

**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)

Грегірчак Н.М.

(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2021 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Пирог Т.П.

(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» _____ 2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнологія і біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Біологічні аспекти отримання рекомбінантних протианемічних засобів

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 02

Приймак Дар'я Миколаївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник Пенчук Юрій Миколайович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____

(підпис)

Київ – 2021 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології
Освітній ступінь магістр
Спеціальність 162 «Біотехнологія і біоінженерія»
(код і назва)
Освітньо-професійна програм а «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології
Пирог Т.П.
“ ” 20 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Приймак Дар’ї Миколаївни

(прізвище, ім’я, по батькові)

1. Тема роботи Біологічні аспекти отримання рекомбінантних
протианемічних засобів

керівник роботи Пенчук Юрій Миколайович, доцент,
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26” жовтня 2020 року № 868-кс

2. Строк подання здобувачем роботи _____
3. Вихідні дані до роботи Ферментер об’ємом - 63л; інокулятор об’ємом - 10л
потужність виробництва становить - 7,2 кг рік; кількість трудоднів становить -300

4.Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ;
Розділ 1. Літературний огляд; Розділ 2. Препарати рекомбінантних еритропоетинів;
Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського
засобу (ЛЗ) та виробництва готової форми ЛЗ; Розділ 4. Обґрунтування вибору
технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ;
Розділ 5. Специфікація обладнання; Розділ 6. Опис технологічного процесу
виробничого біосинтезу; Розділ 5. Опис технологічного процесу виробництва ЛЗ;
Розділ 7. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу
Апаратурна схема 2 листи А1; Технологічна схема 2 листи А1 _____

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології виробництва рекомбінантного еритропоетидину. Даний препарат використовується для лікування та профілактики анемічних станів різної природи.

В роботі пропонується використовувати рекомбінантний продуцент *E.coli* BL21 (DE3), який за 18 годин культивування дозволяє одержати 3,2 г/л цільового білку. Використання даного продуценту є більш економічно доцільним порівняно з іншими групами продуцентів.

Робота складається з вступу та семи розділів. Загальний обсяг роботи становить 171 сторінки, містить 5 рисунків та 10 таблиць. Кількість літературних джерел – 94.

Ключові слова: еритропоетидин, продуцент, анемія, біосинтез, хроматографія.

ЗМІСТ

ВСТУП	
РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЕРИТРОПОЕТИНУ	
1.1. Характеристика способів одержання еритропоетину різними продуцентами	
1.1.1. Бактеріальні продуценти	
1.1.2. Еукаріотичні мікробні продуценти	
1.1.3. Продуценти на основі клітинних ліній тварин	
1.1.4. Продуценти на основі клітинних ліній рослин	
1.2. Особливості модифікації рекомбінантного еритропоетину	
1.3. Особливості створення різних груп рекомбінантних продуцентів	
1.4. Особливості експресії у різних груп продуцентів	
РОЗДІЛ 2. ПРЕПАРАТИ РЕКОМБІНАНТНИХ ЕРИТРОПОЕТИНІВ І ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА	
2.1. Хімічна будова, механізм синтезу і основні функції еритропоетину	
2.2. Основні види рекомбінантних еритропоетинів	
2.3. Фізико-хімічні і біологічні властивості препаратів рекомбінантних еритропоетинів	
2.4. Оцінка якості рекомбінантних еритропоетинів	
РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування	
3.1. Передумови виробництва ЛЗ	
3.2. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання	
3.3. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку	
3.4. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції	
3.5. Розрахунок річної потужності виробництва	
3.6. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму	

ферментера та кількості виробничих циклів	
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування технологічної схеми	
4.1. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря)	
4.2. Обґрунтування підготовки первинної упаковки	
4.3. Обґрунтування вибору підготовки води	
4.4. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування	
4.5. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера	
4.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.	
4.7. Обґрунтування вибору товарної форми випуску продукту	
4.8. Підбір сучасних методів контролю виробництва.	
4.9. Опис лікарського засобу згідно АНД	
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання	
РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	
6.1. Опис технологічної схеми біосинтезу еритропоетину	
6.2. Опис технологічної схеми виділення та очищення еритропоетину	
РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва	
Використана література	

ВСТУП

Анемія (точніше малокрів'я) - це патологічний процес, що характеризується зменшенням загальної кількості гемоглобіну та частіше за все проявляється зменшенням його концентрації в одиниці об'єму крові. В більшості випадків, за виключенням залізодефіцитних станів і таласемії, анемія супроводжується також зниженням вмісту еритроцитів в одиниці об'єму крові. Розвиток анемії може бути пов'язаний з дитячим віком, пубертатним та клімактеричним періодами, гормональними та імунними зрушеннями, захворюваннями травного каналу, печінки, нирок, характером харчування [1].

Встановлення наявності анемії в більшості випадків базується на даних аналізу периферичної крові. Переважність цього досягається наявністю сучасних геманалізаторів. Історично існують різні класифікації анемії, проте єдиної до сьогодення немає. Це пов'язане з об'єктивними факторами. Наприклад, одною з найпопулярніших та традиційних у клінічній практиці є класифікація за кольоровим показником. Лікарям зручно розподіляти анемії на гіпо- та гіперхромні тому, що кольоровий показник та інші індекси вмісту гемоглобіну та еритроцитів дозволяють скерувати діагностичний пошук у потрібному напрямку [2].

Однак, класична гіперхромна вітамін В₁₂ – дефіцитна анемія дуже часто буває нормохромною, а при гіпохромній залізодефіцитній анемії суб'єктивні симптоми з'являються до того, як знизиться кольорний показник. Інша класифікація анемії - на основі патогенезу, як і нозологічна класифікація, також не може бути взята за основу. Наприклад, хронічна постгеморагічна анемія, уявляє собою одну з самих масових захворювань людства, може бути обумовлена менорагіями, які не компенсуються залізом їжі або хронічною крововтратою на тлі геморою та-або носових кровотеч при хворобі Рандю-Ослера [3].

Незважаючи на прогресивні досягнення в онкології, анемія у хворих, які страждають на злоякісні новоутворення, є серйозною і актуальною проблемою, що

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Приймак Д.			Вступ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>		Пенчук Ю.М.					7	3 /
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.						

потребує оптимального підходу до вибору лікарських засобів і методів для її лікування. Анемія є найбільш частим ускладненням злоякісного новоутворення і визначається як зниження концентрації гемоглобіну, числа еритроцитів або рівня гематокриту в одиниці об'єму крові. З практичних рекомендацій з лікування анемії у онкологічних хворих слідує, що анемія присутня у 40% онкохворих, причому слабка ступінь анемії - у 30%, середня - у 9% і важка - в 1% випадків [3].

Клінічними проявами анемії є слабкість, погана переносимість фізичних навантажень, нездужання, зниження соціальної активності, а тобто погіршення якості життя. Серед причин, що викликають анемію, слід зазначити кровотечі, дефіцит вітамінів і заліза, наявність метастазів в кістках з ураженням кісткового мозку, токсичність цитостатиків, ниркову недостатність [4].

