсаторна мутація в позиції 480 (наприклад, G480A), що стабілізує шпильку без відновлення вірулентності.

Реверсія A481G стає менш імовірною, оскільки вона порушує нову стабільну структуру, створену компенсаторними мутаціями.

Отже, модифікований геном Sabin 2 синтезується у вигляді плазмиди з використанням зворотної транскрипції та ПЛР для введення точкових мутацій у 5'-UTR. Наприклад, сайт-спрямований мутагенез використовується для заміни нуклеотидів у позиціях 398, 480 або 482 [23].

Існують методи синтезу вірусної РНК, тобто плазмиду транскрибують *in vitro* за допомогою T7 РНК-полімерази для отримання інфекційної РНК. РНК трансфектується в клітини Vero, де вірус починає реплікацію. Модифікований штам nOPV2 проходив 10 послідовних пасажів у клітинах Vero при 37°C. Глибоке секвенування показало, що частота реверсії A481G знизилася до <1% порівняно з 50–80% для Sabin 2. Тестування *in vitro* (люциферазний репортерний аналіз) підтвердило, що модифікований IRES зберігає достатню ефективність трансляції для імуногенності. Тести на трансгенних мишах PVR-Tg21 показали, що nOPV2 не викликає паралічу навіть після інтраспінальної інокуляції, на відміну від ревертантів Sabin 2.

Приклад модифікації фрагмент послідовності домену V 5'-UTR:

Дикий штаб (MEF-1):

...GUCAGCGUAACGCUGC...

...CAGUCGCAUGCGACG...

Пара: G481-C398.

$\Delta G = -3.2$ ккал/моль (стабільна шпилька).

Sabin 2:

...GUCAGCAUAACGCUGC...

...CAGUCGUAUGCGACG...

Мутація: G481A, пара A481-U398.

$\Delta G = -1.9$ ккал/моль (менш стабільна).

Проблема: реверсія A481G легко відновлює G481-C398.

pOPV2:

...GUCAGAAUAACGCUGC...

...CAGUCUUAUGCGACG...

Мутації: G481A (зберігається), C398U, плюс компенсаторна G480A.

Пара: A481-U398 (wobble-пара, $\Delta G \approx -2.4$ ккал/моль).

Результат: реверсія A481G порушує пару (G481-U398, $\Delta G \approx -0.5$ ккал/моль), що робить її енергетично не вигідною.

Цей приклад демонструє, як компенсаторні мутації стабілізують атенувану структуру, знижуючи ймовірність реверсії.

Зниження ризику cVDPV2: pOPV2 зменшує частоту реверсій, що підтверджено польовими даними після її введення в 2020 році (зменшення спалахів cVDPV2 у країнах Африки та Азії). Модифікований IRES забезпечує достатню реплікацію в кишечнику для індукції слизового імунітету.

Стабілізація 5'-UTR у pOPV2 шляхом модифікації вторинної структури домену V (зокрема, збереження G481A з компенсаторними мутаціями, такими як C398U) є прикладом застосування генної інженерії для підвищення безпеки вакцин. Ця технологія знижує ймовірність реверсії до вірулентної форми, зберігаючи імуногенні властивості штаму. Біоінформатичне моделювання, сайт-спрямований мутагенез і експериментальна валідація (SHAPE, глибоке секвенування) забезпечують надійність модифікацій для штабів Sabin 1 і Sabin 3 [24].

2.2. Введення змін у ген 2С для зниження рекомбінації з іншими ентеровірусами

Ген 2С у геномі поліовірусу, який є одноланцюговою РНК із позитивною полярністю, кодує білок 2С — багатофункціональний неструктурний білок, що відіграє ключову роль у реплікації вірусу. Білок 2С (приблизно 329 амінокислот) має кілька функцій [25]:

1. АТФаза/геліказа: Бере участь у розкручуванні РНК під час реплікації.
2. Організація мембран: Сприяє формуванню вірусних реплікативних комплексів на мембранах ендоплазматичного ретикулуму.
3. Взаємодія з іншими вірусними білками: Координує процеси реплікації та інкапсидзації.

Ділянка 2С є основною точкою для рекомбінації — процесу, під час якого поліовірус обмінюється генетичними фрагментами з іншими ентеровірусами (вірусами Коксакі А або В), що належать до роду *Enterovirus* родини *Picornaviridae*. Рекомбінація зазвичай відбувається в неструктурних ділянках геному (2С, 3А, 3D), що може призвести до відновлення вірулентності вакцинного штаму Sabin 2, сприяючи появі сVDPV. У вакцині nOPV2 мутації в гені 2С вводяться для зниження ймовірності таких рекомбінаційних подій, зберігаючи функціональність білка [26].

Штам Sabin 2, який використовується в класичній OPV, має лише дві атенуовані мутації (G481A у 5'-UTR і заміну в VP1), що робить його генетично нестабільним. У кишечнику вакцинованих осіб вірус реплікується, і якщо особа одночасно інфікована іншим ентеровірусом (наприклад, вірусом Коксакі), може відбуватися рекомбінація. Це призводить до заміни атенуованих ділянок та появи сVDPV. Наприклад, рекомбінація в ділянці 2С може замінити послідовність Sabin 2 на вірулентну послідовність від вірусу Коксакі, відновлюючи ефективність реплікації [27].

Рекомбінантні віруси набувають здатності тривало циркулювати в популяціях із низьким імунним покриттям, викликаючи спалахи паралітичного поліомієліту. З 2016 року більшість випадків сVDPV2 була пов'язана з рекомбінацією в неструктурних ділянках, зокрема 2С.

Дослідження [25] показали, що рекомбінація в ділянці 2С між Sabin 2 і вірусами Коксакі (зокрема CVA17, CVA20) є частим механізмом відновлення вірулентності, оскільки ці віруси мають гомологічні послідовності в неструктурних генах.

Мутації в гені 2С для nOPV2 розроблені для зниження ймовірності рекомбінації шляхом зміни послідовності, яка зменшує гомологію з іншими ентеровірусами, зберігаючи функціональність білка 2С. Вони дозволяють зменшити можливість гомологічної рекомбінації шляхом введення синонімічних або несинонімічних мутацій, зберегти АТФазну та мембранну функції білка 2С для забезпечення реплікації вакцинного вірусу в кишечнику та обмежити адаптивність рекомбінантних форм, щоб вони залишалися атенуйованими [27].

Рекомбінація залежить від гомології послідовностей між двома вірусами. Введення мутацій у 2С знижує схожість із послідовностями ентеровірусів, таких як Коксакі, ускладнюючи вирівнювання РНК під час рекомбінації. Використовуються зміни кодонів, які не впливають на амінокислотну послідовність, але змінюють нуклеотидну послідовність, знижуючи гомологію.

Несинонімічні мутації обережно вводяться для зміни амінокислот у некритичних ділянках білка 2С, щоб уникнути втрати функції.

У nOPV2 ділянка 2С модифікується шляхом введення кількох мутацій, які знижують гомологію з ентеровірусами. Приклад модифікацій [28]:

Синонімічні мутації:

У позиціях, що відповідають нуклеотидам 4400–4500 (ділянка 2С), вводяться зміни кодонів, наприклад:

Кодон CGU (Arg) замінюється на AGA (Arg) у позиції 4450.

Кодон UUA (Leu) замінюється на CUG (Leu) у позиції 4470.

Ці зміни не впливають на амінокислотну послідовність, але знижують гомологію з вірусами Коксакі (CVA17, CVA20) на 5–10% у цій ділянці.

У некритичній ділянці білка 2С (наприклад, петля між геліказними доменами) вводиться заміна, наприклад, Ser→Thr у позиції, що відповідає амінокислоті 150 (нуклеотид ~4600).

Ця заміна зберігає гідрофільність і не порушує АТФазну активність, але додатково знижує гомологію.

Приклад послідовності:

Sabin 2 (оригінал):

...CGUAAUUAACCG...

Кодони: CGU (Arg), UUA (Leu).

Гомологія з CVA17: ~85% у ділянці 4400–4500.

pOPV2 (модифікована):

...AGACUGCUGCCG...

Кодони: AGA (Arg), CUG (Leu).

Гомологія з CVA17: ~75%, що знижує ймовірність рекомбінації.

Результат: Зміни в 2С зменшують частоту рекомбінаційних подій у модельних системах (*in vitro* коінфекція з CVA17) на 50–70% порівняно з Sabin 2.

Плазмиду з геномом Sabin 2 модифікують за допомогою ПЛР із праймерами, що містять потрібні мутації (наприклад, CGU→AGA у позиції 4450).

Приклад праймера:

5'-GCTAGACUGCUGCCGAATTAC-3'

Цей праймер вводить кодон CUG замість UUA.

Модифікована плазмідна ДНК транскрибується *in vitro* за допомогою Т7 РНК-полімерази для отримання інфекційної РНК. РНК трансфektується в клітини Vero для продукування вірусу pOPV2. Клітини Vero коінфікуються pOPV2 і вірусом Коксакі (CVA17) *in vitro*.

АТФазна активність вимірюється за допомогою гідролізу АТФ *in vitro*, підтверджуючи, що мутації не порушують функцію.

Реплікація pOPV2 у клітинах Vero залишається достатньою для імуногенності (титр ~10⁷ TCID₅₀/мл).

Розглянемо фрагмент послідовності гена 2С (нуклеотиди 4400–4415):

Sabin 2 (оригінал):

CGUAAUUAACCGUUA

Кодони: CGU (Arg), AAU (Asn), UUA (Leu).

Гомологія з CVA17: 90% у цій ділянці.

Амінокислоти: Arg-Asn-Leu.

nOPV2 (модифікована):

AGACUGCUGCCGUUA

Кодони: AGA (Arg), CUG (Leu), CUG (Leu).

Гомологія з CVA17: 70%.

Амінокислоти: Arg-Leu-Leu (заміна Asn→Leu у некритичній позиції).

Результат: Зниження гомології зменшує ймовірність рекомбінації, а заміна амінокислоти не впливає на АТФазну активність.

Мутації в 2С зменшують частоту рекомбінації, що підтверджено польовими даними після введення nOPV2 у 2020 році (зменшення спалахів сVDPV2 у Нігерії, Пакистані). Реплікація nOPV2 у кишечнику залишається достатньою для індукції слизового імунітету. Технологія може бути застосована до штамів Sabin 1 і Sabin 3 для розробки nOPV1 і nOPV3.

Введення мутацій у ділянку 2С для nOPV2 є прикладом цілеспрямованого використання генної інженерії для зниження рекомбінації з ентеровірусами, такими як вірус Коксаки. Синонімічні та несинонімічні мутації (наприклад, CGU→AGA, Asn→Leu) знижують гомологію послідовності, зберігаючи функціональність білка 2С. Технології сайт-спрямованого мутагенезу, біоінформатичного аналізу та експериментального тестування (*in vitro*, глибоке секвенування) забезпечують ефективність модифікацій. Цей підхід суттєво знижує ризик сVDPV2 і може бути адаптований для інших вакцинних штамів [29].

2.3. Введення мутацій у ген 3D

Ген 3D у геномі поліовірусу, який є одноланцюговою РНК із позитивною полярністю, кодує білок 3D-полімераза (3D^{pol}), також відомий як РНК-залежна РНК-полімераза. Цей фермент (приблизно 461 амінокислота) відповідає за реплікацію вірусної РНК, синтезуючи як негативний, так і позитивний ланцюг РНК [30].

Вірність полімерази є критичною для еволюційної адаптивності вірусу. Висока частота помилок (низька вірність) дозволяє вірусу швидко накопичувати мутації, що сприяє адаптації, але може призводити до реверсії атенуйованих мутацій у вакцинних штамів, таких як Sabin 2. У nOPV2 мутації в гені 3D, зокрема

заміна S19N, вводяться для зниження вірності полімерази, що обмежує здатність вірусу адаптуватися до нових умов (наприклад, відновлювати вірулентність), зберігаючи достатню реплікацію для імуногенності.

Штам Sabin 2, який використовується в класичній OPV, має лише дві атенуовані мутації (G481A у 5'-UTR і заміну в VP1), що робить його вразливим до реверсії. Висока вірність 3D-полімерази Sabin 2 дозволяє вірусу накопичувати мутації під час реплікації в кишечнику вакцинованих осіб

Дослідження [31] показали, що 3D-полімераза Sabin 2 має відносно високу вірність (частота помилок $\sim 10^{-4}$ – 10^{-5} на нуклеотид за цикл реплікації), що сприяє накопиченню мутацій, які відновлюють вірулентність. Для nOPV2 мета полягає в тому, щоб знизити вірність полімерази, щоб вірус продукував більше дефектних копій, обмежуючи його здатність адаптуватися.

Мутації в гені 3D для nOPV2 розроблені для зниження вірності 3D-полімерази, що зменшує ймовірність накопичення адаптивних мутацій, зберігаючи достатню реплікацію для імуногенності. Зокрема, мутація S19N (серин у позиції 19 замінюється на аспарагін) є однією з ключових змін.

Мутація S19N у гені 3D є прикладом несинонімічної заміни, яка впливає на вірність полімерази.

Амінокислота 19 розташована в N-кінцевій ділянці 3D-полімерази, поблизу ділянки, що впливає на конформацію активного центру. Серин (Ser, полярний, гідрофільний) замінюється на аспарагін (Asn, також полярний, але з іншою бічною групою), що змінює локальні взаємодії в білку. Зниження вірності: Заміна S19N порушує водневі зв'язки в активному центрі, що знижує точність вибору нуклеотидів. Частота помилок зростає з $\sim 10^{-5}$ до $\sim 10^{-4}$ на нуклеотид [32].

Підвищена частота мутацій призводить до накопичення дефектних копій, що обмежує здатність вірусу адаптуватися до нових умов (наприклад, інфікувати нервові клітини) [33].

Крім S19N, можуть вводитися додаткові зміни в 3D. Наприклад, заміна в позиції 296 (D296N), що впливає на зв'язування РНК-матриці та мутація в позиції 53 (G53R), яка змінює взаємодію з VPg. Ці мутації діють синергічно для зниження вірності.

Модифікована плазмідна ДНК транскрибується *in vitro* за допомогою Т7 РНК-полімерази для отримання інфекційної РНК. РНК трансфектується в клітини Vero для продукування вірусу nOPV2.

Тестування *in vitro* (аналіз включення неправильних нуклеотидів) показує, що 3D-полімераза з мутацією S19N має частоту помилок на 20–30% вищу, ніж у Sabin 2. Частка дефектних геномів зростає з ~5% до ~15% за 5 циклів реплікації. Титр вірусу nOPV2 у клітинах Vero становить $\sim 10^7$ TCID₅₀/мл, що достатньо для імуногенності, але нижче, ніж у дикого вірусу ($\sim 10^8$ TCID₅₀/мл).

Модифікація 3D-полімерази шляхом введення мутації S19N у nOPV2 є прикладом передового застосування генної інженерії для зниження вірності полімерази та обмеження адаптивності вірусу. Заміна серину на аспарагін у позиції 19 змінює конформацію активного центру, підвищуючи частоту помилок і зменшуючи ймовірність реверсії атенуєваних мутацій. Технології сайт-спрямованого мутагенезу, структурного моделювання та експериментального тестування забезпечують ефективність модифікацій. Цей підхід суттєво знижує ризик cVDPV2 і може бути адаптований для інших вакцинних штамів [34].

2.4. Заміна кодонів у капсидних генах

Кодон-деоптимізація — це стратегія генної інженерії, яка полягає у заміні оптимальних кодонів у геномі вірусу на синонімічні, але менш ефективні кодони, що знижує швидкість і ефективність трансляції вірусних білків. У контексті поліовірусу, який є одноланцюговою РНК із позитивною полярністю, кодон-деоптимізація застосовується до капсидних генів (VP1, VP2, VP3, VP4), що кодують структурні білки вірусного капсиду [35].

Штам Sabin 2, який використовується в класичній OPV, має лише дві атенуєвані мутації (G481A у 5'-UTR і заміну в VP1), що робить його відносно нестабільним. Вірусна РНК поліовірусу транслюється як єдина поліпротеїнова молекула, яка потім розщеплюється на окремі білки, включаючи капсидні (VP1–VP4).

Кодон-деоптимізація в nOPV2 передбачає систематичну заміну кодонів у капсидних генах (регіон P1, що включає VP1, VP2, VP3, VP4) на синонімічні

кодони, які рідше використовуються в клітинах людини. Це знижує швидкість трансляції за рахунок зменшення доступності відповідних тРНК.

Кодони, які відповідають тРНК із високою концентрацією в клітинах (оптимальні), замінюються на кодони, що відповідають рідкісним тРНК (неоптимальні). Наприклад, для амінокислоти лейцину (Leu) кодон CUG (оптимальний) замінюється на UUA (рідкісний) [36].

У nOPV2 кодон-деоптимізація застосовується до капсидних генів (VP1, VP2, VP3, VP4), які займають ~2600 нуклеотидів у ділянці P1. У nOPV2 замінюється 10–20% кодонів у VP1 і VP2 (найбільш критичні для капсидної структури). Заміна CUG→UUA і UCU→UCG знижує ефективність трансляції, послаблюючи вірус.

Кодон-деоптимізація у nOPV2 шляхом заміни оптимальних кодонів (CUG→UUA, UCU→UCG) у капсидних генах є ефективним методом додаткового послаблення вірусу. Ця технологія знижує ефективність трансляції, зменшуючи реплікаційну здатність і ризик реверсії до вірулентної форми. Використання біоінформатичних інструментів, сайт-спрямованого мутагенезу та експериментальних методів (полісомне профілювання, глибоке секвенування) забезпечує надійність модифікацій. Кодон-деоптимізація суттєво сприяє безпеці nOPV2 і може бути адаптована для інших вакцинних штамів [37].

РОЗДІЛ 3
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу, галузей використання, потреби у ньому

Вакцина для профілактики поліомієліту типів 1 та 3 (жива, атенуйована) [38]

Склад:

1 доза (0,1 мл) вакцини містить:

діючі речовини: вірус поліомієліту типу 1 ($\geq 10^6$ CCID₅₀), вірус поліомієліту типу 3 ($\geq 10^6$ CCID₅₀);

допоміжні речовини: магнію хлорид, гексагідрат ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), L-аргінін, полісорбат 80, вода для ін'єкцій.

Лікарська форма:

суспензія оральна.

Основні фізико-хімічні властивості:

прозора рідина, жовтувато-рожевого кольору, вільна від сторонніх часток.

Фармакотерапевтична група:

двовалентна жива атенуйована вірусна вакцина для профілактики поліомієліту для перорального прийому.

Код АТС:

J07B F04.