Оскільки вживання залізовмісних препаратів призначається лише для профілактики хвороби, а не для повного її усунення, то лікування анемії у хворих можливо з використанням лише двох методів - гемотрансфузія (переливання крові) або введення в організм аналога еритропоетину.

Втрата нирками здатності секретувати в достатній кількості еритропоетин (гормон, що стимулює процеси кровотворення) — одна із провідних причин розвитку анемії. Остання може виникати при хронічній хворобі нирок задовго до її термінальної стадії та посилюватися у міру прогресування захворювання, оскільки зморщення нирок призводить до різкого зниження синтезу еритропоетину в клітинах перитубулярних капілярів.

До недавнього часу єдиним способом лікування даного захворювання було переливання еритроцитарної маси, тобто трансфузія крові. Трансфузія крові або її компонентів, що безперечно можна вважати трансплантацією клітин. Варто зазначити, що донатія крові зачасти має ризики набуття нових захворювань (ВІЛ, вірус Ебштейн-Барр, гепатит, цитомегаловірус, малярія і т.д.), також можлива сенсibilізація до компонентів крові, гіперкаліємія, гіпокальціємія. У деяких пацієнтів не виключена ймовірність розвитку хвороби «трансплантат проти господаря». Тому в сучасних умовах показання до трансфузії еритроцитів вкрай обмежені [5].

Актуальність. Проблема розвитку анемічних станів в Україні щорічно збільшується приблизно на 3 %. Такі стани суттєво погіршують якість життя хворий. Використання препаратів на основі рекомбінантного еритропоетидину дозволяє суттєво покращувати фізичні стани хворих. В нашій країні реалізовані технології виробництва таких препаратів лише на основі субстанцій, куплених за кордоном.

Розроблення технології одержання рекомбінантного еритропоетидину, яка передбачає повний цикл виробництва, є наразі актуальною для нашої країни. Реалізація такої технології дозволить забезпечити ринок ефективним і не дорогим препаратом.

Новизна. В якості новизни пропонується використовувати рекомбінантний продуцент *E.coli* BL21 (DE3), який за 18 годин культивування дозволяє одержати 3,2 г/л цільового білку. Використання даного продуценту є більш економічно доцільним порівняно з іншими групами продуцентів [6].

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЕРИТРОПОЕТИНУ

Анемія - це стан організму людини, що характеризується зниженою концентрацією гемоглобіну в одиниці об'єму крові, і, як правило, корелює з одночасним зниженням кількості еритроцитів [7]. Еритроцити полегшують циркуляцію кисню з легенів до життєво-важливих органів. Здоровій дорослій людині потрібна велика кількість еритроцитів, приблизно 5 мільйонів еритроцитів на мкл крові для виконання транспорту. Анемію можна визначати як зменшення кількості циркулюючих еритроцитів, знижену концентрацію гемоглобіну або зниження гематокриту [8]. Виробництво еритроцитів в кістковому мозку стимулюється гормоном, який вивільняється з нирок - еритропоетином. Перебуваючи в кістковому мозку, еритроцити повинні зростати і диференціюватися від еритроїдних попередників на ретикулоцити і з часом у зрілі еритроцити. Між кожним еритроцитом міститься білок, який здатний зв'язуватися з киснем з подальшим вивільненням його в тканини капілярів. Еритроцити циркулюють в крові приблизно приблизно 120 днів і потім вилучаються з обігу макрофагами. Задля підтримки балансу між виробництвом і втратами еритроцитів, кістковий мозок постійно повинен виробляти 50 000 ретикулоцитів/мл цільної крові щодня. Однак у разі збільшення втрати крові (наприклад, гострий крововилив, кровотеча у шлунково-кишковому тракті, або гемолітична анемія), а кістковий мозок не ефективно компенсує збільшення виробництва еритроцитів для задовільнення потреб, у пацієнта неминуче розвивається анемія [9].

Структура ЕПО. Рекомбінантний еритропоетин складається з 135 амінокислотних залишків, загальна маса молекули досягає 35 кДа. 40% цієї маси доводиться на 4 карбогідратних ланцюга, 3 з них пов'язані з атомом азоту в амінокислоті, 1 - з атомом кисню. Карбогідратні ланцюги побудовані з 10 молекул сіалової кислоти, та забезпечують низьку (4,4) ізоелектричну рН молекули ЕПО.

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЕРИТРОПОЕТИНУ					
<i>Розроб.</i>	Приймак Д.							<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>	Пенчук Ю.М.							10	22	
<i>Реценз.</i>								Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>										
<i>Затверд.</i>	Пирог Т.П.									

Препарати ЕПО гетерогенні за рахунок безлічі ізоформ, що розрізняються по карбогідратному залишку. Рекомбінантний ЕПО (рч-ЕПО) повністю гідролізований і утворюється у клітинах ссавців. У клініці використовуються 2 форми рч-ЕПО: епоетин- α і епоетин- β , ці сполуки утворюються в яєчниках китайського хом'ячка, та завдяки синтезу в клітинах бактерій. Вони розрізняються по карбогідратній ланцюгах, фармакокінетичним і фармакодинамічним властивостями, але ідентичні по клінічному ефекту [10].

До рецептора приєднується тільки поліпептидний залишок, так як карбогідратний залишок не проявляє біологічну активність ЕПО *in vitro*. Але *in vivo* активність ЕПО повністю пригнічується при відщепленні сіалових кислот, що вказує на протективногороль карбогідратів, що запобігають деградацію молекули і подовжують період її циркуляції в крові [11].

Клітини-мішені ЕПО. Найбільш ранні попередники еритроцитів (бурст-утворюють клітини) мало чутливі до дії ЕПО. Потрібна спільна активність ЕПО і фактора стовбурових клітин. Проліферативна активність більш диференційованих еритроїдних колонієутворюючих одиниць нижче, ніж їх попередників, але чутливість до ЕПО незрівнянно вище. Усі наступні етапи дозрівання еритроцита повністю залежать від ЕПО. Але при мієлопроліферативних захворюваннях, зокрема, при справжній поліцитемії, прогенітори еритроїдних клітин ростуть і диференціюються без участі ЕПО. ЕПО діє на клітину, зв'язуючись з високоафінними рецептором [12]. Концентрація рецепторів на поверхні клітини невелика (менше 1 000), рецептор повністю відсутня на зрілому еритроциті. Рецептор ЕПО відноситься до I класу суперсімейства рецепторів цитокінів, до якого належать і рецептори інтерлейкинов ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-6, гранулоцитарний колонієутворюючих фактор і тромбопоетин. Рецептор представляє собою трансмембранний протеїн. При його зв'язуванні з ЕПО запускається димеризація, яка індукує фосфорілізацію тирозину і активацію внутрішньоклітинної JAK2 тирозинкінази, після чого включається каскад сигнальних молекул. Рецептори ЕПО, крім прогеніторів еритроїдних клітин, виявлені на кардіоміоцитах, миоцитах, нервових і ендотеліальних клітинах. ЕПО визначає розвиток серця і мозку [5]. ЕПО

захищає тканини серця і мозку при запаленні як за рахунок безпосередньої стимуляції міоцитів і нервових клітин, так і опосередковано, за рахунок мобілізації прогениторів ендотеліоцитів і прискорення неоваскуляризації [13].

Синтез ЕПО і гіпоксія. ЕПО в основному утворюється в перитубулярних інтерстиціальних клітинах, в корі нирок. Невелика кількість іРНК ЕПО виявлено в селезінці, печінці, легенях, яєчках, яєчниках, мозку. Синтез ЕПО різко посилюється при гіпоксії тканин, низький артеріальний рО₂, підвищеному спорідненості кисню до гемоглобіну. Індукція гіпоксією синтезу ЕПО регулюється фактором транскрипції гіпоксії індукційна фактором-1 (HIF-1), який зв'язується з HIF-1 відповідальним елементом на гені ЕПО. HIF-1 в присутності кисню дуже нестійкий і виявляється тільки при низькому насиченні киснем. Таким чином, HIF-1 діє за принципом негативного зворотного зв'язку як сенсорна молекула, яка запускає синтез ЕПО при гіпоксії тканин, коли потрібна підвищена кількість еритроцитів для його транспорту і зникає, коли кількість еритроцитів досить для транспорту відповідної кількості молекул кисню. Відповідно, падає активність синтезу ЕПО [8].

1.1. Характеристика способів одержання еритропоетину різними продуцентами

Еритропоетин являє собою гормон, що продукується клітинами нирок і регулює еритропоез у ссавців. Проте, виходячи з нинішніх технологій та просувань у генній інженерії отримання рекомбінантного еритропоетину, який є ідентичним до людського, тобто природнього – можливо різними способами [8]. Ці способи включають в себе як використання генномодифікованих бактеріальних та еукаріотичних продуцентів, так і продуцентів на основі клітинних ліній рослин та тварин.

1.1.1. Бактеріальні продуценти

Вчені з Сингапуру Інституту молекулярної та клітинної біотехнології та Кореї Кафедри фізіології біомедичного технологічного інституту (*Jeong TH* зі співавторами) дослідили розчинну переекспресію активного rhEpo. В якості

продуцента використовували *E. coli*, в структуру, якої були внесені зміни. В якості змін були використані такі білкові мітки MBP та NusA. Це дозволило підвищити розчинність rhEpo, оскільки еритропоетин є ендометаболітом, його експресія відбувається у навколишнє середовище. Досліджуваний rhEpo очищали за допомогою афінної хроматографії та гель-фільтрації. Електрофорез та аналіз MALDI-TOF MS показали, що очищений rhEpo мав два внутрішньодисульфідні зв'язки, ідентичні тим, що знаходяться у природньому hEpo. Ще один аналіз *in vitro* на проліферацію показав, що очищений від *E. coli* rhEpo має ідентичну біологічну активність, до rhEpo, який отримують із клітин CHO. Отже, у результаті дослідження були зроблені такі висновки, що активний rhEpo був надмірно виражений в розчинній формі у цитоплазмі кишкової палички, а виділення та очищення проводиться досить простими етапами [9].

Існують відомості про технологію, яка була розроблена англійським вченим (*M. Alejandro Carballo-Amador* зі співавторами), використовуючи в якості продуцента *E.coli*, змогли забезпечити більшу розчинність та експресію білку на середовищі Luria-Bertani (LB), яке містить 10 г триптон, 5 г дріжджового екстракту, 5 г NaCl. Реалізація даної технології дозволила збільшити на 60% вихід цільового білку. Для змін структур амінокислот, які можуть впливати на розчинність рекомбінантного еритропоетину людини (rHuEPO) в *E.coli*, був застосований поверхневий аналіз. Набір білків rHuEPO (rHuEPO E13K, F48D, R150D, i F48D / R150D) був сконструйований з rHuEPO WT, за допомогою мутацій амінокислот [10].

Вченими Національного дослідницького центру епідеміології та мікробіології ім. Н.Ф. Гамалєї (*Карягіна* зі співавторами), було отримано рекомбінантний еритропоетин людини (EPO), що несе на N-кінці додатковий гепарин-зв'язуючий білковий домен (HBD) з кісткового морфогенетичного білка BMP-2. В якості продуцента використовували *E. coli* M15, в структуру, якої були внесені зміни. В якості змін був використаний такий плазмідний вектор- pQE6. Це дозволило підвищити вихід білка. Досліджуваний rhEpo культивували на середовищі, що містило триптон 10 г/л; дріжджовий екстракт – 5 г/л та NaCl-10 г/л.

Очищення відбувалось за допомогою афінної хроматографії з подальшою ліофілізацією білка. Отже, у результаті дослідження були зроблені такі висновки, що активний rhEpo був надмірно виражений в розчинній формі у цитоплазмі кишкової палички, його вихід становив 0,141 мг/мл, а виділення та очищення проводиться досить простими етапами [11].

Інше дослідження авторів було проведено задля збільшення експресії рекомбінантного еритропоетину. В якості продуцента використовували штам *Escherichia coli* BL21, в структуру якого були внесені зміни. Ген, що кодує амінокислотну послідовність білка Entero-EPO, вставляли у плазмиду pET30a (+) між сайтами BglII та AgeI. Культивування відбувалося в середовищі LB з додаванням відповідних антибіотиків. Очищення білка відбувалося на сорбенті WorkBeads 40 S з подальшою ліофілізацією білка. Дослідження показало, що білок bHis-s-tag-EPO та продукт його протеолітичного гідролізу rhEPO, отриманий шляхом синтезу бактерій у *E. coli*, продемонстрували біологічну активність *in vitro*, що дає змогу порівняти його з активністю природнього еритропоетину [12].

1.1.2. Еукаріотичні мікробні продуценти

Малазійським вченим (*Ser Huu Teh* зі співавторами) вдалося реалізувати технологію конструювання гену рекомбінантного еритропоетину, використовуючи праймери (ЭПО-F, EPO-2F_o, EPO-3F_o, EPO-4F_o, EPO-Stop). В якості продуцента використовували *Pichia pastoris*. Культивування було проведено на середовищі ВММУ (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 100 мМ фосфат калію, рН 6,0, 1,34% дріжджового азотистого, $4 \times 10^{-5}\%$ біотину і 1% метанолу). Очищення відбувалось за допомогою центрифугування та осадження. Вихід продукту, після 24-годинного культивування становив 3,15 г/л. Дане дослідження показало, що конструйовані білки rhEPO-Stop і rhEPO-His, були функціонально активними, проте за своєю структурою все ж відрізнялись від природнього еритропоетину [13].