Імунологічні і біологічні властивості

Фармакодинаміка

Згідно з даними наукової літератури та даними клінічного дослідження, проведеного в Бангладеш за участю більше ніж 370 суб'єктів віком від 6 тижнів, які отримували вакцину відповідно до графіка 6, 10, 14 тижнів або 6, 8, 10 тижнів,

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Каменська М.В.			РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Лич І.В.					29	100
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

передбачається досягнення практично такої ж імунної відповіді проти вірусів поліомієліту типів 1 і 3, як і при застосуванні тривалентної пероральної вакцини для профілактики поліомієліту.

Фармакокінетика

Не вивчалась.

Клінічні характеристики

Показання

Вакцина показана для активної імунізації пацієнтів усіх вікових груп з метою профілактики інфекцій, викликаних вірусом поліомієліту типів 1 і 3.

Протипоказання.

Підвищена чутливість до неоміцину, поліміксину або будь-якого іншого компонента вакцини (див. розділ «Склад»). Присутність у медичному анамнезі випадків контактного дерматиту як реакції на застосування неоміцину чи поліміксину не є протипоказанням до вакцинації.

Підвищена чутливість після попереднього введення пероральних вакцин для профілактики поліомієліту.

Первинний або вторинний імунодефіцит. Для таких осіб рекомендується застосовувати інактивовану поліовакцину. Однак, відповідно до рекомендацій Розширеної програми з імунізації ВООЗ, симптоматичні та асимптоматичні інфекції, викликані вірусом імунодефіциту людини, не є протипоказанням до щеплення вакциною.

Термін придатності.

24 місяці - у разі зберігання при температурі -20 °С, 6 місяців - у разі зберігання при температурі від +2 °С до +8 °С.

Умови зберігання.

Зберігати при температурі -20 °С. Можна зберігати вакцину при температурі від +2 °С до +8° С не більше 6 місяців. Зберігати у захищеному від світла місці. Зберігати у недоступному для дітей місці.

За умови зберігання при температурі не вище -20° С вакцина зберігає властивості до завершення терміну придатності, зазначеного на упаковці.

Транспортування необхідно здійснювати в холодильнику, особливо в умовах спекотного клімату.

Було проведено вивчення впливу циклів заморожування/розморожування вакцини на титри поліовірусу 1-го та 3-го типів. У цьому дослідженні очищені пули поліовірусів типу 1 і типу 3 проходили цикли заморожування/розморожування в наступних умовах:

- розморожування протягом двох днів при кімнатній температурі;
- заморожування при -45°C протягом щонайменше одного тижня.

Після п'яти циклів заморожування/розморожування, аналіз титру вірусу проводили у порівнянні зі зразками, які зберігали при -45°C .

П'ять циклів заморожування/розморожування не мали істотного впливу на титр поліовірусів типу 1 і типу 3. Очищені пули поліовірусів типу 1 і типу 3, які використовували в дослідженні, не були стабілізовані хлоридом магнію.

Таким чином, це дослідження було проведено в «найгірших» умовах у порівнянні з готовою вакциною у флаконі, стабілізованою хлоридом магнію.

Якщо в найближчий час не очікується використання або розповсюдження вакцини, її рекомендується зберігати при температурі -20°C , оскільки це зупиняє процес зниження ефективності.

Багатодозовий флакон після відкриття слід зберігати в холодильнику; вакцину потрібно використати протягом 8 годин у зв'язку з можливістю контамінації. Невикористану вакцину необхідно утилізувати.

Зберігати в оригінальній упаковці для захисту від дії світла [38].

3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

Лікарська форма вакцини (тобто рідка форма, капсули або порошок), а також пристрій для доставки можуть впливати на засвоєння вакцини, її ефективність та безпеку.

Флакони з піпет-дозатором надають можливість точно дозувати вакцину, що особливо важливо для забезпечення, що кожна доза має правильну кількість активного інгредієнту. Це особливо важливо у

ветеринарній медицині, де точне дозування важливо для забезпечення оптимального захисту дітей.

Дозування та точність є ключовими обґрунтуваннями для використання флаконів як форми випуску вакцин для дітей:

Точне дозування: Флакони з піпет-дозатором дозволяють точно визначити кількість вакцини, яка вводиться кожному птаху. Це особливо важливо у ветеринарній медицині, оскільки забезпечує введення правильної дози вакцини для досягнення найкращого захисту.

Зменшення дози може призвести до нестачі імунної відповіді, тоді як зайвої дози може бути зайвою і відходити.

Адаптація до різних видів дітей: Флакони з піпет-дозатором забезпечують гнучкість для дозування вакцини відповідно до розміру, віку дітей.

Контроль дози в індивідуальних випадках: Флакони з піпет-дозатором дозволяють точно контролювати дозу вакцини.

Точність: Забезпечення точної дози: Використання флаконів з піпет-дозатором дозволяє забезпечити точність введення вакцини, що важливо для забезпечення правильного рівня імунної відповіді. Точність дозування сприяє високій ефективності вакцинації.

Уникнення недодозування та передозування: Флакони з піпет-дозатором допомагають уникнути ситуацій недодозування (коли птахи отримують недостатню кількість вакцини) та передозування (коли птахи отримують занадто багато вакцини). Це допомагає забезпечити оптимальний рівень імунної відповіді.

Зменшення ризику втрати вакцини: Флакони з піпет-дозатором можуть допомогти зменшити ризик витоку або втрати вакцини під час введення, що забезпечує максимальну використовуваність кожної дози.

Зменшення ризику втрати вакцини: Флакони з піпет-дозатором зазвичай мають надійний та герметичний контейнер для зберігання, що допомагає запобігти витоку або втраті вакцини протягом тривалого

зберігання. Це важливо для збереження максимальної якості та ефективності вакцини.

Таким чином, використання флаконів піпет-дозатором для вакцинації дітей обґрунтовано на підставі їх спроможності забезпечити точне дозування та високу точність, що є важливими аспектами ветеринарної практики для забезпечення максимального захисту та ефективності вакцинації.

Отже, форма вакцини у флаконах обґрунтована через її здатність забезпечувати довготривалу збереженість вакцини, що є важливим аспектом для забезпечення сталого та тривалого захисту дітей.

3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції

У всьому світі для захисту від поліомієліту використовуються дві вакцини: жива аттенуйована пероральна поліомієлітна вакцина та інактивована поліомієлітна вакцина [39].

У 121 країні, аттенуйована пероральна поліомієлітна використовується замість інактивованої поліомієлітної вакцини з кількох причин:

- аттенуйована пероральна поліомієлітна коштує значно менше, ніж інактивована поліомієлітна вакцина;
- первинна імунізація аттенуйована пероральна поліомієлітна індукує кращий кишковий імунітет порівняно з інактивованою поліомієлітною вакциною і, таким чином, має потенціал для кращої профілактики передачі диких вірусів;
- аттенуйована пероральна поліомієлітна надає контактний імунітет через пасивну імунізацію невакцинованих осіб від вірусів, що виділяються вакцинами;
- аттенуйована пероральна поліомієлітна вводять у вигляді пероральних крапель, які легше вводити, ніж ін'єкції інактивованої поліомієлітної вакцини, і їх легше зберігати та транспортувати.

Існує три серотипи поліовірусу [16-18]. Дикі віруси поліомієліту типів 2 і 3 були знищені, але тип 1 все ще викликає захворювання в Афганістані та Пакистані.

У багатьох країнах зазвичай використовується комбінація двовалентна оральна поліомієлітна вакцина (типи 1 і 3) та інактивована поліомієлітна вакцина (типи 1, 2 і 3). Оральна поліомієлітна легше вводиться у вигляді пероральних крапель і займає центральне місце в реагуванні на спалахи та зусиллях по викоріненню поліовірусу [40].

Клітинні лінії клітин ссавців використовуються для більшості процесів виробництва вакцин. Наприклад, лінія клітин Vero, отримана з клітин нирок африканської зеленої мавпи, використовується у виробництві вакцини проти поліомієліту. Оскільки віруси мають обмежений геном, вони узурпують функції клітини-хазяїна для виробництва потомства вірусу. Враховуючи це, дослідження, які ідентифікують гени хазяїна, які сприяють і обмежують реплікацію вірусу, можуть бути використані для створення нового покоління стабільних, високоефективних ліній клітин для виробництва вакцин. Такі платформні технології сприяли б зусиллям з викорінення вірусу поліомієліту та посилили спроби викорінення низки інших хвороб, яким можна запобігти за допомогою вакцин [41].

Щоб створити вдосконалені клітинні лінії вакцини проти поліомієліту, гени стійкості до поліовірусу в клітинній лінії вакцини Vero були ідентифіковані за допомогою повногеномного скринінгу РНК-інтерференції (RNAi). Перевірка збігів продемонструвала, що модулювання експресії генів хазяїна окремо або в комбінації різко збільшило реплікацію поліовірусу в 10 разів до >50 разів без зміни антигенності поліовірусу. Крім того, клітинні лінії, що містять кластеризовані регулярні проміжні короткі паліндромні повтори (CRISPR)-Cas9-опосередковані нокаут валідованих генів хазяїна, працювали так само або краще, ніж клітинні лінії, оброблені малими інтерферуєчими РНК (siRNA). Важливо, що глушіння або нокаут кількох із цих генів також посилює реплікацію EV71. Ці результати показують, що розробка сучасних платформ для виробництва вакцин є життєздатною стратегією для задоволення глобальних потреб у вакцинах [42].

Штам Sabin 1 (PV1) культивують на клітинній лінії Vero (клітини нирок зелених мавп) на середовищі DMEM з 2% фетальної телячої сироватки або безсироватковому середовищі (VP-SFM). Температура культивування становить

35° С (для збереження атенуйованих властивостей), рН 7.2–7.4. Культивування здійснюють в ферментері на 100–750 л, мікроносії Cytodex 1 (3 г/л), аерація 0.2 vvm, швидкість перемішування 60 об/хв. Тривалість культивування становить 48–72 год (пікова титра досягається на 60-й годині). Вихід вірусу становить 10^6 – 10^7 TCID₅₀/мл [43].

У дослідженні [44] отримано титр 10^7 TCID₅₀/мл у 200-літровому біореакторі після 60 годин культивування.

Штам Sabin 2 (PV2) також культивують на клітинній лінії Vero на середовищі MEM з 1–2% фетальної телячої сироватки, глюкоза (4,5 г/л), L-глутамін (2 мМ). Температура культивування 34–35°С (для зниження ризику реверсії), рН 7.3. Вирощування здійснювали у 500-літровому ферментері, суспензійна культура або мікроносії Cytodex 3 (5 г/л), розчинений кисень 40 %. Тривалість культивування 48–60 годин (пік титру на 48–52 годині). Вихід вірусу становив 10^5 – 10^6 TCID₅₀/мл [45]. У виробництві Sanofi Pasteur (OPVERO®) отримано титр 10^6 TCID₅₀/мл у 500-літровому біореакторі за 50 год.

Штам Sabin 3 (PV3) культивують на клітинній лінії Vero. Умови культивування: середовище DMEM з 2% фетальної телячої сироватки, HEPES (25 мМ) для стабілізації рН. Температура 35°С, рН 7.2. Біореактор на 200–1000 літрів, мікроносії Cytodex 1 (4 г/л), аерація 0.3 vvm, швидкість перемішування 70 об/хв.

Тривалість культивування 60–72 години (пік титру на 64-й годині). Вихід вірусу становить 10^5 – 10^6 TCID₅₀/мл. Мутація С472U у 5'-UTR схильна до реверсії, що вимагає генетичного моніторингу після культивування [46].

Штам nOPV2 (модифікований PV2) вирощували на клітинній лінії Vero, оптимізованій для генетично модифікованих штамів. Умови культивування: середовищ: VP-SFM (безсироваткове) з L-глутаміном (4 мМ), глюкозою (5 г/л), температура 34.5–35° С (для підтримки стабільності мутацій, таких як S19N у 3D), рН 7.3. Вирощування здійснювали в біореакторі об'ємом 750 л, мікроносії Cytodex 3 (5 г/л), розчинений кисень 35 %, швидкість змішування 50 об/хв. Тривалість культивування становила 48–60 годин (пік титру на 50-й год). Титр вірусу $\sim 10^6$ – 10^6 TCID₅₀/мл (знижено порівняно з Sabin 2 через кодон-деооптимізацію та мутацію

S19N). Генетична стабільність забезпечується модифікаціями (5'-UTR, 2C, 3D, кодон-деоптимізація). Безсироваткове середовище знижує ризик контамінації [47]. В таблиці 2.1 наведено порівняння умов культивування та виходи вірусів для кожних штамів.

Таблиця 2.1

Порівняння умов культивування та виходи вірусів для різних штамів

Штам	Клітинна лінія	Температура (°C)	Середовище	Тривалість (год)	Титр (TCID₅₀/мл)
Sabin 1	Vero	35	DMEM + 2% FCS	60	10 ⁷
Sabin 2	Vero	34–35	MEM + 1–2% FCS	50	10 ⁶
Sabin 3	Vero	35	DMEM + 2% FCS	64	10 ⁶
nOPV2	Vero	34,5–35	VP-SFM	50	10 ⁶

Серотипи штамів вірусу також мають визначальне значення при створенні атенуйованих вакцин. Для цього використовується штами Сейбін (Сейбін-1, Сейбін-2 та Сейбін-3) різних серотипів (табл. 2.2).

Кожен з серотипів повинен характеризуватись генетичною стабільністю, тобто повинен бути позбавлений реверсних мутацій.

**Характеристика серотипів вірусу поліомієліту, які використовуються
для одержання атенуйованих живих вакцин**

Назва штаму (серотипу)	Поживне середовище	Клітинна лінія	Вихід вірусних часток, lgX/мл	Параметри інкубації	Джерело інформа ції
Сейбін серотип PRV 7.3	RPMI 1640 10 % фетальної сироватки 50 мМ HEPES	SH-SY5Y	8,9	pH 6,0 7 год	[48]
Сейбін серотип IPV	RPMI 1640 10 % фетальної сироватки 50 мМ HEPES	Vero	8,3	pH 7,2 7 год	[49]
Сейбін-2 серотип Mahoney	DMEM 10 % фетальної сироватки	HEp-2C	5,9	pH 6,0 7 год	[50]

З наведених даних ми бачимо, що умови культивування всіх серотипів однакові, тож можна орієнтуватись на титр вірусних часточок, які виходять в культуральне середовище. Отже, найвищу продуктивність мав серотип PRV 7.3, який за 7 год після інфікування клітинної лінії SH-SY5Y дозволив одержати lg8,9/мл вірусних часточок, тобто 794328234 вірусних часток в 1 мл. Інші серотипи (IPV та Mahoney) показали нижчу продуктивність: lg8,3/мл та lg5,9/мл (199526231 та 794328 вірусних часток в 1 мл) відповідно.

3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині

Вакцинація проти поліомієліту починається з дитячого віку та проходить у кілька етапів. Згідно з останнім, затвердженим МОЗ календарним планом щеплень,

перша вакцина від поліомієліту вводиться дитині у віці 2-х місяців [51]. Графік щеплень може відрізнятися в залежності від індивідуальних особливостей організму та виду введення вакцини. Дозу №2 щеплення проти поліомієліту дитині вводять у 4 місяці, потім послідовно в 6 і 18 місяців. Щеплення проти поліомієліту після 2 років (ревакцинація): щеплення поліомієліту здійснюється в 6 років і щеплення проти поліомієліту в 14 років. Вважається, що саме така кількість введення вакцини здатна забезпечити формування надійного імунітету проти інфекції у дитини [51].

Згідно з календарем профілактичних щеплень від МОЗ, оптимальний час для введення вакцин:

1 щеплення - 2-й місяць життя дитини (інактивована поліомієлітна вакцина (ІПВ));

2 щеплення - 4-й місяць (інактивована поліомієлітна вакцина (ІПВ));

3 щеплення - 6-й місяць (оральна поліомієлітна вакцина (ОПВ));

4 щеплення - 18-й місяць (оральна поліомієлітна вакцина (ОПВ));

5 щеплення - 6 років (оральна поліомієлітна вакцина (ОПВ));

6 щеплення - 14 років (оральна поліомієлітна вакцина (ОПВ)).

Отже, оральна поліомієлітна вакцина використовується для дітей 6-ти місяців, 18-ти місяців, 6-ти років та 14-ти річних підлітків.

У 2024 році в Україні народилося 176,1 тисяч дітей [52], а в 2023 році народилося на 10708 дітей більше, тобто 187,3 тисяч дітей [53]. В 2019 році було народжено 305 тисяч дітей [54], а в 2010 році – 496,7 тисяч дітей [55]. Отже, загальна кількість дітей буде: $176,1 + 187,3 + 305 + 496,7 = 1165,1$ тисяч дітей. Після воєнної агресії проти України за кордон виїхали понад 2 мільйони українських дітей. Умовно приймемо, що це буде 10 % для років 2019 та 2010, тобто 30,5 тисяч дітей та 49,6 тисяч дітей відповідно. Станом на ранок 26 жовтня 2024 року за офіційною інформацією ювенальних прокурорів 583 дитини загинули [56].

На сьогодні в Україні є лише три живі вакцини проти поліомієліту (табл.2.1).

Характеристика живих вакцин проти поліомієліту

Назва препарату	Тип вірусу	Вид вакцини	Виробник	Посилання
Поліо Сабін™ один і три (оральна) двохвалентна вакцина для профілактики поліомієліту типів 1 та 3 (ДОПВ)	Бівалентна, тип 1: не менше $10^{6,0}$ CCID ₅₀ тип 3: не менше $10^{5,8}$ CCID ₅₀	жива	ГлаксоСмітКляйн Біолоджікалз С.А., Бельгія	[38]
Опверо	Бівалентна, тип 1 типу 3	жива	Санофі Пастер, Франція	[57]
Вакцина для профілактики поліомієліту	Бівалентна, тип 1 тип 3	жива	Санофі Пастер, Франція	[58]

Враховуючи наведені дані, можемо розрахувати кількість дітей, для яких може використовуватись дана вакцина: $1165,1 - 30,5 - 49,6 = 1085$ тисяч дітей.

Одна доза вакцини, згідно інструкції, становить 0,1 мл і містить 10^6 вірусних часточок. Для імунізації всіх дітей необхідно $1085000 \cdot 10^6$ вірусних часточок, або 10^{13} вірусних часточок.

Зважаючи на те, що на ринку України вже представлені три пероральні вакцини проти поліомієліту, ми можемо забезпечувати лише 25 % від загальної потреби, тобто: $10^{13} \cdot 25 / 100 = 25 \cdot 10^{11}$ вірусних часточок.