Ще одні вчені з Туреччини (*Pinar Çalik* зі співавторами) розробили і дослідили рекомбінантну систему експресій еритропоетину, використовуючи клітинну лінію дріжджів *Pichia pastoris* X-33. Для конструювання гену

використовували такі мітки : EPO - F3 - 1 та EPO - F3-2. Культивування відбувалося на середовищі YPD, що містить пептон, 20 мг/мл; дрожжовий екстракт – 10 мг/мл; глюкоза - 20 мг/мл; агар, 20 мг/мл та зеоцин 0,1 мг/мл. Вихід еритропоетину після 72 годин культивування становив 5 г/л. Очищення білка, було проведено за допомогою афінної хроматографії, з подальшим деглікозуванням та розщепленням факторів-Ха-протеазой.

Дане дослідження показало, що природна поліпептидна форма людського EPO (близько 18 кДа) була вперше напіввищеплена в експресійній системі *P. Pastoris* [14].

1.1.3. Продуценти на основі клітинних ліній тварин

Незважаючи на простоту використання та дешевизну середовища, все більша кількість досліджень, проведених щодо отримання рекомбінантного еритропоетину відбувалася за допомогою клітинних ліній тварин. Таких як реконструйовані, за допомогою різних векторів клітини китайського хом'ячка СНО.

Дослідниками науково-виробничого об'єднання «Вектор» було отримано рекомбінантний еритропоетин на основі культивування клітин яєчника китайського хом'ячка СНОрЕ. У даній роботі показано спосіб, який включає послідовне культивування клітин в ростовому і накопичувальному середовищах, де ростове середовище містить 5,0 мас.% сироватки крові великої рогатої худоби і поживне середовище Ігла MEM, а накопичувальне містить 49,0-80,0 мг/л проліну, 40,0-60,0 мг/л гліцину і суміш рівних часток середовищ DMEM і F-12. В результаті дослідження, при стаціонарному культивуванні, з подальшим виділенням цільового продукту послідовно методами мікрофільтрації та хроматографії - вихід рекомбінантного еритропоетину становив 4 мг / л [15].

Працівниками «РД-БІОТЕХ» був досліджений клон клітин яєчників китайського хом'ячка - штаму 41Н9, який продукує еритропоетин людини. Даний штам клітин був вирощений в середовищі CD СНО (гівітроген) без гіпоксантину /

тимідину, з 8 мл глютаміна, 500 мкг / мл G-418, при температурі 37 ° С, та вмістом CO₂ -8%. Клітини даного клону при культивуванні в умовах адгезійного росту в безсироватковому середовищі протягом 7 днів виділяли в середовище 91 мг/л еритропоетину [16].

Основним спрямуванням збільшення експресії еритропоетину є його переведення у розчинну форму, це пов'язано з тим, що у нерозчинній формі він погано експресується. Оскільки еритропоетин обов'язково повинен виходити у культуральне середовище, а не накопичуватись в клітині, тому збільшення розчинності еритропоетину є ключовим моментом для підвищення його виходу у біотехнологічній промисловості [17].

Іноземним вченим з Куби вдалось отримати рекомбінантний ЕРО методом генної інженерії і експресувати в клітинах яєчника китайського хом'ячка (СНО). У якості середовища, використовували DMEM-F12 з додаванням 5% бичачої ембріональної сироватки, 26 мМ бікарбонату натрію, 15 мМ Нерес, 6 мМ глютаміну, 1 мМ пірувату натрію і 10⁻⁵ М 2-меркаптоетанол. Рекомбінантний еритропоетин отримали за допомогою трансформації плазмідами рKG-Xho-EPO-HIND, що містять ген еритропоетину людини, і рSV2 DHFR, клонованими в клітинах СНО-DHFR. Кінцевим продуктом є лінія клітин, яка виробляє 10⁷ одиниць ЕРО на 1 л культури за 24 год [18].

Вчені з Хорватії (*Agrokor D.* зі співавторами) розробили клітинну лінію, що продукує rhEPO (rСНО) в безбілковому середовищі. Адгезивні клітини rСНО (початкова концентрація 5 × 10⁴ клітин / мл) висівали в Т-колби у середовище Дульбекко з 10% сироваткою великої рогатої худоби та 2 мл л-глютаміну. Клітини культивували при 37 ° С. Дане дослідження показало, що клітини СНО були успішно адаптовані до виробництва rhEPO в умовах середовища, яке не містить білків, і при цьому структура rhEPO майже не змінилася [19].

Вченому з Канади (*Bojiao Yin* зі співавторами) вдалося отримати більший вихід рекомбінантного еритропоетину додаючи в поживне середовище певний вміст сиалової кислоти. В якості продуцента використовувалируконструйовані клітини СНО-K1. Культивування клітин відбувалося на середовищі Ham's F, з

додаванням сироваткою великої рогатої худоби при 37 ° С. Додавання сialової кислоти допомогло збільшити вихід цільового продукту на 40% [20].

Вченими (*Qiong Wang* зі співавторами) було досліджено вихід рекомбінантного еритропоетину використовуючи бутират, з метою отримання більшого виходу продукту. Продуцентом в даному дослідженні виступали клітини СНО-К1. Для культивування використовували середовище F12-К, з додаванням 10% бичачої сироватки. Культивування було проведено декількома етапами, на наступному етапі в середовище додавали приготований натрій бутират. Кожні 12 годин проводився збір та підрахунок клітин з продуктом. Дослідження показало, що надмірна експресія GnTIV / GnTV / ST6 у клітинах СНО підвищує вихід ЕРО близько на 40% [21].

Вченими (*Mehri Mortazavi* зі співавторами) було проведено дослідження, щодо підвищення виходу рекомбінантного еритропоетину, використовуючи хімічні шаперони. Продуцентом в даному дослідженні виступали клітини СНО. Культивування проводили на середовищі наступного складу : манітолу 7мг/мл, бетаїну 3 мг/мл, трегалоза 0,5 мг/мл, таурину 0,5мг/мл, лінолевої кислоти 12,5мг/мл, бета-циклодекстрин 1,25мг/мл, CuSO4 0,75 мг/мл, мальтоза 0,5 мг/мл, мальтодекстрин 0,1 мг/мл, сахароза 0,1 мг/мл, декстран 0,5 мг/мл, бета-аланін 0,1 мг/мл, протягом 24 годин. Використовували такі шаперони : GRP78/ВіР, ХВР1, ATF6, та ATF4. В ході дослідження були зроблені такі висновки,що хімічні шаперони підвищи вихідрекомбінантного еритропоетину,так вихід продукту за день зріс з 16,2 г/л до 36,5 г/л [22].

1.1.4. Продуценти на основі клітинних ліній рослин

Вченим (*Poornima Devi Gurusamy* зі співавторами) вдалося провести дослідження щодо збільшення максимальної концентрації рекомбінантного еритропоетину у декілька разів, використовуючи в якості продуцента генетично модифіковані організми. В якості продуцента використовували кореневу культуру тютюну *Nicotiana tabacum*. Культивування проводили на середовищі наступного складу : YMB, що містить спектроміцин (50 мг). Задля трансформації

використовували специфічні праймери гена F1 5' GCCGAGCTTCCCGGGATG 3' і R1 5'-GAGTGAGCTCAGGCGTCTTC-3'. Дане дослідження показало, що додавання антибіотику посилює стабілізацію rhEPO, що призвело до збільшення в 5,6 рази до максимальної концентрації 185,48 pg rhEPO^{HR} g⁻¹FW у волосяній кореневій культурі [23].

Вчені (*Andrew J.* зі співавторами) провели дослідження, щодо накопичення еритропоетину (EPO) під час розвитку рослин тютюнових виробів. В якості продуценту використовували лінію клітин *Nicotiana tabacum*. Конструювання вектору пройшло завдяки такій послідовності: людський ендогенний пептид EPO людини (SP^{EPO}) був злитий у зрілу природну послідовність EPO (EPO^{Nat}) для направлення білка в секреторний шлях (secEPO) і, нарешті, в апопласт. Збереження до ER (SP^{EPO} · EPO^{Nat}) було досягнуто додаванням сигналу пошуку ER (KDEL) до С-кінця конструкції, орієнтованої на апопласт secEPO. В ході дослідження було виявлено, що значно вищі концентрації EPO знаходяться в молодому листі. Саме тому, були зроблені такі висновки, що є необхідність частіше збирати молоді листя з рослини, оскільки швидкість їхнього росту збільшується завдяки підвищенню виходу рекомбінантного еритропоетину [24].

Вчені з США провели дослідження щодо покращення рівня експресії рекомбінантного еритропоетину у клітинних лініях тютюнових рослин. В якості продуцента використовували трансгенні тютюнові рослини. Трансгенні рослини тютюну, що експресують EPO, були утворені стабільно спільним експресією гену *EPO* людини та β 1,4-галактозилтрансферази (GalT) під контролем подвійних промоторів CaMV 35S та гліцеральдегід-3-фосфату (GapC) відповідно. В ході дослідження були зроблені висновки, які показали, що рослини є придатним господарем для отримання цитопротекторного похідного rhEPO [25].

1.2. Особливості модифікації рекомбінантного еритропоетину

Початковий rhEpo і, який найчастіше вводять до цього часу, є немодифікованим поліпептидом рекомбінантного еритропоетину, має повну довжину та амінокислотну послідовність, ідентичну послідовності ендогенного

Еро. Обидва містять близько 40% вуглеводів, хоча склад і розташування цукрових фрагментів незначно відрізняються. Також обидва мають однаковий час обороту в плазмі, що становить приблизно 1/2 від 7 до 8 годин. Проте, неглікозильована форма Епо дуже швидко виводиться з кровообігу. Однак його еритроїдна активність *in vitro* та його нерітритоїдна біологічна активність настільки ж великі, як і у природного Епо [35].

Усвідомлюючи, що глікозилювання, пов'язане з аспарагіном (N), є важливим фактором тривалого існування Еро в кровообігу, вчені Amgen довели, що інженерія додаткових N-пов'язаних ділянок у поліпептиді Еро може призвести до отримання продукту з ще більшим періодом напіврозпаду.. Продукт з найбільшою ефективністю, дарбепоетин альфа (Aranesp), має безліч мутацій, що створюють 2 N-зв'язані місця глікозилювання, вище та за межами 3, нормально присутніх в ендogenous Епо. Ці модифікації призводять до триразового збільшення періоду напіввиведення плазми [36], що забезпечує менш часте введення.

Ще три стратегії були використані для продовження періоду напіввиведення Епо в обігу. Рекомбінантний димерний Еро, зв'язаний через пептидний міст та rhЕро, хімічно зшитий через вільні сульфгідрильні групи з утворенням димерів та тримерів, як було виявлено, підвищив специфічну біоактивність та помітно тривалий період напіввиведення. Клінічні випробування на цих димерних ЕПО ще не проводилися [37].

Вчені компанії Gryphon Therapeutics розробили синтетичний білок еритропоезу (SEP), який представляє собою повністю синтетичну макромолекулу 50,8-кДа однорідної структури, що складається з 166-амінокислотного поліпептиду з послідовністю, подібною, але не тотожною до природного Еро. Негативно заряджені неуглеводні розгалужені полімери точної довжини були приєднані до цього білка на двох ділянках шляхом хімічної перев'язки [38]. SEP має еритропоетичну активність *in vitro*, що значно перевищує активність rhЕро, ймовірно, завдяки тому, що він має приблизно в 2,5разів більший період напіввиведення плазми.

Кон'югація rhEpo з поліетиленгліколем призводить до отримання продукту, який також має тривале виживання в циркуляції. Дві компанії, Prolong Pharmaceuticals та Roche, розробили структурно відомі продукти PEGylated Epo для терапевтичного використання. Продукт Roche CERA (безперервний активатор рецепторів еритропоетину) - це молекула 60 кДа, що вдвічі перевищує масу Epo. Полімер метокси-поліетиленгліколю включений в Epo на N-кінцевому аміно, а також -аміно-лізину 52 або лізину 45. Ця модифікація помітно продовжує період напіввиведення продукту в циркуляції до приблизно 135 годин у людини після будь-якого внутрішньовенного або підшкірного введення. Дослідження поверхневого плазмонного резонансу (Biacore) вказують на те, що CERA зв'язується з EpoR повільніше, ніж Epo, і швидкість його дисоціації швидша. Таким чином, CERA може запускати каскад трансдукції сигналу Epo без інтерналізації і має більш стійку біологічну активність [39].

Ще однією модифікацією рекомбінантного еритропоетину є модифікація структури білку за рахунок N-гомоцистеїніляції. Рекомбінантний еритропоетин людини (питома активність: $125 \text{ MO} \cdot \text{мкг}^{-1}$) з Mr 30243, визначений MALDI-TOF MS, інкубували (24 год, 37°C) за наявності різних концентрацій HTL (молярне співвідношення EPO: HTL). : 1: 100, 1: 1000 та 1: 2000) у сольовому розчині, забуференому фосфатом (PBS). Після інкубаційного періоду вільний HTL був усунений ультрафільтрацією та промиванням PBS за допомогою відцентрового фільтра Amicon Ultra-4 (зріз 3 кДа, Merck Millipore, графство Корк, Ірландія), після чого вимірювали кінцеві концентрації білка (Nanodrop 2000, Термонауковий). Зразки EPO, піддані аналогічному процесу інкубації за відсутності HTL, використовувались як контролю у всіх експериментах. Аналізи проводили за допомогою трьох незалежних партій HTL-EPO. Зміни в нековалентних взаємодіях, що підтримують структуру білка, можуть призвести до його неправильного згортання або розгортання. Це може, в свою чергу, викликати взаємодію між відкритими гідрофобними зонами сусідніх білків, що призводить до аморфних або більш структурованих агрегатів, таких як амілоїдні