Обраний нами продуцент PRV 7.3 за 7 год після інфікування клітинної лінії дозволяє одержати $7,9 \cdot 10^8$ вірусних часток в 1 мл. Отже, для заявленої кількості вірусних часточок необхідно: $(25 \cdot 10^{11}) / (7,9 \cdot 10^8) = 3,16 \cdot 10^3$ мл культуральної рідини, або 3,16 л культуральної рідини.

Ми врахуємо, що частина вірусних часточок може втратити життєздатність, а готова вакцина стандартизується по живим часточкам. Умовно приймаємо, що життєздатність втратять 10 % вірусних часточок: $25 \cdot 10^{11} \cdot 10 / 100 = 2,5 \cdot 10^{11}$ вірусних часточок. Отже, необхідно буде отримати: $25 \cdot 10^{11} + 2,5 \cdot 10^{11} = 27,5 \cdot 10^{11}$ вірусних часточок. Отже, для заявленої кількості вірусних часточок необхідно:

$(27,5 \cdot 10^{11}) / (7,9 \cdot 10^8) = 3,48 \cdot 10^3$ мл культуральної рідини, або 3,48 л культуральної рідини.

Враховуючі втрати 40 %, які можуть бути при виділенні та очищення вірусних часточок ми збільшуємо об'єм культуральної рідини: $3,48 \cdot 1,4 = 4,87$ л культуральної рідини необхідно на рік для забезпечення вакцинації 1085 тисяч дітей в Україні.

Також ми врахуємо, що можемо експортувати таку вакцину у кількості 10 % від загального виробництва. Отже, загальна кількість культуральної рідини для потреб України та з врахуванням експорту буде становити: $4,87 \cdot 1,1 = 5,36$ л/р.

Враховуючи те, що вірус вирощується на лінії клітин SH-SY5Y, яка росте на матрацах, ми можемо розрахувати кількість виробничих циклів. Приймаємо, що для рівномірного забезпечення вакциною споживачів та забезпечення життєздатності вакцини, ми будемо виробляти рівні кількості вакцини щомісяця: $5,36 / 12 = 0,45$ л/міс.

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання біотехнологічного продукту

Промислове виробництво вірусів поліомієліту у культурі клітин необхідне для імунотерапії при лікуванні та профілактиці поліомієліту. Одержання такого вірусного матеріалу складний багатоетапний процес, але низькі титри вірусів у серійних культурах і температурна чутливість вірусних частинок обмежують вибір методів для виробництва. Щоб відповідати комерційним і нормативним вимогам, кожен процес повинен бути масштабованим, відтворюваним і повинен давати високі титри вірусу.

Віруси, вирощені в культурі клітинах, можна очистити, кількісно визначити та біохімічно проаналізувати. Чим вища початкова концентрація вірусу, тим легше очистити вірус від залишків клітин і компонентів середовища.

Якщо вірус є цитопатичним, він присутній серед клітинного дебрису і середовища. Суміші вірусу та залишків клітин піддають низькій швидкості ($\sim 5000 \times g$) центрифугування, щоб осадити залишки клітин, але не значно менші віріони. Наприкінці низькошвидкісного центрифугування рідкий супернатант, що містить вірус, зберігається, а осад (що містить залишки клітин) викидається. Відокремлення більших молекул від менших називається диференціальним центрифугуванням [59].

Центрифугування є поширеною технікою, яка використовується для очищення вірусів від залишків клітин та інших малих молекул. Низькошвидкісне центрифугування ($\sim 5000 \times g$) використовується для видалення клітин і великих залишків клітин, залишаючи віріони в супернатанті. Вірус можна додатково очистити та сконцентрувати центрифугуванням на вищих швидкостях. Градієнт сахарози або гліцерину можна використовувати для досягнення подальшого

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Каменська М.В.					41	100
Перевір.		Лич І.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

очищення, оскільки матеріали в зразку будуть розділятися на шари залежно від їхньої плавучої щільності (рис. 4.1).

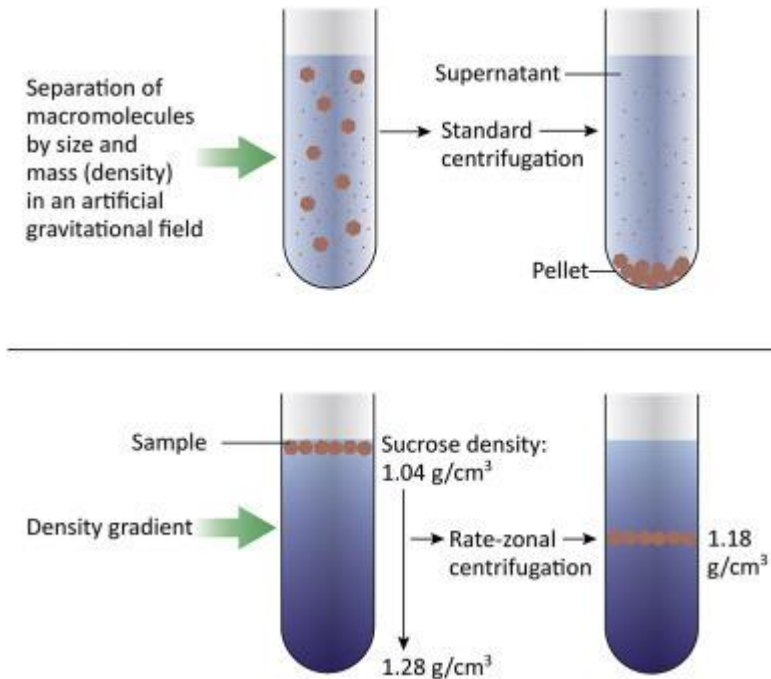


Рис. 4.1. Відділення вірусних часточок центрифугуванням без градієнту та з градієнтом

Після цього супернатант, що містить вірус, можна повторно центрифугувати на набагато вищій швидкості ($\sim 30\,000\text{--}100\,000\times g$), щоб осадити вірус. Після завершення центрифугування супернатант відкидають, а осад вірусу зберігають.

За бажанням вірус можна додатково очистити центрифугуванням у градієнті щільності. Зазвичай використовуються градієнти сахарози та гліцерину; градієнт сахарози може коливатися від 40 % сахарози в нижній частині пробірки до 5% сахарози у верхній частині пробірки. Градієнт готується, а зразок вірусу обережно наноситься зверху. Під час центрифугування компоненти зразка розділяться на шари залежно від їхньої плавучої щільності [60].

Методи розділення на основі градієнта густини використовують різні властивості для досягнення ефективної роздільної здатності. Вибір найбільш відповідного методу є важливим для максимізації як ефективності, так і якості.

Швидкісне зональне центрифугування – це метод, який розділяє частинки головним чином на основі їх розміру та маси, часто представлених їх s-значенням.

У цьому методі центрифугування зупиняється після досягнення бажаного рівня розділення, до того, як частинки досягнуть рівноваги або повної седиментації. Він ідеально підходить для розділення білкових комплексів, таких як різні стани збірки рибосом, від інших білків. Він вимагає попередньо сформованого градієнта щільності, зазвичай виготовленого з сахарози або йодиксанолу, та великої довжини пробігу, щоб частинки могли осідати з різною швидкістю.

Рівноважне зональне центрифугування розділяє частинки на основі їхньої щільності, а не розміру. Градієнт генерується у вигляді дискретних сегментів або шарів, що дозволяє скоротити час центрифугування для розділення зразків з великою різницею в щільності. Цей метод особливо корисний для очищення інтактних вірусних векторів від вільних білків та пошкоджених капсидів за один крок. Він використовує попередньо сформовані градієнти сахарози або йодиксанолу та працює з коротшою довжиною шляху порівняно зі швидкісними зональними методами.

Ізопікнічне центрифугування – це спеціалізована форма рівноважного розділення, яка досягає найвищої роздільної здатності на основі щільності частинок. Воно особливо ефективне для розрізнення повних вірусних частинок, таких як аденоасоційовані віруси, від порожніх або частково заповнених капсидів. На відміну від інших методів, градієнт в ізопікнічному центрифугуванні може бути самоформуючим або попередньо сформованим за допомогою йодиксанолу або хлориду цезію [61].

Різні градієнтні матеріали використовуються для розділення біологічних компонентів на основі їхніх властивостей, таких як плавучість, в'язкість, діапазон густини та осмотична активність.

Багатоатомні спирти, такі як сахароза та гліцерин, універсальні, підтримують розділення клітин, органел, екзосом, вірусів, нуклеїнових кислот та білків. Полісахариди, такі як Фіколл®, ефективні для клітин та органел.

Колоїдний діоксид кремнію (наприклад, Percoll®) може розділяти клітини, органели та певною мірою екзосом та віруси.

Йодовмісні матеріали, такі як Йодіксанол та Нікоденз®, пропонують широке застосування у всіх категоріях.

Неорганічні солі, такі як хлорид цезію (CsCl) та бромід калію (KBr), особливо ефективні для виділення дрібних частинок, таких як екзосоми, віруси, нуклеїнові кислоти та білки [62].

Сахароза, багатоатомний спирт, широко використовується для швидкісно-зонального розділення завдяки своїй нетоксичності та здатності утворювати безперервні градієнти. Вона ефективна для фракціонування органел, білкових комплексів та нуклеїнових кислот за м'яких умов [63].

Йодиксанол, ізоосмотичне неіонне йодоване середовище, пропонує ширше застосування для різних типів клітин та вірусних частинок. Він підтримує як ступінчасті, так і безперервні градієнти та є особливо цінним для очищення AAV-векторів, де ступінчастий градієнт йодиксанолу 15–60% w/v зазвичай використовується для відділення повних капсидів від порожніх з високою точністю [64].

CsCl, самоутворюючий градієнт, використовується у високороздільній ізопікнічній сепарації. CsCl гігроскопічний та утворює дуже стабільні градієнти, що робить його ідеальним для виділення плазмідної ДНК, мітохондріальної ДНК та РНК, а також для розрізнення повних та порожніх вірусних частинок [65]. Незважаючи на високу роздільну здатність, CsCl є гіперосмотичним і може бути шкідливим для біологічної активності, що вимагає ретельного подальшого знесолення або обміну буфера.

Недоліками такого способу є те, що використовуючи градієнт, не можна досягти тонкого розділення різних макромолекул у зразку. Якщо в зразку присутня достатня кількість вірусу, утворюється видима смуга у суміші з білками, яку можна обережно видалити з пробірки.

Вірусні часточки також можна вилучати з середовища за допомогою інтегрованої системи фільтрації. Для забезпечення оптимального режиму фільтрування та виходу продукту частина фільтрату, що вже не містить вірусів, була передана в ємність для кондиціонування з нерухомим шаром. Блок трубчастої фільтрації містив носій з Al_2O_3 , покритий асиметричними шарами ZrO_2 і TiO_2 . Трубчаста мембрана має зовнішній діаметр 25 мм і 19 внутрішніх трубок діаметром 3 мм кожна з граничною молекулярною масою 20 кДа. Фільтрацію проводять при

швидкості потоку 2 л/хв і трансмембранному тиску 0,4 бар. Така комбінація типу мембрани та режиму роботи дозволяла безперервно фільтрувати протягом понад 400 год. Виробництво вірусів було протестовано в пакетному режимі та було підтверджено ефективність установки.

При реалізації такого способу максимальний титр вірусу сягав 10^{10} бляшкоутворюючих одиниць (БУО). Такий результат був досягнутий в режимі перфузії, тоді як максимальний вихід у пакетному режимі становив лише 10^8 БУО. Ймовірно, це відображає більш високу об'ємну пропускну здатність режиму перфузії та низьку стабільність вірусних частинок при температурі виробництва [66].

Відділення вірусу поліомієліту від клітинного дебрису мікрофільтрацією (мембрани 1,2; 0,8; 0,45 і 0,22 мкм) [67].

Розробка безперервного процесу виробництва вірусу поліомієліту є більш складною, оскільки вивільнення вірусу залежить від лізису прикріплених зростаючих клітин. На відміну від пакувальних клітинних ліній, клітини лізують під час виробництва вірусу поліомієліту, що обмежує тривалість циклу виробництва, а також вихід вірусних часточок [68].

Також існує спосіб, при якому відокремлювали вірусні часточки шляхом інкубації протягом 10 хв у PBS, що містить 0,025 % TrypZean і 0,01 % EDTA. Це забезпечило одержувати великі кількості вірусного матеріалу.

Оптимізація температури процесу в різних системах призвела до результатів, які сильно відрізнялись: у статичній системі і в проточній системі найвищі титри вірусу (при збереженні життєздатності) були досягнуті при температурі 20° С, але в невеликих динамічних системах найвищі титри були досягнуті при 25° С. Однак обидві температури призвели до сильної термічної інактивації вірусу, тому необхідний постійний контроль температури при виділенні вірусного матеріалу.

Фільтрація є універсальною через швидке попускання вірусовмісної рідини та затримки вірусних часточок та позбавлення низькомолекулярних сполук на поверхні фільтруючого матеріал. Діапазон розмірів частинок вірусу роблять

періодичну фільтрацію більш доцільною. Найкращим режимом фільтрування був саме періодичний процес. Використовуючи такий метод, можна керувати титрами вірусу до 10^9 середньої інфекційної дози культури тканин (TCID₅₀) з робочого об'єму до 500 мл. Для подальшого очищення живих вірусів поліомієліту і концентрації вірусів обираємо ультрацентрифугування з мембранами 50–300 кДа [69].

Для стерилізуючої фільтрації фармацевтичних препаратів можна застосовувати як об'ємні, так і мембранні фільтри, в якості фінішних фільтрів в даний час використовують майже виключно останні.

Схема стерилізуючої фільтрації зазвичай включає в себе стадію попередньої фільтрації через глибинний фільтр для вилучення великих часток і стадію стерилізації із застосуванням мембранного фільтру. Застосування глибинного фільтру не дозволяє вилучити вірус з фільтру.

Стерилізація розчину вірусу поліомієліту здійснюють стерилізуючою фільтрацією (мембрани 0,22 мкм) [70].

Отже, зважаючи на те, що вірус є літичним для ліній клітин, на яких він вирощується, та відносно невеликі об'єми культуральної рідини, ми пропонуємо використовувати комбінований метод відділення вірусних часточок, а саме:

1. Первинне фільтрування
2. Ультрафільтрація.
3. Промивання на фільтрі.
4. Розчинення.
5. Стерилізуюча фільтрація
6. Розлив у первинну упаковку
7. Закупорювання
8. Заморожування.

4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Об'єм культуральної рідини по закінченню культивування становить 440 мл.

Первинне фільтрування.

Система мікрофільтрації Nerex UF5170NT призначена для очищення біологічних рідин та клітинних суспензій від клітин. Також може виконувати функції як попереднє очищення перед системами ультрафільтрації.

Завдяки системі мікрофільтрації видаляються баластні зважені часточки такі як клітинний дебрис. Використання установки дозволяє збільшити термін придатності мембран в 2-3 рази (в порівнянні з класичними мультимедійними системами фільтрації)

Видаляються:

- Клітинний дебрис до 0,45 мкм
- каламутність і окиснюваність
- більшість найпростіших, грибів, криптоспоридій і бактеріальних флокул
- запобігає утворенню біоплівки на поверхні фільтруючого матеріалу [71].

Ультрафільтрація.

Virosart® CPV [72] призначений для повного і ефективного видалення малих безоболонкових і великих вірусів з оболонкою. Virosart® CPV забезпечує повне вилучення вірусних часточок (рис. 3.2). Повне й ефективне видалення малих безоболочечних і більших вірусів з оболонкою. Видалення вірусів на етапі завершення процесу очищення біофармацевтичної продукту, коли досягнута максимальна ступінь очищення. Забезпечує високу швидкість потоку і пропускну здатність. Забезпечує вилучення вірусу більш ніж на 90%.



Рис. 4.2. Система ультрафільтрування Virosart® CPV

Ультрафільтрація в медичній і біологічній промисловості незамінна при виробництві біологічно активних речовин, вірусів, вакцин, вуглекислоти, ферментів.

В мембранному апараті використовують елементи, що затримують тільки високомолекулярні речовини і альбумін.

У відфільтровану кров надходять необхідні високомолекулярні сполуки і всі низькомолекулярні речовини без особливої зміни концентрації. Вводячи до складу отриманого стерильного розчину відповідних компонентів, отримують кров потрібної консистенції для переливання пацієнту.

Для одержання стерильних рідин мембранні процеси цілком успішно використовуються, також як попередня фільтрація.

Ультрафільтрація є практично досконалою технологією при проведенні аналізів розчинів на вміст бактерій в трубопроводах і аналізів органічних речовин, де можуть розвиватися мікроорганізми.

Розміри пор: 50–300 кДа.

Промивання на фільтрі.

Промивання здійснюється пропусканням через фільтр стерильного фосфатного буфера, що дозволяє вилучити максимально баластні білки. Промивні води передаються на знешкодження.

Ресуспендування.

LR-2.ST the Compact Power [73] - модульно розширюваний лабораторний реактор, призначений для оптимізації та відтворення хімічних реакційних процесів, а також для перемішування, диспергування та гомогенізації в лабораторних масштабах. Відмінною особливістю системи є кріплення мішалки, що дозволяє передавати вищий крутний момент. До вільних роз'ємів кришки реактора можна кріпити гомогенізатори ULTRA-TURRAX®, датчики температури, дільники потоку та інші аксесуари.



Рис. 4.3. LR-2.ST the Compact Power

Фальтрування для видалення баласних макромолекул

Sartopore® 2 [31] (рис.3.4) — стерилізуючі картриджі і капсули призначені для фільтрації широкого спектра фармацевтичних і біотехнологічних розчинів. Мають унікальну гідрофільну гетерогенну подвійну мембрану з поліефірсульфона (БЕЗ). Випускаються капсули, попередньо простерилізовані в автоклаві або γ -випромінюванням.



Рис. 4.4. Система стерилізуючої фільтрації Sartopore® 2

Можлива поставка як стандартних капсул I-style, так і капсул в новому дизайні T-style, що забезпечує легку установку декількох фільтрів в серії або паралельні конфігурації для більшої компактності системи фільтрації і зменшення утримуваного об'єму.

Застосування:

Стерилізуюча фільтрація:

препаратів з високим або низьким рівнем рН (від 1 до 12)

поживних середовищ і буферних розчинів

води для ін'єкцій

високов'язких середовищ, в тому числі офтальмологічних препаратів

біологічних рідин

видалення мікоплазми з сироваток і культур клітин

субстерильная фільтрація (0,1 мкм)

Переваги:

широкий діапазон хімічної сумісності

висока термостійкість

висока пропускна здатність

висока швидкість потоку

Розміри пор:

0,2+0,1 мкм

0,45+0,2 мкм

0,8+0,45 мкм

Конструкції фільтрів:

картриджі 10", 20", 30"

міні-картриджі

капсули SartoScale

капсули MidiCaps

капсули MaxiCaps I-style

капсули MaxiCaps T-style

Комбінація фільтрів: подвійна мембрана з поліефірсульфону з високою механічною і хімічною стійкістю

Регенерація и стерилізація: миття гарячою водою і хімічними засобами в прямотоці. Стерилізація в автоклаві для капсул та картриджів або текучою парою в лінії для картриджів.

Заморожування.

Морозильник медичний низькотемпературний RF-86L28.

Функція контролю температури

Мікрокомп'ютерне керування, цифровий дисплей температури, блок регулювання 0,1°C.

Температура регулюється. Можна встановити різницю температур запуску та вимкнення.

Функція сигналізації високої та низької температури, за потреби можна встановити температуру сигналізації.

Система безпеки

Ідеальна система сигналізації зі звуком зумера та миготінням лампи.

Доступна сигналізація високої та низької температури, функція сигналізації несправності датчика.

Функція захисту від кількох пристроїв (захист від слів, часто захист від запуску. Захист холодильного обладнання від роботи при несправності датчика).

Холодильна система

Надтовстий шар пінопласту, конструкція дверей з подвійним ущільненням, ефективний захист медичного морозильника від перегріву.

Оптимізована автоматична каскадна холодильна система, імпортований компресор відомих брендів для чудової холодопродуктивності.

Розумна конструкція випарника забезпечує найбільш ефективний потік охолоджуючої рідини і рівномірність температури в шафі.

Унікальний змішаний холодоагент, що не містить фторидів, 100% не містить фреонів.

Однокомпресорна система, менша кількість деталей для зниження частоти відмов та зниження енергоспоживання.

Безшумний вентилятор ЕВМ, Німеччина, для стабільної роботи та зниження шуму.

Морозильник медичний низькотемпературний RF-86L28

Діапазон температури охолодження -40°C ~ -86°C

Зовнішні розміри (ШхГхВ мм) 470*493*1120

Внутрішні розміри (ШхГхВ мм) 270*270*400

Внутрішній об'єм 28 л

Потужність 350 Вт

Напруга живлення 220V / 50 Hz

Вага 64 кг

РОЗДІЛ 5

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання на виробництва субстанції вакцини

Позначення	Назва	Характеристика
З-1	Збірник культуральної рідини	Об'єм 1 л. Матеріал: скло. Виробник: Merk
Ф-2	Система мікрофільтрації	Фільтрувальна система Nereх UF5170NT. Напруга, 230-240~В. Частота, 50 Гц Потужність, 3800 Вт. Відповідність EN/IEC 61326-1, class B. Максимальна місткість 4x1000мл/год Вага, 219 кг. Розмір, Ш×Г×В, мм 650x814x973. від -20 °С до +40 °С. Виробник: ANDREAS HETTICH GmbH, Німеччина.
З-3	Проміжний збірник	Об'єм 1 л. Матеріал: скло. Виробник: Merk
Ф-4	Система ультрафільтрації	Virosart® CPV. Розміри пор: 50-300 кДа. Площа фільтруючої поверхні: 5.0 см². Макс. 3.0 bar при 20°С в напрямку фільтрації. Макс. 0.2 bar при 121°С при заглушеному вентиляційному фільтрі. Макс. 0.2 bar при 20°С у зворотньому напрямку. Виробник: Sartorius.
З-5	Збірник промивного буфера	Об'єм 1 л. Матеріал: скло. Виробник: Merk
Р-6	Реактор для ресуспендування	LR-2.ST the Compact Power. Корисний об'єм 500 ... 2 000 мл Робоча температура н.с. ... 230 °С. В'язкість 50 000 мПа·с Діапазон крутного моменту 8 ... 290 об/хв Хід телескопічного штативу 390 мм. Контактні матеріали боросилікат. скло, FFPМ, PTFE, сталь 1.4571. Відкриття реакторних посудин (шт/норма) 3/NS 29/32 2/NS 14/23. Макс. крутний момент на насадці 60 Нсм Вакуум 25 мбар. Робочі умови 5 - 40 °С, вологість до 80% Розміри (мм) 460 x 1240 x 430. Вага 25 кг Країна походження: Німеччина

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Каменська М.В.				РОЗДІЛ 5 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Лич І.В.						53	100
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Ф-7	Система стерилізуючої фільтрації	Sartopore® 2. Капсули SartoScale. Площа фільтрації, 0,0017 м². Конектори капсул SartoScale Тип конектора F: Санітарний фланець ¾ дюйма, 25 мм Тип конектора L Охоплююча частина роз'єму Люера. Виробник: Sartorius.
З-8	Збірник напівпродукту	Флакони пластиковий. Горловина 24/410 Вага 22 г Колір Прозорий Флакони об'ємом 200 мл виготовлений із поліетилентерефталату (ПЕТ). Пляшечка у формі циліндра дуже лаконічна та ідеально поєднується з різними типами кришок. Матеріал флакона стійкий до жирів, кислот та вологи. Розміри вказані крайніх точок: Висота - 147,5 мм Діаметр - 47,5 мм Глибина - 132 мм Висота Під етикетку - 126 мм
Х-9	Холодильник	Морозильник медичний низькотемпературний RF-86L28. Діапазон температури охолодження -40°C ~ -86°C Зовнішні розміри (ШхГхВ мм) 470*493*1120 Внутрішні розміри (ШхГхВ мм) 270*270*400 Внутрішній об'єм 28 л Потужність 350 Вт Напруга живлення 220V / 50 Hz Вага 64 кг

РОЗДІЛ 6

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ

ДР 1. Приготування промивного буферу

До 800 мл дистильованої води у колбі об'ємом 2000 мл додають до розчину 20,214 г двоосновного гептагідрату фосфату натрію. Додають до розчину 3,394 г одноосновного моногідрату фосфату натрію. Додають дистильовану воду до об'єму 1 л. Фосфатний буфер рН 8,0.

Автоклаувати за температури 121°C протягом 15 хв та зберігати при кімнатній температурі.

ДР 2. Одержання вірусних часток

ТП 2.1. Мікрофільтрація

Одержані змиви з матраців, де здійснювали культивування вірусу поліомієліту, піддають фільтруванню з метою видалення клітинного дебрису. Для цього в збірник з сумішшю занурюють сіліконовий шланг з внутрішнім діаметром 5 мм. Система фільтрування обладнана перистальтичним насосом, який дозволяє прокачувати суміш через фільтруючі елементи. Тиск в системі фільтрування підтримується на рівні 1,0 bar при 20° С.

Фільтрат передається на наступну стадію.

Осад з фільтрів передається на знешкодження.

ТП 2.2. Ультрафільтрація

Одержаний фільтрат за допомогою насоса потрапляє на установку ультрафільтрації. Фільтрат містить низькомолекулярні компоненти та фрагменти білків. Система ультрафільтрації створює тиск в насиченій зоні (вода + домішки), в результаті чого низькомолекулярні сполуки просочуються через напівпроникну мембрану в зону ненасиченого розчину (чиста вода). Розмір пор 50-300 кДа.

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Каменська М.В.					55	100
Перевір.		Лич І.В.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Фільтрат передається на знешкодження.

ТП 2.3. Промивання вірусних часточок

По закінченню ультрафільтрування вірусні часточки, які затримались на фільтруючому елементі, промиваються фосфатним буфером.

Для цього замінюють сіліконовий шланг та занурюють його у ємність з буферним розчином. Тиск в системі фільтрування підтримується на рівні 1,0 bar при 20° С. Співвідношення промивного буфера та суміші градієнтного розчину та вірусних часточок 10/1.

По закінченню промивання вірусні часточки вимиваються з фільтруючого елементу зворотною подачею буферного розчину. Тиск в системі фільтрування підтримується на рівні 1,0 bar при 20° С. Кінцевий об'єм суміші не повинен перевищувати 500 мл. Ступінь вимивання вірусних часточок повинен бути не нижче 98 %.

Суміш вірусних часточок подається на стадію ресуспендування.

ТП 2.4. Ресуспендування вірусних часточок

Суміш вірусних часточок з попередньої стадії переноситься у реактор для ресуспендування. Ресуспендування здійснюється при температурі 30° С та швидкості обертів мішалки 20 об/хв. Тривалість процесу – 40 хв.

Проведення ресуспендування за таких параметрів дозволить одержати суспензію вірусних часточок, які не склеюються між собою.

ТП 3. Одержання напівпродукту

ТП 3.1. Стерилізуюча фільтрація

Фільтр для стерилізуючої фільтрації готується шляхом промивання стерильною водою. Стерилізуюча фільтрація використовується для очищення розчину від частинок розміром, які більше 0,22 мкм.

Одержана вірусна суспензія з попередньої стадії пропускається через фільтраційну систему, яка містить фільтри з діаметром пор 0,22 мкм. Система стерилізуючого фільтрування обладнана перистальтичним насосом, який дозволяє

прокачувати суміш через фільтруючі елементи. Тиск в системі фільтрування підтримується на рівні 2,0 bar при 20° С.

Використані фільтрувальні елементи відправляються на стадію знешкодження відходів.

ТП 3.2. Наповнення флаконів

Отриманий в асептичних умовах напівпродукт, дозуючи по 100-110 мл в пластикові флакони.

Флакони отримують з лабораторії. Попередньо флакони простерилізовані та закриті фольгою. Флакони стерилізуються в автоклаві при $P=0,1$ МПа, 40 хв

Гумові корки отримують з лабораторії. Попередньо гумові корки замотані у фольгу та упаковочний папір. Гумові корки стерилізуються в автоклаві при $P=0,1$ МПа, 40 хв.

Під час процесу фасування важливий контроль об'єму наповнення, який повинен залишатися в межах 100-110 мл. Процес фасування виконується в приміщенні з класом чистоти В.

Після наповнення умовах асептики флакони герметично закриваються стерильними гумовими пробками та замотують плівкою Parafilm. Закупорені флакони маркують за допомогою статусної етикетки «Карантин», згідно СОП. Після цього флакони передають на заморожування та подальше зберігання.

ТП 3.3. Заморожування напівпродукту

Флакони поміщують в морозильну камеру холодильника, де вони зберігаються за температури -40° С.

Продукцію, яка отримала позитивні результати аналізу ВКЯ, перевозять або переміщують у відділ пакування для подальшого процесу пакування

РОЗДІЛ 7

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

7.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу та кількості серій на рік

Одна доза вакцини, згідно інструкції, становить 0,1 мл.

Для рівномірного забезпечення вакциною споживачів та забезпечення життєздатності вакцини, ми будемо виробляти рівні кількості вакцини щомісяця:
 $5,36/12=0,45$ л/міс.

Один флакон містить 1 мл (10 доз).

Отже, ми можемо розрахувати кількість флаконів, які ми отримаємо за серію:

$$X=1*0,45*1000=450 \text{ флаконів за серію.}$$

Загальна кількість культуральної рідини для потреб України та з врахуванням експорту буде становити: $4,87*1,1=5,36$ л/р.

Кількість флаконів на рік буде:

$$X=1*5,36*1000=5360 \text{ флаконів на рік.}$$

7.2. Обґрунтування умов забезпечення виготовлення лікарського засобу

Виробничі приміщення необхідно проектувати, розташовувати, пристосовувати, оснащувати, утримувати та обслуговувати таким чином, щоб вони відповідали своєму призначенню, забезпечували можливість проведення ефективного прибирання й експлуатації з метою виключення мікробної і перехресної контамінації, а також інших факторів, які можуть негативно вплинути на якість продукції. Приміщення слід розташовувати відповідно до послідовності технологічного процесу і класів чистоти.

Не допускається примикання приміщень класів чистоти А, В, С, D до зовнішніх огорожувальних конструкцій. Приміщення більш високого класу

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Каменська М.В.						
Перевір.		Лич І.В.					58	100
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

чистоти необхідно розташовувати усередині приміщень більш низького класу. Чисті зони слід проектувати так, щоб була відсутня необхідність входу в них спостерігача або контролюючого персоналу [74].

7.2. Обґрунтування умов забезпечення виготовлення лікарського засобу

Обґрунтування вибору підготовки повітря для класів чистоти

Одним з найважливіших факторів забезпечення чистоти в чистих приміщеннях, де відбувається виробництво лікарських засобів є очищення великих обсягів вентиляційного повітря відповідно до технологічних особливостей процесів, які проводяться у цих приміщеннях. Необхідний ефект досягається застосуванням декількох ступенів очищення. Для обґрунтування вибору способу очищення потрібен аналіз механізмів способів очищення [75].

У «чистих» приміщеннях повинний створюватися ламінарний потік. Системи ламінарного повітряного потоку повинні забезпечувати рівномірну швидкість руху повітря: близько 0,30 м/с для вертикального і близько 0,45 м/с для горизонтального потоків. Підготовка і контроль повітря на механічні включення і мікробіологічне забруднення, а також оцінка ефективності роботи повітряних фільтрів повинна проводитися відповідно до нормативно-технічної документації. Для забезпечення необхідної чистоти повітря в системах «вертикальний ламінарний потік» і «горизонтальний ламінарний потік» застосовують фільтруючі установки, що складаються з фільтрів попередньої грубої очистки повітря – вентилятора і фільтра, що стерилізує.

Для остаточного очищення повітря від часток, що утримуються в ньому, і мікрофлори застосовують фільтр типу ЛАИК. Як фільтруючий матеріал у ньому використовується ультратонке волокно з перхлорвінілової смоли. Цей матеріал гідрофобний, стійкий до хімічно агресивних середовищ і може експлуатуватися при температурі не вище 60 °С і відносній вологості до 100 %. Останнім часом широке поширення одержали вискоєфективні повітряні фільтри HEPA (High-efficiency particulate air).

Індивідуальні фільтри заповнені надтонким волокном або мембранами, що забезпечують видалення решти 2 % контамінантів. В якості індивідуального фільтра обираємо фільтр типу НЕРА Е14 [76].

Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра [77].

Обґрунтування вибору підготовки води

Для отримання води очищеної використовують вугільні фільтри, які видаляють активний хлор, здійснюється пом'якшення води для видалення небажаних мінеральних забруднень за допомогою використання методу осадження на піщаних фільтрах.

Спосіб осадження полягає в переведенні іонів кальцію і магнію в малорозчинні з'єднання шляхом додавання до води розчинів розрахованих кількостей гідрату окису кальцію, їдкого натрію, кристалічного карбонату натрію та інше. Після декількох часів взаємодії сполук, що утворюють накип з вказаними реаكتивами утворюються осади, що потім видаляються відстоюванням або фільтруванням. Для фільтрування можливе використання піщаних фільтрів.

Для отримання знесоленої води використовують найефективніший спосіб мембранної фільтрації, який оснований на процесі зворотного осмосу – це перехід розчинника (води) з розчину через напівпроникну мембрану під дією зовнішнього тиску. Надлишковий робочий тиск сольового розчину набагато більше осмотичного. Рушійною силою зворотного осмосу називають різницю тиску по обидві сторони мембрани. Зворотноосмотична мембрана діє як бар'єр для всіх розчинених солей, неорганічних молекул, органічних молекул з молекулярною масою понад 100, а також мікроорганізмів і пірогенних речовин.

Серед переваг установки зворотного осмосу слід зазначити простоту і незалежність від вмісту солі у вихідній воді. При здійсненні осмотичного процесу проблему представляє вибір мембран, що володіють відповідною однорідністю.

Найбільш поширеним методом отримання води очищеної і води для ін'єкцій є дистиляція, тобто процес випаровування з подальшою конденсацією

пари. При цьому відбувається фазове перетворення рідини на пару, а потім знову в рідину при конденсації. Для цього використовують питну або знесолену воду.

Термін використання води для ін'єкцій регламентується 24 годинами з моменту отримання, за умови її збереження в асептичних умовах. При тривалішому зберіганні вода поглинає з повітря вуглецю діоксид і кисень, може взаємодіяти з матеріалом ємності, викликаючи перехід іонів важких металів, і є середовищем для розмноження мікроорганізмів. Тому перевага віддається використанню свіжоприготованої води, яку іноді безпосередньо після дистиляції додатково кип'ятять протягом 30 хвилин [78].

Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки та обладнання

При використанні нестерильної первинної упаковки потрібно провести ряд технологічних операцій для отримання стерильної тари, так як отримання, контроль та підтримка стерильної тари в належному стані потребує великих коштів, тому потрібно на всіх стадіях технологічного процесу, включаючи стадії, що передують стерилізації, вживати заходи, що можуть запобігти контамінації процесу, тобто підготовку (стерильної) тари, а саме, ковпачків для закатки флаконів, гумових пробок та стерильних флаконів відповідно до вимог нормативно-технічної документації (НТД) [79].

Обґрунтування вибору флаконів

Основні вимоги до медичного скла зводяться до того, щоб воно не взаємодіяло з препаратом, який в ньому знаходиться. У тих випадках, коли вироби проходять термічну обробку на пальнику або стерилізується в стерилізаційному тунелі, вибирають скло, що володіє малою схильністю до кристалізації. Медичні вироби виробляють переважно з нейтрального скла (марок НС-1 і НС-2), з лужного скла (марок НБ-1, МТ і ОС) і зі світлозахисного помаранчевого скла.

Скло марок НС-1 і НС-2 відносять до класу нейтрального скла та застосовується безпосередньо для виготовлення ампул та флаконів. Воно має високу стійкість до стерилізації паром в автоклаві при тиску 0,2-0,3 кПа.

Отже, найбільш практичним для виготовлення флаконів, в яких міститься вакцина проти поліомієліту, є марка скла НС-2, так як воно має високу стійкість до стерилізації паром в автоклаві при високих температурах, а також виготовлене з нейтральної сировини, є більш стійким до механічних пошкоджень і дешевше ніж скло марки НС-1 [79].

Миття флаконів є однією з відповідальних стадій виробництва. Вона складається з зовнішнього та внутрішнього миття флаконів.

При виробництві вакцини поліомієлітної живої, потрібно використовувати флакони, які є добре вимитими, не містять механічних залишків скла або інших сторонніх речовин, промиті як із зовнішньої так і внутрішньої сторони.

Вакуумний спосіб є малоефективним, тому що після такого миття флаконів всередині флакону залишаються залишки скла і одного ламінарного потоку води для омивання внутрішньої поверхні флакону не є достатнім для забезпечення чистоти флакону.

Термічний спосіб миття не варто використовувати тому, що він є енергозатратний та використовується безпосередньо після вакуумного способу миття флаконів, що також збільшує витрати електроенергії при поєднанні цих двох способів миття.