фібрили. Результати Paolі виявляють, що навіть низький рівень *N* -

Гомоцистеїніляції викликали легкі конформаційні зміни альбуміну сироватки великої рогатої худоби (BSA) [40]. За наявності НТЛ структура BSA була перетворена на частково розгорнутий проміжний продукт з високою тенденцією до утворення агрегатів, які зазнають тривалої структурної перебудови, що призводить до утворення амілоїдних фібрил. Існує багато прикладів пептидів або складених білків, деякі з них пов'язані з патологіями, де розчинні олігомери можуть накопичуватися або діяти як фібрильні попередники [41]. Виходячи з цих знань,

втрату біологічної функції, що спостерігається в ЕПО після модифікації НТЛ, можна пояснити неправильним складом білка. Це призводить до впливу гідрофобних зон, що в кінцевому рахунку дозволить утворити розчинні олігомери. Оновлений огляд [42] обговорює утворення токсичних мультимерів, агрегатів або амілоїдів, що виникають внаслідок включення НТЛ до білків. У цьому контексті ця реакція була запропонована як незалежний фактор ризику різних патологій, зокрема нейродегенеративних захворювань [43]. Отже, *N*-гомоцистеїніляція дестабілізує структуру фактора росту еритропоєтину, викликаючи перетворення його α -спіралей у β -листові повторювані структури з високою тенденцією до утворення розчинних олігомерів. Виходячи з цих результатів, можна припустити, що структурні зміни молекули погіршують просторову адаптацію, необхідну для ефективної взаємодії ліганд-рецепторів, впливаючи, таким чином, на проліферативну та антиапоптотичну функції ЕРО [44].

Інша модифікація стосувалась глікозилювання рекомбінантного еритропоєтину з подальшою експресією у клітинах дріжджів. Чотири екзони (105, 99, 192 і 183 пар основ) гена ЕРО були успішно ліговані за допомогою SOE-PCR для отримання гена повної довжини з сайтами *Eco* RI, включеними на обох терміналах. SOE-PCR - це простий, економічно ефективний інструмент для побудови рекомбінантних генів, особливо для ЕРО, який, як правило, має низьку експресію в тканинах, окрім нирок. Ця процедура обминає копітку роботу з вилучення мРНК з клітин нирок людини. Вірність ПЛР та наступні етапи побудови гена були підтверджені шляхом аналізу послідовностей, який виявив, що рекомбінантні конструкції мали точно таку саму послідовність, як у природнього

еритропоетину [45]. Використовуючи цей підхід, область накладання між двома сусідніми екзонами можна мінімізувати до 12 без будь-якого зниження ефективності сплайсингу. Обидві версії рекомбінантного ЕРО, тобто з полігістидиновою міткою та без неї (rhЕРО-His та rhЕРО-Stop), були успішно експресовані, але на дуже низьких рівнях. Для досягнення більш високих результатів була використана серія оптимізованих умов культури (дані не показані). Крім того, знижуючи температуру культури, отримували суміш глікоізоформ, що призводило до появи широкого мазка. Молекулярна маса rhЕРО-Stop становила від 32 до 75 кДа, тоді як маса rhЕРО-His коливалася в межах 37–75 кДа, і були більшими, ніж спостереження за сЕРО (~32–37 кДа). Природний ЕРО людини є високоглікозильованим (~32–37 кДа) і приблизно 30% його молекулярної маси припадає на вуглеводні ланцюги [46].

Результати показали, що глікозилювання в rhЕРО, що є вираженням в *P. pastoris*, становить приблизно 30-70 % від загальної молекулярної маси. Це явище не є незвичним, оскільки гіперглікозиляція або гіперманозилування є частиною в системі експресії дріжджів [47]. Різні дослідження показали, що глікозилювання у *P. pastoris* приводять до експресії гетерологічних рекомбінантних білків, які мають більшу молекулярну масу, ніж відповідні білки, експресовані в клітинах ссавців. Однак є випадки, коли рекомбінантні білки, експресовані в *P. pastoris*, мають меншу молекулярну масу, ніж отримані за допомогою клітин ссавців. Дослідження варіації глікозилювання рекомбінантних білків включало в себе обробку двох рекомбінантних ЕРО глікозидазою (PNGase F) для вивільнення N-зв'язаних вуглеводів. Деглікозилювання зменшило молекулярну масу обох рекомбінантних ЕРО. Як було передбачено з амінокислотної послідовності, молекулярна маса поліпептидної основи сЕРО та rhЕРО-Стоп була схожою, тобто ~18 кДа. Для rhЕРО-His молекулярна маса поліпептидної основи становила ~23 кДа. Також показано, що для комерційного ЕРО спостерігали дві смуги, причому верхня смуга, що відповідає білку ЕРО, з O-пов'язаним вуглеводом, тоді як нижня смуга була неглікозильованою ЕРО. Також було

виявлено дві смуги для перетравленого rhEPO-His, але молекулярні маси відрізнялися порівняно з SEPO. Для подальшої оцінки відмінностей глікозилювання між SEPO та rhEPOs видаляли N-пов'язані глікани за допомогою ферменту Ендо Н, який лише відщеплює ланцюги високого рівня маннози від N-пов'язаних глікопротеїнів. Як і слід було очікувати, отримані результати, подібні з результатами, отриманими з F PNG - азою, вказуючи, що *Pichia* – експресований рчЕПО містив тільки манозу. Досліджено також вплив деглікозилювання на фракціоновані білки. Отримані результати підтвердили припущення, що коливання молекулярної маси були викликані різним вмістом гліканів. Гіперманозилування у *P. pastoris* ініціюється активністю α -1,6-манозилтрансферази. Інактивація гена OCH1, що призводить до елімінації або мінімізації N-зв'язаного глікозилювання у *P. pastoris*, вважається важливим кроком у «гуманізації» цих клітин-господарів. Інші відповідні етапи "гуманізації" включають введення гена, який надає активність α 1,2-носідаза (для видалення залишків α 1,2-маннози) та іншого гена (трансферази GlcNAc I), який додає β 1,2-зв'язані залишки GlcNAc до α 1,3-маннози [48].