При ультразвуковому способі флакони піддаються миттю під дією ультразвукових коливань, флакон безпосередньо занурюється в очищену воду при ввімкненому неподалік магнітострикційному випромінювачу і таким чином зовнішня поверхня флакону омивається з двох сторін [80].

Обґрунтування вибору гумових пробок

Для забезпечення стерильності та якісного зберігання вакцини поліомієлітної живої потрібно обов'язково закупорювати флакони гумовими пробками. **Гумові пробки**, що застосовуються для закупорювання флаконів, виготовляються із спеціальних сортів гуми, які не містять розчинних домішок і не мають запаху. Для закупорювання більшості флаконів використовуються пробки з гуми марки ІР-51(сірого кольору) на основі натурального каучуку, ІР-21(бежевого кольору), (на основі бутилового каучуку).

Пробки марки IP-51 володіють хорошими хімічними і гігієнічними властивостями і забезпечують стабільність при зберіганні, мають низьку твердість і підвищену еластичністю і, завдяки цьому, не вимагають великих зусиль при закупорюванні. Дані пробки є сумісними з лікарськими засобами, для якого вони використовуються, протягом всього затвердженого періоду зберігання і використання [81].

Нестерильну первинну упаковку потрібно якісно підготувати для того, аби використати для виробництва вакцини поліомієлітної живої, щоб забезпечити відмінну якість товару та якість самої вакцини. Гумові пробки проходять такий технологічний процес перш ніж потрапляють на закупорювання: миття, ополіскування, силіконування та стерилізація. Для такого процесу можна використати 4 автоматичні машини але це не є економічно вигідно і така кількість обладнання буде займати велику площу. Тому для підготовки первинної упаковки в даному випадку гумових пробок було обрано машину в якій здійснюється весь процес підготовки пробок.

Обрано машину DGM KJCS, швейцарської компанії DGM PHARMA APPARATE HANDEL AG, яка виконує мийку пробок ополіскування, силіконування і стерилізацію. За своїми технічними характеристиками обладнання відповідає нормативним вимогам, що пред'являються до обладнання даного класу.

Гумові пробки спільно з миючими препаратами завантажуються в робочий барабан машини зі сторони підготовчого відділення. Весь цикл підготовки пробок до використання відбувається в автоматичному режимі, поточні дані по фактично виконуваних операції, а також температурні режими роботи машини відображаються на операторській НМІ-панелі. Вивантаження пробок здійснюється з боку чистого приміщення [82].

Обґрунтування вибору марки алюмінієвих ковпачків

Ковпачки алюмінієві КП-2-20 використовуються у фармацевтичному виробництві та призначені для фіксації гумових пробок для флаконів. Фірма виробник ВПС-МЕД.

Ковпачки алюмінієві КП-2-20 виготовляються відповідно до ТУ 9467-004-39798422-2004. Металева основа ковпачка виготовлена з алюмінієвої фольги завтовшки 0,2 мм [83].

Обґрунтування вибору машини для миття флаконів.

Для миття флаконів потрібно використати таку машину, в якій буде поєднано 2 способи миття флаконів.

Запропонована машина для миття флаконів це мийна машина DGM CLQ (Швейцарія) у якій поєднані два типи миття флаконів, а саме шприцеве та ультразвукове миття.

Флакони з направляючого лотка шнековим транспортером подаються в закріплені на поворотному столі носії, в яких вони транспортуються по всіх стадіях технологічного процесу. Попереднє миття флаконів здійснюється з використанням ультразвукового генератора. Внутрішня мийка проводиться шприцевим методом очищеною водою. Подальше ополіскування проводиться ін'єкційною водою [84].

Переваги:

- ✓ Робочі поверхні виготовлені з високоякісної сталі AISI 316L;
- ✓ Простота переналагодження на інший розмір флакона;
- ✓ Оптимізація витрат води;
- ✓ Відповідає вимогам GMP.

Обґрунтування вибору стерилізатора тунельного типу для скляних флаконів.

Для виробництва вакцини проти поліомієліту, необхідно якісно підготувати нестерильну первинну упаковку. Для того аби стерильний суспензія потрапила безпосередньо у підготовлений стерильний флакон, цей флакон потрібно заздалегідь простерилізувати, тому необхідно використати апарат у якому флакони пройдуть такі стадії стерилізації: нагрів, стерилізація та охолодження флаконів, лише після такої стерилізації отримуються флакони, які придатні до

подальшого наповнення. Для такого процесу необхідно використати апарат у якому відбуваються послідовно ці всі стадії.

В даному дипломному проекті обрано такий апарат як DGM SH-B стерилізаційний тунель.

Він призначений для стерилізації скляних флаконів ємністю від 5 до 20 мл. В безперервному режимі. Використовується в складі автоматичної лінії. Флакони в тунелі переміщуються за допомогою сітчастого транспортера. Вони проходять три технологічні зони. У першій зоні відбувається попередній нагрів флаконів, у другій зоні – стерилізація, в третій – охолодження. Температура гарячого повітря автоматично регулюється і реєструється, що гарантує надійність процесу стерилізації [85].

Обґрунтування вибору автомату для розливу та передзакупорювання.

Для розливу стерильної суспензії у стерильні потрібно обрати автомат, який буде дозувати ту кількість суспензії, яка потрібна для дотримання умови, що у одному флаконі знаходиться одна доза вакцини. Для такого наповнення найкраще підходить шприцевий спосіб наповнення флаконів, оскільки при такому способі наповнення є можливість контролювати точність апарату, точно контролювати точну кількість суспензії, який потрапляє у флакон. Якщо використовувати вакуумний спосіб наповнення, то ефективність такого апарату буде значно нижчою тому, що точність дозування зменшується за рахунок виливання певної кількості рідини із флаконів при їхньому перевертанні. Далі безпосередньо в цьому ж апараті відбувається передзакупорювання флакону гумовою кришкою.

В даному проекті обрано машину автоматичної лінії наповнення та закупорювання флаконів гумовими пробками ЛНЗ-М фірма ВПС-МЕД.

Дозволяє створити високоефективне виробництво з дотриманням вимог належної виробничої практики (GMP), скоротити трудовитрати на операціях розливу і закупорювання, зменшити кількість обслуговуючого персоналу до 1-2 чоловік, випускати за зміну до 40000 флаконів [86].

Обґрунтування вибору машини для закупорки флаконів.

Після ліофільного висушування флакони, які ще не повністю закупорені гумовою пробкою та не обкатані алюмінієвим ковпачком, повинні пройти стадію повного закупорювання флакону та обкатування. Для цього використовується автомат ПЗР-М. Апарат закупорювання служить для закупорювання флаконів алюмінієвими ковпачками марки КП-2-20 після ліофільного висушування. Автомат може використовуватися в фармацевтичній, мікробіологічній та біотехнологічній промисловості. Автоматичний апарат складається з системи подачі флаконів, закупорених пробкою на поворотний стіл з касетами розміром 400x300x34 мм, механізму подачі і зйомку ковпачка марки КП-2-20, систему зірочки з ротором, включаючи шість трьохголовкових закупорювальних головок і системи прийому флаконів на лоток розміром 450x150x50 на виході. При відсутності необхідної кількості флаконів на поворотному столі автомат видає попереджувальний сигнал і зупиняється через встановлений проміжок часу. При відсутності ковпачків в спусковій магістралі механізму подачі ковпачків відбувається аналогічна зупинка машини. При переповненні вихідного лотка відбувається автоматична зупинка. Продуктивність автомата регулюється з пульта управління [87].

Обґрунтування вибору маркування флаконів.

Для нанесення маркування можна використовувати етикетки-самоклейки або фарбу. Фарба не є ефективним способом маркування флаконів, адже впродовж певного періоду часу вона може змиватися. Тому доцільно використовувати етикетки-самоклейки. Для цього пропонується використання автоматичної установки з нанесення самоклеючих етикеток на флакони фірми ВПС-МЕД.

Флакони подаються по конвеєру на позицію наклеювання етикеток. При підході флакона в зону наклеювання етикеток подається сигнал датчика на спрацювання аплікатора і подачу етикетки. Аплікатор забезпечує подачу етикетки і видалення захисної стрічки. Далі при проході з обертанням флакона з нанесеною етикеткою між губкою і механізмом вертикальної обкатки відбувається обтиск і наклеювання етикетки на флакон. Конструктивно передбачені можливості настройки механізмів установки на різні розміри етикеток і діаметри флаконів, а

також можливість зміни і синхронізації швидкостей подачі флаконів і етикеток [88].

Обґрунтування вибору апарату пакування флаконів у коробки.

Автомат для пакування в пластикові коробки Ecopocorp Pegasus (США). Це апарат в якому відбувається автоматична упаковка в пластмасову коробку флаконів. Використовується у фармацевтичній, косметичній, парфумерної та інших галузях промисловості [89, 90].

7.3. Специфікація обладнання

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання на виробництва вакцини

Позиція	Позначення	Найменування	Кількість	Примітка
ГФ-1	DGMDQ	Машина мийки, ополіскування та сушки алюмінієвих ковпачків, (Швейцарія).	1	Н/сталь. Потужність кВт 10. Габаритні розміри (ШхДхВ) мм 2000х1650х2050
ГФ-2	DGM KJCS	Машина мийки пробок, силіконування та стерилізації, (Швейцарія).	1	Н/сталь. Потужність кВт 22. Габаритні розміри (ШхДхВ) мм 2050х1650х1950
ГФ-3	DGM CLQ	Шприцево-ультразвукова мийна машина для миття флаконів, (Швейцарія)	1	Н/сталь. Потужність 12,5 кВт. Габаритні розміри (ШхДхВ) 2440х2600х1300
ГФ-4	DGM SH-B	Стерилізаційний тунель для стерилізації флаконів, (Швейцарія)	1	Н/сталь. Потужність кВт 30. Габаритні розміри (ШхДхВ) мм 1600х4500х2200
З-5	Збірник для суспензії	Вертикальний, З нижнім зливом	1	Н/сталь, Місткість – 5 л
Ф-6	Фільтр	Фільтр для фільтрації супернатанту з ацетат целюлози типу МФА з діаметром пор 0,22 – 0,45 мкм.	1	Циліндричний корпус. Діаметр 120мм; висота 250мм. Продуктивність фільтра 3 м ³ /год. Фільтрувальний матеріал фторопласт ТУ 84-835-79
ГФ-7	ЛНЗ-М	Автоматичної лінії наповнення та передукупорювання флаконів гумовими пробками фірма.	1	Н/сталь
ГФ-8	ПЗР- М	Автоматичний апарат закупорювання флаконів алюмінієвими ковпачками.	1	Н/сталь. Потужність кВт 22. Габаритні розміри: 1600х1200х1800.
ГФ-9	-	Автоматична установка нанесення самоклеючих етикеток на флакони фірми ВПС-МЕД.	1	Н/сталь. Потужність 0,4 кВт/год. Габаритні розміри: 900х2500х1420
ГФ-10	Ecopocorp Pegasus	<u>Автомат для пакування в картонні коробки</u> (США)	1	Н/сталь

7.4. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу

ДР 1. Підготовка первинної упаковки

ДР 1.1. Підготовка алюмінієвих ковпачків

ДР 1.1.1. Перегляд алюмінієвих ковпачків

Перегляд алюмінієвих ковпачків здійснюється візуально на спеціальному обладнанні для візуального контролю, які обладнані лампами денного освітлення. Відбракуванню підлягають ковпачки с порушеною формою, забруднені, темні чи в плямах, що мають ум'ятини, чи зрізи інші дефекти. Відбраковані ковпачки йдуть на знешкодження твердих відходів.

ДР 1.1.2. Миття алюмінієвих ковпачків. Миття ковпачків відбувається в машині для миття алюмінієвих ковпачків (ГФ-1), там розчиняють пральний порошок «Tide» у воді очищеній до концентрації 1,0-1,2%, миття проводять при температурі (80+/-10) °C протягом 15-20 хвилин.

ДР 1.1.3. Ополіскування алюмінієвих ковпачків

Ополіскування ковпачків відбувається в мийній машині (ГФ-1) водою ін'єкційною при температурі (50+/-10) °C протягом 30 хвилин (допускається трьохразове ополіскування по 10 хвилини кожне).

ДР 1.1.4. Стерилізація алюмінієвих ковпачків

Стерилізацію ковпачків проводять в автоматичній машині (ГФ-1) при надлишковому тиску 0,2 МПа та температурі (120+/-1) °C протягом 45 хвилин. Утворений конденсат надходить на знешкодження відходів.

ДР 1.1.5. Зберігання алюмінієвих ковпачків

Вивантаження стерильних ковпачків відбувається під ламінаром в стерильні ємності з кришками. Стерильні ковпачки зберігають не більше 24 год при температурі 18 °C.

ДР 1.2. Підготовка гумових пробок

ДР 1.2.1. Перегляд гумових пробок

Перегляд пробок здійснюється візуально на спеціальних столах, обладнаних лампами денного освітлення.

Спочатку здійснюється візуальний огляд гумових пробок з метою вилучення механічно пошкоджених пробок. Відбракуванню підлягають пробки, які мають відхилення у зовнішньому вигляді відповідно до вимог, які діють нормативно-технічної документації. Відбраковані пробки йдуть на знешкодження твердих відходів.

ДР 1.2.2. Миття гумових пробок

Миття гумових пробок проводять у мийній машині (ГФ-2), там розчиняють пральний порошок «Tide» у воді очищеній до концентрації 1,0-1,2%, миття проводять при температурі (80+/-10) °C протягом 15-20 хвилин. Вода очищена надходить від, а потім відпрацьована вода направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.2.3. Ополіскування гумових пробок

Ополіскування відбувається в мийній машині (ГФ-2) водою ін'єкційною при температурі (50+/-10)°C протягом 30 хвилин (допускається чотирьох разове ополіскування). Вода ін'єкційна надходить від, а потім відпрацьована вода направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.2.4. Силіконування гумових пробок

Силіконування пробок проводять в машині (ГФ-2) силіконовою емульсією ПМС-400 при температурі (50+/-10) °C протягом 20-30 хвилин. Залишки емульсії відправляються на знешкодження відходів.

ДР 1.2.5. Сушіння гумових пробок

Сушіння пробок проводять очищеним гарячим повітрям, в апараті (ГФ-2) пробки сушать при температурі 80 °C протягом 3 год.

ДР 1.2.6. Стерилізація гумових пробок

Стерилізацію пробок проводять у машині для миття, ополіскування, сушіння та стерилізації (ГФ-2) при надлишковому тиску 0,2 МПа та температурі (120+/-1) °C протягом 45 хвилин. Утворений конденсат направляють на стадію знешкодження відходів.

ДР 1.2.7. Зберігання гумових пробок

Вивантаження стерильних гумових пробок проводять під ламінаром у спеціальні стерильні ємності із кришками. Стерильні гумові пробки зберігають не більше 1 доби при температурі 18 °С.

ДР 1.3. Підготовка флаконів

Флакони подаються зі складу на піддонах обгорнені термолабільною плівкою в заводському упакованні.

ДР 1.3.1. Перегляд флаконів

Перегляд флаконів здійснюється візуально, на спеціальних столах, які обладнані лампами денного освітлення. Відбракуванню підлягають флакони, які мають відхилення в зовнішньому вигляді відповідно до вимог діючої нормативно-технологічної документації. Відбраковані флакони надходять до знешкодження твердих відходів.

ДР 1.3.2. Миття та ополіскування флаконів

Мийка флаконів здійснюється мийною машиною (ГФ-3), у якій поєднано 2 способи миття шприцевий та ультразвуковий.

Рекомендовані умови миття:

- ✓ тиск води - 0,2-0,25 МПа
- ✓ температура води - (50-60) °С
- ✓ тиск пари - 0,15-0,3 МПа
- ✓ тиск повітря - 0,03-0,05 МПа
- ✓ час миття 30 хв

Ополіскування флаконів слід проводити водою для ін'єкцій.

Флакони послідовно проходять 13 стадій внутрішньої і зовнішньої мийки і продувки стиснутим очищеним повітрям. Потім захоплюють та перевертають флакони і вивантажують їх на прийомний транспортер стерилізаційного тунелю. Вода ін'єкційна та очищена надходить від, а потім відпрацьована вода направляється на стадію знешкодження рідких відходів.

ДР 1.3.3. Стерилізація флаконів

В стерилізаційному тунелі (ГФ-4) флакони проходять три зони: нагрівання до температури стерилізації, витримка при цій температурі протягом заданого часу та охолодження. В усі зони тунелю подається профільтроване через фільтр тонкого очищення очищене повітря в ламінарному потоці. В зоні стерилізації температура стерильного повітря підтримується в межах 300 – 320 °С, флакони стерилізуються упродовж 10 хвилин, після чого флакони охолоджують до температури 20 °С. Після чого флакони відразу передаються на наповнення.

ТП 2. Підготування розчину.

При виробництві вакцини антирабічної, готовий супернатант постачають компанії у яких відбувається закупка даного препарату, тому необхідно провести підготовку супернатанту до наповнення флаконів. Для того, щоб уникнути потрапляння патогену до вакцини, розчин супернатанту потрібно простерилізувати.

ТП 2.1. Стерилізуюча фільтрація.

Розчин заливають у збірник (З-5) з якого через фільтр (Ф-6) діаметр пор якого 0,45 мкм подають у стерильний збірник. Технологічний процес проводять у приміщенні класу чистоти С.

ТП 3. Наповнення флаконів

ТП 3.1. Дозування суспензії у флакони

Підготовлену суспензію розливають у флакони ємністю 5 мл по 1 мл за допомогою автоматичної лінії наповнення (ГФ-7).

ТП 3.2. Предуупорка флаконів пробками

Флакони з висушеним продуктом обкатують алюмінієвими ковпачками за допомогою спеціальних автоматичних машин для закатування флаконів (ГФ-8).

ТП 3.3. Закатування флаконів алюмінієвими ковпачками

Флакони з висушеним продуктом обкатують алюмінієвими ковпачками за допомогою спеціальних автоматичних машин для закатування флаконів (ГФ-8).

ПМВ 4. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 4.1 Маркування флаконів

Маркування флаконів складається з двох стадій:

- ✓ нанесення номера серії і терміну придатності на паперову етикетку.
- ✓ наклеювання етикеток на флакони.

Маркірування флаконів здійснюється шляхом наклеювання на флакони етикеток, при цьому етикетки відокремлюються від основи, наклеюються і придавлюються по всій поверхні етикетки до флакона за допомогою автоматичної установки (ГФ-9) нанесення самоклеючих етикеток на флакони.