Дане дослідження стосується зміни структури рекомбінатного еритропоетину, вбудованого в дріжджі *Pichia Pastoris*. Кодуюча послідовність людського глікопротеїну EPO була злита з полігістидиновою міткою для забезпечення легкої, швидкої очистки експресованого білкового продукту, і ця конструкція була клонована в *P. pastoris*. Фактор Ха протеази субстрату консенсусної послідовності на аміно-кінці дикого типу EPO послідовність була також включена в касету, щоб дозволити легке видалення всіх елементів поліпептидів, які не є частиною послідовності природного EPO, і використовується як частина кінцевої стадії дозрівання. Штам *P.Pastoris* E17, досягла 8 г сухого ваги клітин л⁻¹ наприкінці 72-годинного періоду виробництва [49]. Це набагато нижче, ніж «бродіння з високою щільністю клітин». Дане явище спостерігалось через неконтрольований характер експериментів з струшуванням колби порівняно з біореакторами, де рівень метанолу та кисню можна контролювати. Переважне середовище біореактора є кращим, оскільки метаболізм метанолу використовує

кисень з високою швидкістю, а надлишок метанолу є токсичним для клітин. rHuEPO, отриманий в цих умовах, становив $> 5 \text{ мг л}^{-1}$, тоді як відомо, що виробництво рекомбінантних клітин *P. pastoris* варіюються від 1 до 1000 мг л^{-1} [50]. З іншого боку, rEPO, що секретувався з інших систем експресії без участі ссавців, становив $0,03 \text{ мг л}^{-1}$, 18 мг л^{-1} та 20 мг л^{-1} . Отримані результати свідчать про те, що шляхом подальшої оптимізації умов експлуатації середовища та біореактора можна отримати значно більші концентрації клітин (і, отже, більш високі кількості рекомбінантного білка) [51].

1.3 Особливості створення різних груп рекомбінантних продуцентів

Для отримання препарату еритропоетину використовують різні групи продуцентів, до них відносяться бактеріальні, еукаріотичні, рослинного та тваринного походження. Проте для створення певних рекомбінантних штамів необхідним є використання генної інженерії, а саме плазмід та міток, які вбудовуються в ДНК хазяїна-носія.

У своїй роботі, вчений *Jeong TH* описав дослідження, що стосується створення рекомбінантного продуцента на базі *E.coli* BL21. Як вектор експресії використовували вектор призначення на основі рЕТ22b, який дозволяє включити різні білкові мітки на N-кінці кодованого білка. Для ампліфікації гена hEpo використовували два праймери -GCGCTGGGCGCGCAGAAAGAAGCTATCAGTC-30 GACTGATAGCTTCTTTCTGCGCGCCCAGCGC-30.

Далі вбудовували кодооптимізований ген rhEpo у вектор pDONR 207 із застосуванням системи клонування БП (ретробінація ВР). Сайт розпізнавання протеази TEV (ENLYFQ; G) був вставлений перед амінокислотною послідовністю rhEpo. Для отримання вектор, що експресуватиме еритропоетин, ген rhEpo в рENTR-rhEpo клонували в рHGWA (His6), рHGGWA (GST), рHXGWA (TRX), рHNGWA (NusA) та вектори рHMGWA (MBP) з використанням системи клонування рекомбінації LR (Invitrogen). Після підтвердження послідовності ДНК rhEpo, отримані плазміди вводили в *E. coli* BL21 (DE3) [52].

Вчені з Національного дослідницького центру епідеміології та мікробіології ім. Н.Ф. Гамалеї (*Груніна* зі співавторами) вдалося провести декілька досліджень, що стосуються експресії рекомбінантного еритропоєтину в кишковій паличці *E. coli* BL21. Ген, що кодує амінокислотну послідовність білка Entero EPO, що складається з послідовності сайту гідролізу Ентерокінази (Entero) і EPO, та несе на 5' кінці сайт BamHI, а на 3' кінці - сайт Kpn2I, з оптимізованим кодонним складом і вторинною структурою РНК був одержаний синтетично. Оптимізацію кодонного складу синтетичного гена для експресії в *E. coli* проводили за допомогою програми JCat (<http://www.jcat.de/>). Нуклеотидні послідовності синтезували на фірмі «ЄВРОГЕН» (Росія). Після цього синтетичний ген вводили в плазмиду pET30a (+) по сайтам BglII і AgeI. В результаті клонування на основі *E. coli* BL 21 був отриманий продуцент білка 6His s tag EPO, що несе на N кінці шість залишків гістидину (6His) і s tag [53].

У наступній роботі вищевказані автори (*Карягіна* зі співавторами) описали дослідження, що стосуються отримання рекомбінантного еритропоєтину з додатковим гепарин-зв'язуючим доменом. Кодування синтетичного гена HBD від *Danio rerio* BMP2 відбувалося за допомогою злиття EPO людини з сайтами NcoI та Kpn2Iase на 5' та 3' кінці, відповідно, та був синтезований за допомогою Eurogen (Росія). Кодонний склад гену HBDEPO був оптимізований за допомогою програмного забезпечення JCat; вторинна структура транскрибованого РНК була вдосконалена за допомогою полотна DINAMelt. Для генерації в плазмиду L610 синтезований ген клонували в вектор pQE6 на сайтах NcoI та Kpn2I [54].

Наступне дослідження авторів (*Карягіна* зі співавторами) стосувалось синтезу рекомбінантного еритропоєтину в кишковій паличці *E. coli* штаму M15. Синтезований ген EPOHBD (Євроген, Росія), що кодує EPO людини та HBD від *Danio rerio* BMP2 був фланкований NcoI і Kpn2I сайтами на 5' та 3' кінці відповідно. Оптимізація композиції синтетичного гену кодона, корекція транскрибованої вторинної структури РНК, обчислення молекулярної маса та теоретичної ізоелектричної точки (pI) здійснювали, використовуючи стандарт підходи, описані в публікаціях Карягіна та співавт. Ген EPOHBD був вбудований у

плазмиду рQE6 сайтами NcoI та Kpn2I; отриману плазмиду використовували для перетворення клітин *E. coli* M15 у продуцента, який використовують для синтезу EPOHBD [55].

Вчені з Туреччини (*Pinar Çalik* зі співавторами) розробили і дослідили рекомбінантну систему експресії еритропоетину, використовуючи клітинну лінію дріжджів *Pichia pastoris* X-33. КДНК EPO ампліфікували з штаму-хазяїна *E. coli*, що несе плазмиду рENTR™ 221 людського еритропоетину ORF і ген стійкості до антибіотиків - канаміцину. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з рENTR™ 221 були сконструйовані праймери для ампліфікації кДНК EPO, і були додані - сайт рестрикції Eco RI, послідовність мітки бхHis і послідовність впізнавання фактора Ха, саме кінець EPO послідовності під час ампліфікації. Було розроблено два прямих праймера EPO-F3-1 (5' CACCATATTGAAGGGAGA GCCCCACCACGCCTCATC3') і EPO - F3-2 (5' GAATTCCACCATCACCATCACCATATTGAAGGGGAG3 ') Зворотний праймер ИЙ-R3 (5' CCACGC TCTAGATTA GTCCCCTGTCCTGC3 ') був розроблений таким чином, що сайт рестрикції був присутній на 3'-кінці EPO послідовності, стоп - кодони і Xba. Дані праймери були синтезовані MWG Biotech (Еберсберг, Німеччина). Човниковий вектор рPICZαA (Invitrogen) розмножували в хімічно компетентних клітинах-господарях *E. coli* TOP10 (Invitrogen), вирощених в середовищі з низьким вмістом солі Luria-Bertani (LSLB). Дане середовище містить триптон, 10 мг/мл; дріжджовий екстракт – 5 мг/мл; NaCl 5 мг/мл; Зеоцін, 0,025 мг/мл (Invitrogen). Очищений від ПЛР-ампліфікації фрагмент ДНК і вектор рPICZαA були двічі розщеплені за допомогою Eco RI та Xba I (Roche, Мангейм, Німеччина). Для трансформації *E. coli* використовували очищений фрагмент ДНК та вектор в реакції лігування (Sambrook і Russell 2001). Плазмиду, виділену зі стійких до зеоціну колоній, оцінювали аналізом розщеплення рестриктазою, ампліфікацією ПЛР з використанням праймерів 5' AOX1 (5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC3') і 3' AOX1 (5' GCAAATGGCATTTCTGACATCC3') (Invitrogen) і шляхом секвенування ДНК в флуоресцентному секвенаторі ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Очищену плазмиду pPICZ α A, використовували для трансформації штаму-хазяїна дикого типу *P. pastoris* X-33 за допомогою методу трансформації хлориду літію [56].