На етикетці флакона українською чи іншою мовою відзначають фірму виробника, назва препарату, вміст вакцини проти поліомієліту у флаконі в грамах, «Стерильно», «Перорально», «Застосовувати за призначенням лікаря», умови збереження, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності.

ПМВ 4.2. Упаковка флаконів у коробки

Упакування флаконів здійснюється за допомогою спеціальної пакувальної машини (ГФ-10) разом з 1 інструкцією по застосуванню в пластикову коробку на якій зазначено таку інформацію українською чи іншою мовами «Україна», назву фірми-виробника, її товарний знак і адреса, назва препарату на латинській й українській чи латинській, українській та інших мовах, вміст вакцини проти поліомієліту у флаконі, «Стерильно», «Перорально», «Застосовувати за призначенням лікаря», «Зберігати в недоступному для дітей місці», умови збереження, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності, кількість флаконів і штрихової код.

ПМВ 4.2.1. Упаковка флаконів у групову тару.

Упакування флаконів відбувається вручну на столі для упакування у коробки.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Контроль субстанції

Контроль здійснюється для кожної партії напівпродукту (*in bulk*) та готового продукту.

Продуктом є вакцина поліомієлітна жива.

Для кожної партії напівпродукту та готового продукту методи контролю є однакові.

Продуктом є вакцина поліомієлітна жива.

Опис.

Прозора рідина від жовтуватого-червоного до рожево-багряного кольору, без осаду, без видимих чужорідних включень. Метод визначення — візуальний.

Автентичність.

Вакцина має бути специфічною за типом і містити ослаблений штам Sabin типу 2. Визначення проводиться в реакції на нейтралізацію цитопатогенної активності вакцини з відповідною гомотиповою діагностичною сироваткою ентеровірусу типу 2 у культурі гепатиту 2 клітин Цинциннаті паралельно зі стандартним зразком (СЗ). Робоче розведення гомотипової сироватки типу 2 має зменшити титр вірусу щонайменше на 2 lg (щонайменше у 100 разів).

Підготовка клітинної культури проводиться за методом, описаним у розділі «Специфічна активність». Титрування проводиться в панелях клітинної культури на 96 свердловин компанії «Costar» або виготовлених іншими компаніями подібної якості.

Розбавлення вакцини та СЗ готуються на поживному середовищі IGLA MEM, що містить 2% крові плодів корів з множинністю 1:5.

0,05 мл вибраного розведення вакцини або СЗ та 0,05 мл робочого

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ									
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА					Літ.	Арк.	Акрушів		
Розроб.		Каменська М.В.											74	100
Перевір.		Лич І.В.												
Реценз.														
Н. Контр.														
Затверд.		Стабніков В.П.												
					Кафедра БТМ									

розведення сироватки типу 2 (8–12 лунок на кожне розбавлення) додають у кожну ямку панелі та інкубують протягом 3 годин при температурі (37 ± 1) °С. Потім до свердловини панелі додають 0,1 мл клітинної суспензії при концентрації 100000 – 200000 клітин на мл. Панелі інкубують у термостаті при температурі (37 ± 1) °С у газовому середовищі з 5% CO₂ протягом 7 днів. Клітини гепатиту-2 у лунках панелі розглядаються під інвертованим мікроскопом на наявність цитопатогенної дії на 3, 5 і 7 день інкубації.

TCD50/мл вірусу розраховується на 7-й день за методом Ріда і Менча.

Прозорість.

Вакцина має бути прозорою. Тест проводиться візуально.

Хроматичність.

Вакцина має бути жовтувато-червоного або рожево-багряного кольору.

Тести проводяться візуально.

Об'єм, що витягається.

Не менше ніж номінально.

pH.

З 6,8 до 7,2. Випробування проводяться потенціометричним методом.

Проводять підготовку відповідного потенціометра (з ціною поділки 0,05 одиниць pH) згідно з інструкцією до приладу. Калібрують потенціометр по стандартному буферному розчину з pH 6,86, який готують згідно таблиці 1, ДФ Х1, вип. 1, с 113 як суміш 0,025 М розчинів одно заміщеного фосфату калію та двозаміщеного фосфату натрію (для pH 6,86), або з фіксаналів для pH-метрії (ГОСТ 8-135-74). Розходження між показанням приладу і номінальним значенням pH буферного розчину не повинно перевищувати 0,04 одиниці pH.

Середнє значення pH розчину повинно бути в межах від 6,8 до 7,2 при температурі (25 ± 2) °С.

Стерильності.

Вакцина має бути стерильною (метод мембранної фільтрації).

Фільтрування зразку проводять в асептичних умовах. Вміст всіх контейнерів BFS пропускають через два стерильні мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм, впаяні в дві стерильні пластикові ємності (каністри).

Після закінчення фільтрації мембрану відмивають трьома порціями по 100 мл стерильного розчину натрію хлориду 0,9 % ізотонічного.

Після відмивки мембран каністри заповнюють по 100 мл середовищами Сабуро і тіогліколевим. Посів в тіогліколевому середовищі витримують при температурі 30 – 35 °С, а в середовищі Сабуро при температурі 20 – 25 °С протягом 7 діб при щоденному перегляді.

Поживні середовища. Для контролю стерильності використовують «Сухе поживне середовище для контролю стерильності» (тіогліколове) вітчизняного виробництва (ТУ 42.14 № 161-79) та середовище Сабуро (рідке). Замість комерційного тіогліколевого середовища та середовища Сабуро може бути використане тіогліколове середовище та середовище Сабуро індивідуального виробництва.

Специфічність дії.

Пероральна вакцина проти поліомієліту типу 2 повинна містити щонайменше 105,0 (100 000) інфекційних одиниць (МО) вірусу (TCD50) в одній дозі вакцинації (0,2 мл). Визначення специфічної активності проводиться на культурі клітин гепатиту-2 (Цинциннаті) за допомогою цитопатогенної дії (CPD) вірусу у порівнянні з СЗ. Початкові клітини Нер-2 Цинциннаті підтримуються шляхом багаторазового проходження в поживному середовищі Needle MEM з додаванням 5% сироватки з коров'ячої плодової крові, що містить гентаміцинсульфат 40 мкг/мл.

Під час проведення клітинних культур клітини витягують із поверхні скла сумішню розчинів трипсину та версену (1:1), нагрівають до температури 37 °С і інокують у кількості від $1 \cdot 10^4$ до $3 \cdot 10^4$ клітин на 1 см² площі однієї зі сторін

флакону і вирощують при температурі (37 ± 1) °C. Моношар клітини формується за 3-4 дні.

Титрування проводиться в панелях клітинної культури на 96 свердловин компанії «Costar» або виготовлених іншими компаніями подібної якості.

У кожному дослідженні, разом із тестовим зразком, включено одночасне титрування моновакцини СЗ. Розбавлення вакцини та СЗ готуються на поживному середовищі Igla MEM, що містить 2% крові плодів корів з множинністю 15. Діапазон розбавлення повинен включати щонайменше три розбавлення препаратів, при яких вірус знищує від 10% до 90% заражених клітин. До кожної лунки панелі додається 0,1 мл вибраних розведень вакцини або СЗ (8-12 лунок на розведення). Потім у всі свердловини панелі додається 0,1 мл суспензії клітин при концентрації 100000 – 200000 клітин на мл. Панелі інкубують у термостаті при температурі (37 ± 1) °C у газовому середовищі з 5% CO₂ протягом 7 днів. Клітини гепатиту-2 у лунках панелі розглядаються під інвертованим мікроскопом на наявність цитопатогенної дії на 3, 5 і 7 день інкубації.

TCD50/мл вірусу розраховується на 7-й день за методом Ріда і Менча.

Титрування кожної партії моновакцини від поліомієліту проводиться щонайменше двічі, але не більше чотирьох разів.

Враховуються лише результати цих титрувань, у яких значення (десятьового) логарифма титру СЗ, титрованого одночасно з вакциною, не відрізняється від середнього логарифма титру СЗ більш ніж на 0,5. Середнє арифметичне значення титру розраховується на основі результатів двох титрувань вакцини, і робиться висновок про відповідність або невідповідність вакцини вимогам щодо специфічної активності препарату. Повторні титрування відхилених партій вакцини не дозволяються.

Термічна стабільність.

Вона має бути стабільною. Значення титру вірусу після нагрівання вакцини можна знизити не більше ніж на 0,5 лг. Щонайменше 3 флакони кожної партії вакцини та СЗ нагріваються при температурі (37 ± 1) °C протягом 48 годин, інші 3 флакони препарату та СЗ (контроль) зберігаються при температурі мінус 20 °C.

Вакцини та СЗ у нагрітому та контрольному зразках титруються одночасно відповідно до методу, описаного в розділі «Специфічність дії». Повторне титрування не дозволяється (титр визначається в одному експерименті).

Пакування та маркування.

Відповідно до монографії Загальної фармакопеї «Імунобіологічні лікарські засоби» та монографії Загальної фармакопеї «Пакування, маркування та транспортування лікарських засобів» з попереджувальними написами: «Тримати поза досяжністю дітей», «Для медичних та профілактичних і санітарних закладів», «Для вирощування вірусу використовується поживне середовище з гідролізатом лактальбуміну (0,5%) у розчині Ерла».

Транспорт.

При температурі від 2 до 8 °С. Якщо вакцину зберігають при температурі не більше мінус 20 °С, її дають розморожувати з одноразовим заморожуванням вакцини до мінус 20 °С.

Зберігання.

При температурі від 2 до 8 °С - 6 місяців або при температурі не більше мінус 20 °С - 2 роки.

8.2. Опис лікарського засобу згідно АНД

АНАЛІТИЧНО-НОРМАТИВНА ДОКУМЕНТАЦІЯ

Фізико-хімічні властивості: прозора суспензія від світло-рожевого до червоно-оранжевого кольору

Склад: poliomyelitis oral, bivalent, live attenuated.

1 імунізуюча доза вакцини (2 краплі, або 0,1 мл) містить:

поліовірусу типу 1* (штам LS-c2ab) (живий, атенуований) не менше 6,0 log[†] ТЦД₅₀[‡];

поліовірусу типу 3* (штам Leon 12a1b) (живий, атенуований) не менше 5,8 log[†] ТЦД₅₀[‡];

* культивовані на клітинній лінії Vero;

† попередньо було позначено як «не менше 10х ТЦД50»;

‡ титр цитопатичної дії 50 % (вірусні інфекційні одиниці);.

Форма випуску: суспензія для перорального застосування [38].

Таблиця 8.1

СПЕЦИФІКАЦІЯ [91, 92]

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Прозора суспензія від світло-рожевого до червоно-оранжевого кольору	За п. 1 АНД, Візуальний контроль
Автентичність	Препарат являє собою суспензію поліовірусу типу 1 (штам LS-c2ab) (живий, атенуйований) не менше 6,0 log ТЦД5, поліовірусу типу 3 (штам Leon 12a1b) (живий, атенуйований) не менше 5,8 log ТЦД50 та специфічною реакцією з утворенням антитіл	За п. 2 АНД, Ерп 2.7.1
Розчинність	Вміст флакону однорідна суспензія	За п. 3 АНД, ДФУ 2.9.4
Прозорість	Препарат за ступенем каламутності має бути порівняний з еталонним розчином	За п. 4 ДФУ, 2.2.1
Хроматичність	Розчинений препарат має бути прозорим	За п. 5 ДФУ, Візуальний контроль
Механічні включення	Препарат має витримувати вимоги ДФУ	За п. 6 ДФУ 2.9.20 Візуальний контроль
Об'єм, що витягається	Не менше 5 мл	За п. 7 ДФУ, 2.9.17
pH	7,1±0,2	Ерп 2.2.2
Специфічність дії	Препарат має бути нетоксичним	За п.8 ДФУ, 2.6.9
Стерильність	Препарат має бути стерильним. В умовах випробувань не має проявляти антимікробної дії	За п. 10 ДФУ, Ерп 2.6.1
Пірогенність	Пірогенність відповідає тесту, який описаний в Європейській фармакопеї, або проводять введення розбавленої в 10 разів вакцини піддослідній тварині.	За п. 11 ДФУ, Ерп 2.6.8

Кількісне визначення білку (альбумін)	Максимально 50 мкг на одну людину	За п. 12 ДФУ, Eph 2.7.1
---------------------------------------	-----------------------------------	-------------------------

Опис.

Прозора рідина від жовтувато-червоного до рожево-багряного кольору, без осаду, без видимих чужорідних включень. Метод визначення — візуальний.

Автентичність.

Вакцина має бути специфічною за типом і містити ослаблений штам Sabin типу 2. Визначення проводиться в реакції на нейтралізацію цитопатогенної активності вакцини з відповідною гомотиповою діагностичною сироваткою ентеровірусу типу 2 у культурі гепатиту 2 клітин Цинциннаті паралельно зі стандартним зразком (СЗ). Робоче розведення гомотипової сироватки типу 2 має зменшити титр вірусу щонайменше на 2 lg (щонайменше у 100 разів).

Підготовка клітинної культури проводиться за методом, описаним у розділі «Специфічна активність». Титрування проводиться в панелях клітинної культури на 96 свердловин компанії «Costar» або виготовлених іншими компаніями подібної якості.

Розбавлення вакцини та СЗ готуються на поживному середовищі IGLA MEM, що містить 2% крові плодів корів з множинністю 1·5.

0,05 мл вибраного розведення вакцини або СЗ та 0,05 мл робочого розведення сироватки типу 2 (8–12 лунок на кожне розбавлення) додають у кожну ямку панелі та інкубують протягом 3 годин при температурі $(37\pm 1)^\circ\text{C}$. Потім до свердловини панелі додають 0,1 мл клітинної суспензії при концентрації 100000 – 200000 клітин на мл. Панелі інкубують у термостаті при температурі $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ у газовому середовищі з 5% CO₂ протягом 7 днів. Клітини гепатиту-2 у лунках панелі розглядаються під інвертованим мікроскопом на наявність цитопатогенної дії на 3, 5 і 7 день інкубації.

TCD50/мл вірусу розраховується на 7-й день за методом Ріда і Менча.

Прозорість.

Вакцина має бути прозорою. Тест проводиться візуально.

Хроматичність.

Вакцина має бути жовтувато-червоного або рожево-багряного кольору. Тести проводяться візуально.

Об'єм, що витягається.

Не менше ніж номінально.

pH.

З 6,8 до 7,2. Випробування проводяться потенціометричним методом.

Проводять підготовку відповідного потенціометра (з ціною поділки 0,05 одиниць pH) згідно з інструкцією до приладу. Калібрують потенціометр по стандартному буферному розчину з pH 6,86, який готують згідно таблиці 1, ДФ Х1, вип. 1, с 113 як суміш 0,025 М розчинів одно заміщеного фосфату калію та двозаміщеного фосфату натрію (для pH 6,86), або з фіксаналів для pH-метрії (ГОСТ 8-135-74). Розходження між показанням приладу і номінальним значенням pH буферного розчину не повинно перевищувати 0,04 одиниці pH.

Середнє значення pH розчину повинно бути в межах від 6,8 до 7,2 при температурі (25+/-2) °C.

Стерильності.

Вакцина має бути стерильною (метод мембранної фільтрації).

Фільтрування зразку проводять в асептичних умовах. Вміст всіх контейнерів BFS пропускають через два стерильні мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм, впаяні в дві стерильні пластикові ємності (каністри).

Після закінчення фільтрації мембрану відмивають трьома порціями по 100 мл стерильного розчину натрію хлориду 0,9 % ізотонічного.

Після відмивки мембран каністри заповнюють по 100 мл середовищами Сабуру і тіогліколевим. Посів в тіогліколевому середовищі витримують при температурі 30 – 35 °С, а в середовищі Сабуру при температурі 20 – 25 °С протягом 7 діб при щоденному перегляді.

Поживні середовища. Для контролю стерильності використовують «Сухе поживне середовище для контролю стерильності» (тіогліколове) вітчизняного виробництва (ТУ 42.14 № 161-79) та середовище Сабуру (рідке). Замість комерційного тіогліколевого середовища та середовища Сабуру може бути використане тіогліколове середовище та середовище Сабуру індивідуального виробництва.

Специфічність дії.

Пероральна вакцина проти поліомієліту типу 2 повинна містити щонайменше 105,0 (100 000) інфекційних одиниць (МО) вірусу (TCD50) в одній дозі вакцинації (0,2 мл). Визначення специфічної активності проводиться на культурі клітин гепатиту-2 (Цинциннаті) за допомогою цитопатогенної дії (CPD) вірусу у порівнянні з СЗ. Початкові клітини Нер-2 Цинциннаті підтримуються шляхом багаторазового проходження в поживному середовищі Needle MEM з додаванням 5% сироватки з коров'ячої плодової крові, що містить гентаміцинсульфат 40 мкг/мл.

Під час проведення клітинних культур клітини витягують із поверхні скла сумішню розчинів трипсину та версену (1:1), нагрівають до температури 37 °С і інокують у кількості від $1 \cdot 10^4$ до $3 \cdot 10^4$ клітин на 1 см² площі однієї зі сторін флакону і вирощують при температурі (37±1) °С. Моношар клітини формується за 3-4 дні.

Титрування проводиться в панелях клітинної культури на 96 свердловин компанії «Costar» або виготовлених іншими компаніями подібної якості.

У кожному дослідженні, разом із тестовим зразком, включено одночасне титрування моновакцини СЗ. Розбавлення вакцини та СЗ готуються на поживному середовищі Igla MEM, що містить 2% крові плодів корів з множинністю 15. Діапазон розбавлення повинен включати щонайменше три розбавлення препаратів,

при яких вірус знищує від 10% до 90% заражених клітин. До кожної лунки панелі додається 0,1 мл вибраних розведень вакцини або СЗ (8-12 лунок на розведення). Потім у всі свердловини панелі додається 0,1 мл суспензії клітин при концентрації 100000 – 200000 клітин на мл. Панелі інкубують у термостаті при температурі (37 ± 1) °С у газовому середовищі з 5% CO₂ протягом 7 днів. Клітини гепатиту-2 у лунках панелі розглядаються під інвертованим мікроскопом на наявність цитопатогенної дії на 3, 5 і 7 день інкубації.

TCD50/мл вірусу розраховується на 7-й день за методом Ріда і Менча.

Титрування кожної партії моновакцини від поліомієліту проводиться щонайменше двічі, але не більше чотирьох разів.

Враховуються лише результати цих титрувань, у яких значення (десятьового) логарифма титру СЗ, титрованого одночасно з вакциною, не відрізняється від середнього логарифма титру СЗ більш ніж на 0,5. Середнє арифметичне значення титру розраховується на основі результатів двох титрувань вакцини, і робиться висновок про відповідність або невідповідність вакцини вимогам щодо специфічної активності препарату. Повторні титрування відхилених партій вакцини не дозволяються.

Термічна стабільність.

Вона має бути стабільною. Значення титру вірусу після нагрівання вакцини можна знизити не більше ніж на 0,5 лг. Щонайменше 3 флакони кожної партії вакцини та СЗ нагріваються при температурі (37 ± 1) °С протягом 48 годин, інші 3 флакони препарату та СЗ (контроль) зберігаються при температурі мінус 20 °С. Вакцини та СЗ у нагрітому та контрольному зразках титруються одночасно відповідно до методу, описаного в розділі «Специфічність дії». Повторне титрування не дозволяється (титр визначається в одному експерименті).

Пакування та маркування.

Відповідно до монографії Загальної фармакопеї «Імунобіологічні лікарські засоби» та монографії Загальної фармакопеї «Пакування, маркування та транспортування лікарських засобів» з попереджувальними написами: «Тримати

поза досяжністю дітей», «Для медичних та профілактичних і санітарних закладів», «Для вирощування вірусу використовується поживне середовище з гідролізатом лактальбуміну (0,5%) у розчині Ерла».

Транспорт.

При температурі від 2 до 8 °С. Якщо вакцину зберігають при температурі не більше мінус 20 °С, її дають розморожувати з одноразовим заморожуванням вакцини до мінус 20 °С.

Зберігання.

При температурі від 2 до 8 °С - 6 місяців або при температурі не більше мінус 20 °С - 2 роки.

РОЗДІЛ 9

ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

9.1. Галузь і застосування корисної моделі

Цей винахід стосується атенуйованих поліовірусів, їх отримання та вакцин, що їх містять. Більш конкретно, винахід стосується поліовірусів, які атенуйовані та генетично стабілізовані шляхом введення певних мутацій у їхні геноми.

9.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки

Живі атенуйовані вакцини проти поліомієліту, розроблені Сабіном у 1950-х роках, знайшли широке застосування в усьому світі. Штами вакцин, отримані з кожного з трьох серотипів поліовірусу, відомих як Типи Сабіна 1, 2 та 3 були отримані шляхом пасажування вірусів дикого типу в клітинних культурах та цілих тваринах до отримання ослаблених штамів. Ці ослаблені віруси значно менш здатні викликати поліомієліт у людей, ніж вихідні штами дикого типу. Вони вводяться перорально та розмножуються в кишечнику, викликаючи захисну імунну відповідь.

Хоча живі пероральні вакцини проти поліомієліту загалом вважаються безпечними, їхнє використання пов'язане з невеликою кількістю випадків паралічу у вакцинованих. Найчастіше це пов'язано з тип 2 та 3 серотипи та рідко, якщо взагалі, з тип 1. Таким чином, було докладено зусиль для розробки вдосконалених тип 2 та тип 3 вакцин, які були б принаймні порівнянні за безпекою з відповідним тип 1 штам.

Вакцинні штами Сабіна були розроблені, по суті, емпіричним шляхом. Генетична основа їхньої атенуації до кінця не зрозуміла. Однак протягом останніх кількох років вчені застосували низку молекулярно-біологічних методів, намагаючись з'ясувати механізм, за допомогою якого знижується нейровірулентність цих вакцинних штамів. Більшість робіт була зосереджена на серотипи 1 та 3. Для обох цих штамів повні нуклеотидні послідовності вакцинних

					НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ГЧ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9 ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ				Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.	Каменська М.В.										85	100
Перевір.	Лич І.В.											
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В.П.											
					Кафедра БТМ							

штамів порівнювали з послідовностями їхніх нейровірулентних попередників. У випадку тип поліовірусу¹, вакцинний штам відрізняється від свого попередника за 47 позиціями в геномі з 7441 основою (Nomoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5793-5797, 1982). Усі ці мутації є простими точковими мутаціями, і 21 з них призводить до змін амінокислот у вірус-кодованих білках. Хоча вважається, що кілька мутацій сприяють фенотипу атенуації вакцинного штаму, було представлено прямі докази того, що мутація AG у позиції 480 у 5'-некодуючій області геному має помітний послаблюючий ефект на вірус (Nomoto et al., UCLA Symp. Mol. Cell. Biol., New Series, 54 (ред. М.А. Брінтон та Р.Р. Рюкерт):437-452, Нью-Йорк: Alan R. Liss Inc., 1987)).

Аналогічні дослідження щодо тип поліовірусу³ показують лише 10 відмінностей у послідовності нуклеотидів у геномі з 7432 основ між вакциною та її штамом-попередником (Stanway et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1539-1543, 1984). Лише три з них призводять до заміни амінокислот у білках, кодованих вірусом. Положення основ у 5'-некодуючій області геному тип³ віруси поліомієліту пронумеровані тут відповідно до системи нумерації Stanway et al., 1984.

Конструювання визначених рекомбінантів між тип³. Вакцинний штам Sabin та його штам-попередник дозволили ідентифікувати мутації, що сприяють фенотипу атенуації. Одна з них знаходиться в положенні 2034 і викликає зміну серину на фенілаланін у вірусному білку VP3.

Інша мутація, що представляє інтерес, — це мутація C (штам-попередник) на U (штам вакцини) у положенні 472 у 5'-некодуючій області геному. Спостерігалось, що ця мутація 472 U швидко повертається до штаму-попередника (дикого типу) 472 C після реплікації вірусу в кишечнику людини (Evans et al., Nature 314:548-550, 1985). Ця реверсія пов'язана зі збільшенням нейровірулентності. Також було показано, що C у положенні 472 є важливим для росту рекомбінантного вірусу поліомієліту миші/людини в мозку миші (La Monica et al., J. Virol. 57:515-525, 1986). Зовсім недавно було помічено, що A змінюється на G у положенні 481 у тип поліовірусу², знову ж таки, після реплікації вірусу в кишечнику вакцинованих (Macadam et al., Virology 181:451-458, 1991).

Модель вторинної структури 5'-некодуючої області геному типу поліовірусу Штам Leon був запропонований раніше (Skinner et al., J. Mol. Biol. 207: 379-392, 1989). Що стосується домену V (нуклеотиди 471-538), основи в положеннях 471-473 та 477-483 спарені з основами в положеннях 538-536 та 534-528 відповідно наступним чином:

471	477 483
... Єдиний торговельний кодекс (UCC)	... CCAUGGA...
... АГГ ... ГГУГЦКУ ...	
538	534 528

Для зручності парні області називаються стеблом (a) (471-473/538-536) та стеблом (b) (477-483/534-528). Раніше ми виявили, що атип3 поліовірус з інвертованою парою основ 472-537, тобто 472 G та 537 C, є атенуйованим. Крім того, цей атенуйований вірус мав дещо нижче значення LD50, ніж відповідний поліовірус, який мав лише мутацію C на G у положенні 472, але зберіг дикий тип G у положенні 537. Атенуйовані поліовіруси, у яких інвертована пара основ стебла (a) або стебла (b) домену V, розкриті в EP-A-0383433. Однак подальші експерименти показали, що тип3 поліовірус, у якому пара основ 472-537 розташована у зворотному напрямку, не є таким ослабленим, як тип3 Вакцинний штам Сабіна.

Раніше ми також повідомляли про виробництво атенуйованих поліовірусів, які мають практично таку ж або більшу атенуацію, ніж вакцинний штам Сабіна (що робить їх безпечними для використання), але які є набагато стабільнішими генетично. Ці атенуйовані поліовіруси не мають пари основ UG або іншої невідповідності пар основ у стеблі (a) або (b) домену V 5'-некодуючої області геному поліовірусу. (Відхилення від пар основ Вотсона-Кріка вважається невідповідністю.) Більш конкретно, ми підготували тип3 поліовіруси, які містили такі пари основ UA:

(a) S15: UA на 472-537, UA на 480-531 та UA на 481-530; або

(b) S16: UA на рівні 472-537, UA на рівні 480-531 та AU на рівні 482-529.

За умов, що швидко відбирали нейровірулентні варіанти Sabin 3, фенотипи атенуації цих штамів поліовірусу були стабільними (WO98/41619).

9.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення

В результаті успіху глобальної програми ліквідації поліомієліту частка випадків, пов'язаних зі штамами, отриманими з вакцин, різко зросла і продовжуватиме зростати, доки не припиниться вакцинація живим вірусом. Частково у відповідь на це багато розвинених країн вже перейшли на інактивовані поліовакцини (ПІВ), які наразі виробляються з диких штамів. Після ліквідації поліомієліту дикого типу штами дикого типу потребуватимуть високого рівня біологічної ізоляції, що може бути нелегко узгодити з масштабами виробництва, необхідними для ПІВ, що робить використання атенуйованих штамів вакцини для виробництва ПІВ привабливим, хоча стверджується, що як дикі, так і атенуйовані штами зрештою мають однакові проблеми з ізоляцією.

Залишається потреба в штаммах поліовірусу, неінфекційних для людини на рівнях впливу, які потенційно можуть виникнути на виробничих потужностях вакцин. Це значно зменшить ймовірність потрапляння в навколишнє середовище, а наслідки потрапляння будуть незначними навіть після припинення вакцинації живими вірусами. Такі штами можна вирощувати за умов стримування, що не є заборонними для виробників вакцин.

9.4. Опис запропонованого способу

Ми розробили та створили штами поліовірусу, які можуть вирішити проблеми безпеки та стримування поширення сучасного насіння поліомієліту. Ці штами досягали титрів, таких же високих, як і штами Сабіна, у культурі клітин при 33°C, але інфекційність при 37°C значно знижувалася, а в одному випадку — більш ніж у мільйон разів. Тип Штам 3 виявився повністю ослабленим, не викликаючи жодних клінічних симптомів, коли його інтраспінально ввели мишам TgPVR у дозі, що в 5000 разів перевищувала дозу Sabin 3, необхідну для паралічу 50% мишей. Штами також розроблені з урахуванням генетичної стабільності, що передбачає маніпуляцію вторинною структурою РНК у домені V 5'-некодуючої області. Послідовності капсидних білків у цих штаммах не змінюються, тому очікується, що імуногенність інактивованих препаратів буде незмінною.

Відповідно, цей винахід пропонує атенуйований поліовірус, який не має пари основ UG або невідповідності пар основ у стеблі (a) або (b) домену V 5'-некодуючої області геному поліовірусу, і в якому принаймні сім пар основ у стеблах (a) та (b) є парами основ UA або AU. Бажано, щоб принаймні п'ять пар основ у стеблі (b) були парами основ UA або AU. Поліовірус може бути тип1, тип2 або тип3 вірус поліомієліту, ослабленого типу3. Перевага надається поліовірусу, в якому 5'-некодуюча область геному поліовірусу містить пару основ UA в положеннях 472-537, 478-533, 480-531 та 481-530. Особливу перевагу надають атенуйованим поліовірусам, які додатково містять пару основ AU в положеннях 482-529 або 477-534, або в обох. «Атенуйований» означає атенуйований відносно поліовірусу дикого типу, який є попередником відповідних штамів вакцини Сабіна (кожен штам має свого попередника), а також відносно відповідного штаму вакцини Сабіна. Загалом, вірус має бути достатньо атенуйованим, щоб бути неінфекційним для людини.

Цей винахід також забезпечує:

поліовірус винаходу, який є живим;

поліовірус винаходу для використання у вакцині;

вакцина, що містить поліовірус винаходу та фармацевтично прийнятний носій або розріджувач;

використання поліовірусу винаходу як інактивованого посівного матеріалу проти поліовакцини; та спосіб приготування живої поліовакцини, що включає:

(i) вирощування атенуйованого поліовірусу відповідно до винаходу;

(ii) інактивація зазначеного поліовірусу; та

(iii) формулювання зазначеного живого поліовірусу з фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем.

9.5. Формула корисної моделі

Жива поліомієлітна вакцина, отримана зі штамма Сейбіна, для ефективної імунізації проти поліомієліту, яка є трьохвалентною або двовалентною, що містить суміш усіх трьох типів або суміш будь-яких двох типів вірусу поліомієліту, а саме типу 1, типу 2 і типу 3, отримана з основної маси моновалентної суспензії штамма

Сейбіна або суспензії вихідного. штамма Сейбіна, використовувана для змішування трьохвалентної або двохвалентної оральної поліомієлітної вакцини, або шляхом вирощування вірусів поліомієліта штамма Сейбіна в клітинній лінії його або будь-якої підходящої клітинної культури для отримання оральної поліомієлітної вакцини, що відрізняється тим, що отримана поліомієлітна вакцина стабілізується стабілізатором.

9.6. Реферат

Високоактивні штами Себіна вірусу поліомієліту можуть бути отримані культивуванням за наявності від приблизно 4 г/л до приблизно 6 г/л мікроносіїв клітин Vero, інокулованих штаммом Себіна вірусу поліомієліту. Штамм Себіна вірусу поліомієліту може бути ефективно отриманий при використанні високоактивного штамма Себіна вірусу поліомієліту. Таким чином, спосіб отримання комбінованої вакцини, який включає стадію культивування клітин Vero, інокулованих штаммом Себіна вірусу поліомієліту в присутності від приблизно 4 г/л до приблизно 6 г/л мікроносія (спосіб отримання за цим винаходом), є застосовним у якості способу ефективного отримання комбінованої вакцини, що містить штамм Себіна вірусу поліомієліту.

ВИСНОВКИ

У роботі узагальнено сучасні підходи до створення живих атенуйованих вірусних вакцин та проаналізовано їх застосування на прикладі оральної поліомієлітної вакцини. Показано, що такі вакцини залишаються критично важливими для глобальних програм імунізації завдяки здатності формувати місцевий кишковий імунітет, простоті введення та можливості вторинної імунізації населення

Особливу увагу приділено генетичній стабілізації атенуйованих штамів, що є ключовою умовою безпеки живих вакцин. Розглянуто модифікації домену V 5'-UTR (позиція 481) та компенсаторні мутації, які знижують ризик реверсії до вірулентного фенотипу та застосовуються у nOPV2

Додатково проаналізовано метод кодон-деоптимізації структурних білків (VP1–VP4), який дозволяє контрольовано зменшити реплікативну здатність вірусу без втрати імуногенності

Обґрунтовано вибір штаму PRV 7.3 як перспективного продуцента для виробництва вакцини. Його продуктивність ($7,94 \times 10^8$ вірусних частинок/мл) істотно перевищує інші серотипи, що робить його придатним для масштабування виробництва

До роботи включено систематизовані вимоги ДФУ та Європейської фармакопеї до якості препарату — стерильність, прозорість, рН, вміст білка та специфічна активність, що є необхідними для випуску серій вакцини у промислових умовах

Розглянуто основні етапи технологічного процесу, включно з фільтрацією, очищенням, концентруванням та умовами зберігання.

Загалом виконана робота демонструє, що поєднання генетичних модифікацій, оптимізованих умов культивування та сучасних фармакопейних стандартів дозволяє створювати ефективні та безпечні оральні вакцини нового покоління.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Margot L. Savoy Вакцина проти поліомієліту. MSD довідник. Квітень 2024. [Електронний ресурс]: <https://www.msdmanuals.com/uk/professional/infectious-diseases/immunization/poliomyelitis-vaccine>
2. Luring A.S. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat. Biotechnol.* 2010;28:573–579. doi: 10.1038/nbt.1635.
3. Hanley K.A. The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine. *Evolution.* 2011;4:635–643. doi: 10.1007/s12052-011-0365-y.
4. Burns C.C. Vaccine-derived polioviruses. *J. Infect. Dis.* 2014;210 (Suppl 1):S283–S293. doi: 10.1093/infdis/jiu295.
5. Bull JJ, Smithson MW, Nuismer SL. Transmissible Viral Vaccines. *Trends Microbiol.* 2018;26(1):6-15. doi:10.1016/j.tim.2017.09.007
6. Martínez M.A., Jordan-Paiz A., Franco S., Nevot M. Synonymous Virus Genome Recoding as a Tool to Impact Viral Fitness. *Trends in Microbiology.* Volume 24, Issue 2, February 2016, Pages 134-147. DOI: 10.1016/j.tim.2015.11.002.
7. Yeh MT, Bujaki E, Dolan PT, et al. Engineering the Live-Attenuated Polio Vaccine to Prevent Reversion to Virulence. *Cell Host Microbe.* 2020;27(5):736-751.e8. doi:10.1016/j.chom.2020.04.003
8. Bull J.J. Evolutionary reversion of live viral vaccines: Can genetic engineering subdue it? *Virus Evol.* 2015;1 doi: 10.1093/ve/vev005. vev005.
9. Sook J. Yui H., Zeyu Z. Marazzi I. Unconventional viral gene expression mechanisms as therapeutic targets. *Nature.* 593, p. 362–371; 2021. <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03511-5>.
10. Sriram Srikant Chantal K Guegler Michael T Laub (2022) The evolution of a counter-defense mechanism in a virus constrains its host range *eLife* 11:e79549.
11. Bull JJ, Smithson MW, Nuismer SL. Transmissible Viral Vaccines. *Trends Microbiol.* 2018;26(1):6-15. doi:10.1016/j.tim.2017.09.007.
12. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, et al. Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes Dis.* 2017; 4(2):43-63. doi:10.1016/j.gendis.2017.04.001

13. Luijendijk, E. Transmissivity and groundwater flow exert a strong influence on drainage density, *Earth Surf. Dynam.*, 10, 1–22, <https://doi.org/10.5194/esurf-10-1-2022>, 2022.
14. Cecchini N. Evolutionarily stable attenuation by genome rearrangement in a virus. *G3 Bethesda Md.* 2013;3:1389–1397. doi: 10.1534/g3.113.006403.
15. Kew O. Reaching the last one per cent: progress and challenges in global polio eradication. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2:188–198. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.006.
16. Yeh MT, Smith M, Carlyle S, et al. Genetic stabilization of attenuated oral vaccines against poliovirus types 1 and 3. *Nature.* 2023; 619(7968):135-142. doi:10.1038/s41586-023-06212-3
17. Hird TR, Grassly NC. Systematic review of mucosal immunity induced by oral and inactivated poliovirus vaccines against virus shedding following oral poliovirus challenge. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002599. <http://doi:10.1371/journal.ppat.1002599>
18. Sutter RW, John TJ, Jain H, Agarkhedkar S, Ramanan PV, Verma H, Deshpande J, Singh AP, Sreevatsava M, Malankar P, Burton A, Chatterjee A, Jafari H, Aylward RB. Immunogenicity of bivalent types 1 and 3 oral poliovirus vaccine: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet.* 2010 Nov 13;376(9753):1682-8. <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002599>
19. Kumar P, Bird C, Holland D, Joshi SB, Volkin DB. Current and next-generation formulation strategies for inactivated polio vaccines to lower costs, increase coverage, and facilitate polio eradication. *Hum Vaccin Immunother.* 2022; 18(7):2154100. doi:10.1080/21645515.2022.2154100
20. Mallory R.M. Shedding of Ann Arbor strain live attenuated influenza vaccine virus in children 6–59 months of age. *Vaccine.* 2011;29:4322–4327. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.022.
21. Zhu H. Polio Vaccines: The Global Effort to Eradicate Polio. *SL Vaccines And Vaccination Journal.* 2022; 3(2):124. <https://scientificliterature.org/Vaccines/Vaccines-22-124.pdf>.

22. Wahid R, Mercer L, Gast C, et al. Evaluating stability of attenuated Sabin and two novel type 2 oral poliovirus vaccines in children. *NPJ Vaccines*. 2022;7(1):19. Published 2022 Feb 11. doi:10.1038/s41541-022-00437-5
23. Yeh MT, Smith M, Carlyle S, et al. Genetic stabilization of attenuated oral vaccines against poliovirus types 1 and 3. *Nature*. 2023;619(7968):135-142. doi:10.1038/s41586-023-06212-3
24. Yeh MT, Bujaki E, Dolan PT, Smith M, Wahid R, Konz J, Weiner AJ, Bandyopadhyay AS, Van Damme P, De Coster I, Revets H, Macadam A, Andino R. Engineering the Live-Attenuated Polio Vaccine to Prevent Reversion to Virulence. *Cell Host Microbe*. 2020 May 13;27(5):736-751.e8. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.003
25. Burns CC, Campagnoli R, Shaw J, Vincent A, Jorba J, Kew O. Genetic inactivation of poliovirus infectivity by increasing the frequencies of CpG and UpA dinucleotides within and across synonymous capsid region codons. *J Virol*. 2009 Oct;83(19):9957-69. doi: 10.1128/JVI.00508-09
26. Combelas N, Holmblat B, Joffret ML, Colbère-Garapin F, Delpeyroux F. Recombination between poliovirus and coxsackie A viruses of species C: a model of viral genetic plasticity and emergence. *Viruses*. 2011;3(8):1460-1484. doi:10.3390/v3081460
27. Korotkova E., Laassri M., Zagorodnyaya T., Petrovskaya S., Rodionova E., Cherkasova E., Gmyl A., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Lipskaya G.Y. Pressure for Pattern-Specific Intertypic Recombination between Sabin Polioviruses: Evolutionary Implications. *Viruses*. 2017; 9:353. doi: 10.3390/v9110353
28. Yeh MT, Bujaki E, Dolan PT, Smith M, Wahid R, Konz J, Weiner AJ, Bandyopadhyay AS, Van Damme P, De Coster I, Revets H, Macadam A, Andino R. Engineering the Live-Attenuated Polio Vaccine to Prevent Reversion to Virulence. *Cell Host Microbe*. 2020 May 13;27(5):736-751.e8. doi: 10.1016/j.chom.2020.04.003
29. Konopka-Anstadt JL, Campagnoli R, Vincent A, et al. Development of a new oral poliovirus vaccine for the eradication end game using codon deoptimization. *NPJ Vaccines*. 2020;5(1):26. Published 2020 Mar 20. doi:10.1038/s41541-020-0176-7
30. Kerkvliet J, Edukulla R, Rodriguez M. Novel roles of the picornaviral 3D polymerase in viral pathogenesis. *Adv Virol*. 2010;2010:368068. doi:10.1155/2010/368068

31. Campagnola G, McDonald S, Beaucourt S, Vignuzzi M, Peersen OB. Structure-function relationships underlying the replication fidelity of viral RNA-dependent RNA polymerases. *J Virol*. 2015; 89(1):275-286. doi:10.1128/JVI.01574-14
32. Xiao Y., Rouzine I.M., Bianco S., Acevedo A., Goldstein E.F., Farkov M., Brodsky L., Andino R. RNA Recombination Enhances Adaptability and Is Required for Virus Spread and Virulence. *Cell Host Microbe*. 2017;22:420. doi: 10.1016/j.chom.2017.08.006
33. Hashemi Sanatgar R., Campagne C., Nierstrasz V. Investigation of the adhesion properties of direct 3D printing of polymers and nanocomposites on textiles: Effect of FDM printing process parameters. *Applied Surface Science*. Volume 403, 1 May 2017, Pages 551-563. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.01.112>
34. Konz JO, Schofield T, Carlyle S, Wahid R, Ansari A, Strating JRPM, Yeh MT, Manukyan H, Smits SL, Tritama E, Rahmah L, Ugiyadi D, Andino R, Laassri M, Chumakov K, Macadam A. Evaluation and validation of next-generation sequencing to support lot release for a novel type 2 oral poliovirus vaccine. *Vaccine X*. 2021 Jun 11;8:100102. doi: 10.1016/j.jvacx.2021
35. De Coster I, Leroux-Roels I, Bandyopadhyay AS, Gast C, Withanage K, Steenackers K, De Smedt P, Aerssens A, Leroux-Roels G, Oberste MS, Konopka-Anstadt JL, Weldon WC, Fix A, Konz J, Wahid R, Modlin J, Clemens R, Costa Clemens SA, Bachtiar NS, Van Damme P. Safety and immunogenicity of two novel type 2 oral poliovirus vaccine candidates compared with a monovalent type 2 oral poliovirus vaccine in healthy adults: two clinical trials. *Lancet*. 2021 Jan 2;397(10268):39-50. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32541-1
36. Macklin GR, O'Reilly KM, Grassly NC, Edmunds WJ, Mach O, Santhana Gopala Krishnan R, Voorman A, Vertefeuille JF, Abdelwahab J, Gumede N, Goel A, Sosler S, Sever J, Bandyopadhyay AS, Pallansch MA, Nandy R, Mkanda P, Diop OM, Sutter RW. Evolving epidemiology of poliovirus serotype 2 following withdrawal of the serotype 2 oral poliovirus vaccine. *Science*. 2020 Apr 24;368(6489):401-405. doi: 10.1126/science.aba1238

37. Kocher AA, Dutrow EV, Uebbing S, et al. CpG island turnover events predict evolutionary changes in enhancer activity. *Genome Biol.* 2024;25(1):156. Published 2024 Jun 13. doi:10.1186/s13059-024-03300-z

38. Вакцина для профілактики поліомієліту, пероральна, бівалентна, типів 1 та 3. [Електронний ресурс]: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[18213\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[18213])

39. Korotkova E., Laassri M., Zagorodnyaya T., Petrovskaya S., Rodionova E., Cherkasova E., Gmyl A., Ivanova O.E., Ereemeeva T.P., Lipskaya G.Y. Pressure for Pattern-Specific Intertypic Recombination between Sabin Polioviruses: Evolutionary Implications. *Viruses.* 2017;9:353. doi: 10.3390/v9110353.

40. Luring A.S., Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1001005. doi: 10.1371/journal.ppat.1001005.

41. Luring A.S., Jones J.O., Andino R. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines. *Nat. Biotechnol.* 2010;28:573–579. doi: 10.1038/nbt.1635.

42. Lenski R.E., Mongold J.A., Sniegowski P.D., Travisano M., Vasi F., Gerrish P.J., Schmidt T.M. Evolution of competitive fitness in experimental populations of *E. coli*: what makes one genotype a better competitor than another? *Antonie van Leeuwenhoek.* 1998;73:35–47. doi: 10.1023/a:1000675521611.

43. Hird TR, Grassly NC. Systematic review of mucosal immunity induced by oral and inactivated poliovirus vaccines against virus shedding following oral poliovirus challenge. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002599. doi: 10.1371/journal.ppat.1002599

44. Bandyopadhyay AS, Garon J, Seib K, Orenstein WA. Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiol.* 2015;10(5):791-808. doi: 10.2217/fmb.15.19

45. Kiesslich S, Kamen AA. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnol Adv.* 2020;44:107608. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107608

46. Kurokawa M, Sato S. Growth and poliovirus production of Vero cells on a novel microcarrier with artificial cell adhesive protein under serum-free conditions. *J Biosci Bioeng.* 2011; 111(5):600-604. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.12.018

47. WHO. (2020). Novel Oral Polio Vaccine Type 2 (nOPV2) – Technical Brief. WHO. <https://polioeradication.org/wp-content/uploads/2024/05/nOPV2-vaccine-handling.pdf>
48. Brian C. Avanzino, Helen Jue, Clare M. Miller, Emily Cheung, Gabriele Fuchs, Christopher S. Fraser Molecular mechanism of poliovirus Sabin vaccine strain attenuation protein synthesis and degradation. Volume 293, Issue 40P15471-15482 October 2018.
49. Bakker WA, Thomassen YE, van't Oever AG, Westdijk J, van Oijen MG, Sundermann LC, van't Veld P, Sleeman E, van Nimwegen FW, Hamidi A, Kersten GF, van den Heuvel N, Hendriks JT, van der Pol LA. Polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. Vaccine. 2011 Sep 22;29(41):7188-96. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.079
50. van der Sanden SM, Wu W, Dybdahl-Sissoko N, Weldon WC, Brooks P, O'Donnell J, Jones LP, Brown C, Tompkins SM, Oberste MS, Karpilow J, Tripp RA. Engineering Enhanced Vaccine Cell Lines To Eradicate Vaccine-Preventable Diseases: the Polio End Game. J Virol. 2015 Nov 18;90(4):1694-704. doi: 10.1128/JVI.01464-15
51. Календар профілактичних щеплень. [Електронний ресурс]: <https://moz.gov.ua/uk/kalendar-profilaktichnih-scheplen>
52. Скільки людей народжується і помирає в Україні. [Електронний ресурс]: <https://www.slovoidilo.ua/2025/05/13/infografika/suspilstvo/skilky-lyudej-narodzhuetsya-pomyrae-ukrayini>
53. Forbes Ukraine. (2025, січень 31). Смертність в Україні майже втричі перевищила народжуваність у 2024-му. [Електронний ресурс]: <https://forbes.ua/news/smertnist-v-ukraini-mayzhe-utrichi-perevishchila-narodzhuvanist-u-2024-mu-31012025-26762>
54. Скільки дітей щороку народжувалося в Україні за період незалежності. [Електронний ресурс]: <https://www.slovoidilo.ua/2023/08/04/infografika/suspilstvo/skilky-ditej-shhoroku-narodzhuvalosya-ukrayini-period-nezalezhnosti>

55. Державна служба статистики України. (2007–2025). Чисельність населення України за роками. [Електронний ресурс]: http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2007/ds/nas_rik/nas_u/nas_rik_u.html
56. Ukrainian Refugees After Three Years Abroad. Fourth Wave of Research. [Електронний ресурс]: <https://ces.org.ua/en/refugees-fourth-wave/>
57. ОПВЕРО/OPVERO Вакцина для профілактики поліомієліту пероральна тривалентна жива рідка. [Електронний ресурс]: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[23814\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[23814])
58. Вакцина для профілактики поліомієліту, пероральна, бівалентна, типів 1 та 3. [Електронний ресурс]: [https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?\[18213\]](https://likicontrol.com.ua/%D1%96%D0%BD%D1%81%D1%82%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F/?[18213])
59. Viruses. From Understanding to Investigation. 2017, Pages 37-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00004-0>
60. Kremer F., Lagaly G. Progress in Colloid and Polymer Science. V.119. 2002. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/3-540-44672-9.pdf>
61. Pengsong Li, Anuj Kumar, Jun Ma, Yun Kuang, Liang Luo, Xiaoming Sun. Density gradient ultracentrifugation for colloidal nanostructures separation and investigation. Science Bulletin 63 (2018) 645–662. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2018.04.014>
62. Zhe Yu, Siyun Zhou, Ningguang Luo, Ching Yi Ho. Min Chen and Haifeng Chen. TPP Combined with DGUC as an Economic and Universal Process for Large-Scale Purification of AAV Vectors. Molecular Therapy: Methods & Clinical Development Vol. 17 June 2020. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.11.009>
63. Kiichi Hirohata, Shinichiro Kino, Takuya Yamane, Karin Bandoh, Takeshi Bamba, Shawn M. Sternisha, Tetsuo Torisu, Mitsuko Fukuhara. Yuki Yamaguchi, Susumu Uchiyama. Use of cesium chloride density gradient ultracentrifugation for the purification and characterization of recombinant adeno-associated virus. European Biophysics Journal. 2025. <https://doi.org/10.1007/s00249-025-01751-1>

64. Shawn Sternisha. Achieve significantly increased adenovirus yield with density gradient ultracentrifugation: a comparative study. *Cell & Gene Therapy Insights* 2022; 8(8), 1257–1266. DOI: 10.18609/cgti.2022.184

65. Duong P, Chung A, Bouchareychas L, Raffai RL (2019) Cushioned-Density Gradient Ultracentrifugation (C-DGUC) improves the isolation efficiency of extracellular vesicles. *PLoS ONE* 14(4): e0215324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215324>

66. Фармацевтична біотехнологія: Частина I. Вакцини : підручник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : Друкарня Мадрид, 2025. – 443 с.

67. Kim, S.-J., & Park, Y.-I. (2012). Formation of TiO₂ nano fibers on a microchanneled Al₂O₃–ZrO₂/TiO₂ porous composite membrane for photocatalytic filtration. *Journal of the European Ceramic Society*, 32(1), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2011.08.007>

68. ScienceDirect. (2022). Virus purification - an overview. [Електронний ресурс]: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/virus-purification>

69. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., ... & Zuba-Surma, E. K. (2020). Modern techniques for the isolation of extracellular vesicles and viruses. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1706113. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1706113>

70. Система мікрофільтрації UF5170-NT https://h2o.kharkov.ua/ua/p867246798-sistema-mikrofiltratsii-uf5170.html?srsId=AfmBOorfyX2fz-cPlFYhyHWYNbezqSsBI0F5xYqr_D4BOD99ZL0Fh78

71. Virosart® CPV. [Електронний ресурс]: <https://sartorius.com.ua/filtracziya-i-ochishhennya/filtracziya-v-farmaczevticzi-ta-biofarmaczevticzi/filtracziya-virusiv/virosart-cpv/>

72. Реактор лабораторний LR-2.ST the Compact Power. [Електронний ресурс]: <https://ventalab.ua/reaktor-laboratornyi-lr-2.st-the-compact-power/>

73. Sartopore® 2. [Електронний ресурс]: <https://sartorius.com.ua/filtracziya-i-ochishhennya/filtracziya-v-farmaczevticzi-ta-biofarmaczevticzi/sterilizuyucha-filtracziya-ridin/sartopore-2/>

74. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0/1:2023 Лікарські засоби належна виробнича практика додаток 1. Виробництво стерильних лікарських засобів. <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-3/st-n-mozu-42-4-9-2020/>

75. Вибір робочого одягу для чистих приміщень. <https://ua.esd-antistatic.com/info/selection-of-dust-free-clean-room-work-clothes-95440735.html>

76. Вентиляції та кондиціонування повітря у робочій зоні виробничих приміщень. <https://dsp.gov.ua/ventyliatsii-ta-kondytsiuvannia-povitria-u-robochii-zoni-vyrobnychikh-prymishchen/>

77. Фільтр тонкого очищення станції R2 Patron (HEPA-H14-R2). https://patronservice.ua/filtr-tonkogo-ochishchennya-dlya-stanciji-patron-r2-fpp-zh-n14-p?srsId=AfmBOop4w66_Rw9fAgUfMqQoZi-omBzplW7UzTryDcD-Jx1ZuSIARUhU

78. HEPA фільтр 595*595*78 H14. https://teho-parts.com.ua/hepa-filtr-59559578-h14?srsId=AfmBOoovtNA1GE_WE9V9-5y9elxzk7XU8ObxpztHNtotnxkzJhHCSX_s

79. Основні способи одержання води очищеної. <https://xemy.fifo.v.ua/articles/osnovni-sposobi-oderzhannja-vodi-ochishhenoi.html>

80. Первинна упаковка – особливості та призначення. <https://balenko.com/pervynna-upakovka-osoblyvosti-ta-pryznachennya/>

81. Гладишев В. В. Нагорний В. В. Бурлака Б. С. Гладишева С. А. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва. Запоріжжя- 2023. С. 102.

<https://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/22607/1/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4.%20%D0%A0%D0%BE%D0%B7%D0%B4%D1%96%D0%BB%202.%D0%A2%D0%9B%D0%9F%D0%9F%D0%92.2023.pdf>

82. Гумові закупорювальні засоби для контейнерів для водних парентеральних препаратів, для порошків і ліофілізованих порошків.
<https://sphu.org/wp-content/uploads/2024/09/3.2.9.pdf>

83. Очисна машина для гумових пробок та алюмінієвих кришок серії DQ.
<https://sinopharmtech.ua/ochisnamashina-dlya-gumovih-probok-ta-alyumini%d1%94vih-krishok-seri%d1%97-dq>

84. Ковпачок алюмінієвий K2-20НП. https://ametistglass.com/kryshki-i-nasadki/inektsionnye/kolpachok-alyuminiyvy-k2-20np-krasnyy-100-sht-upakovka/?srsrtid=AfmBOoppbL8cwwSeDWsFfd_KCc7Y_u8tsCL4T7BWhre_Fp9o57wj9X_v

85. Ультразвукова мийна машина DGM CLQ.
<https://redmedua.com/uk/catalog/48-ulytrazvukovye-moechnyemashiny-SMS-Sp-z-oo-polysha>

86. Стерилізаційний тунель DGM SH-B.
https://www.fortdefianceind.com/products/frontlinesterilizer/?gclid=Cj0KCQiAkeSsBhDUARIsAK3tieg8ABi6gJi5S3qD4lf6aJO9hZDmdgKYFbzbv-_g8rvtPBvpCZT6n0lkaAvoJEALw_wcB

87. Машина наповнення та закупорювання флаконів Universal Pack.
<https://promoboz.com/journal/2023/2-95-2023/vsesvit-pakuvannya/>

88. Напівавтомат закруточний ПЗ-1250.
<https://promvit.com.ua/category/mashiny-ukuporochnye/>

89. Маркування лікарських препаратів: вимоги та особливості
https://galinfo.com.ua/news/markuvannya_likarskyh_preparativ_vymogy_ta_osoblyvos_ti_359552.html

90. Горизонтальна машина для маркування флаконів //Режим доступу:
<https://ukrainian.vkpacks.com/products/horizontal-vial-labelingmachine>

91. ДФУ друге видання (ДФУ 2.0). <https://sphu.org/napryamky-diyalnosti/viddil-dfu/dfu-2-0>

92. European pharmacopoeia. <https://pheur.edqm.eu/home>