Вченим (*Ser Huy Teh* зі співавторами) вдалося реалізувати технологію конструювання гену рекомбінантного еритропоетину вбудованого в *Pichia pastoris*. Весь ген еритропоетину людини був сконструйований за допомогою сплайсингу методом PCR (SOE-PCR). Для ампліфікації чотирьох екзонів гена еро на основі нуклеотидної послідовності GenBank були розроблені чотири набори праймерів. Задля полегшення перекриття праймери, що покривають межі екзон-інтрону, були розроблені таким чином, щоб вони могли містити шість нуклеотидів, які доповнювали суміжні екзони. Задля генерації липких кінців, що сприяє полегшенню клонування, у вектор експресії pPICZ α A в праймери на обох кінцях гена-мішені був включений сайт EcoRI (GAATTC).

Чотири екзони гена ЕРО спочатку ампліфікувались поодинокі, використовуючи людську геномну ДНК як матрицю. Після ПЛР продукти очищали екстракцією гелю за допомогою комерційного набору (Qiagen, США). Суміжні екзони були зібрані у другій реакції ПЛР, дозволяючи ексонам утворювати часткові гетеродуплекси в областях, що перекриваються, з подальшою селективною ампліфікацією за допомогою кінцевих праймерів. ПЛР проводили з використанням полімераз Pfu (Fermentas, Литва), реакційного буфера, Mg²⁺ + та 200 мг/мл кожного dNTP (Fermentas, Литва). Сама ПЛР складалася з 10 циклів денатурації при 95 ° C протягом 45 с, відпалу при 60 ° C протягом 45 с і подовження при 72 ° C протягом 1 хв. Умови циклічного проведення ПЛР включали початкову денатурацію при 95° C протягом 3 хв, а потім 32 цикли, що включали денатурацію при 95 ° C протягом 45 с, відпал при 60 ° C протягом 45 с і подовження при 72° C протягом 1 хв, з остаточним подовженням при 72 ° C протягом 5 хв. Ці три стадії ПЛР повторювали, поки не був отриманий весь ЕРО-ген. Всю конструкцію ЕРО-гену розщеплювали за допомогою EcoRI та лігували у відповідний сайт у векторі експресії плазмиди *Pichia* pPICZ α A. Цей вектор має сильно індукований промотор (AOX1) та сигнал секреції (α -фактор). Рекомбінантні плазмиди трансформували в *E.*

coli (штам TOP10F) для виділення у більшому масштабу. Потім рекомбінантний pPICZ α A лінеаризували обробкою SalI (Fermentas, Литва) і хімічно трансформували в *P. pastoris* (штам X-33), дотримуючись протоколу в посібнику з експресії Pichia (Invi-trogen, США). Нуклеотидна послідовність конструкції рекомбінантних епогенів була підтверджена секвенуванням ДНК. Було сконструйовано два рекомбінантні епо-гени (pPICZ α -rhEPO-Stop та pPICZ α -rhEPO-His). Стоп-кодон (TGA) вводили в pPICZ α -rhEPO-Stop для отримання зрілого EPO, яке складалось з 165 амінокислот. Для експресії злитого білка, що містить полігістидинову мітку (pPICZ α -rhEPO-His), ген rhEPO клонували в рамці з C-кінцевим пептидом. Обидва вектори містили природну сигнальну послідовність α -фактора, яка забезпечує ефективну секрецію більшості білків з *P. Pastoris* [57].

1.4 Особливості експресії у різних груп продуцентів

Для клінічного застосування EPO отримують біосинтезом в клітині за допомогою технології рекомбінантної ДНК. Такий EPO є продуктом експресії людського гена EPO, клонованого в культурі клітин *E. coli*. Для збільшення періоду утримання активного білка EPO, в місці аплікації використовують білок, іммобілізований на біологічно сумісному матеріалі, наприклад, ДКМ. Даний підхід застосовується шляхом отримання гібридного білка EPO з поліпептидним гепарин-зв'язуючим доменом HBD (конструкції HBD-EPO) [58].

Одне з досліджень відноситься до рекомбінантного білка HBD-EPO, експресійного вектору pL610 і композиції (демінералізування кісткового матриксу (ДКМ), який містить білок HBD-EPO, а також ДКМ, що містить білок HBD-EPO і BMP-2), спрямованого на стимулювання остеогенеза. Дослідження дозволило отримати стійкий очищений активний білок HBD-EPO, а також іммобілізувати його на ДКМ, в тому числі на ДКМ з кістковим морфогенетичним білком BMP-2.

Технічна сторона досліду виражається в отриманні рекомбінантного білка HBD-EPO в клітинах непатогенних мікроорганізмів - прокаріотів (штамів *Escherichia coli*), тим самим досягається здешевлення одержуваного продукту, і підвищення біодоступності EPO шляхом отримання варіанту EPO з гепарин-

зв'язуючим доменом і його іммобілізації на ДКМ при місцевому застосуванні в зоні ураження.

Суть досліджу полягає в одержанні плазмиди, що містить рекомбінантний ген HBD-Еро, і сприяє збільшенню кількості виходу продукту. Синтетичну ДНК з послідовністю, що відповідає гену, яка кодує білок HBD-Еро, сплановану таким чином, щоб нуклеотидний склад кодонів був оптимізований для гетерологічної експресії в непатогенному лабораторному штамі *E. coli*, фланкують на 5'-кінці сайтом NcoI, а на 3'-кінці - сайтом Kpn2I. Синтетичний ген вбудовують в плазмиду pQE6 по сайтам NcoI і Kpn2I і отримують плазмиду pL610. Після трансформації отриманої плазмиди L610 отримують штам-продуцент *E. coli* M15 [pREP4, pL610] з продукцією рекомбінантного білка HBD-Еро в тільцях включень. Розрахункова молекулярна маса рекомбінантного білка HBD-Еро становить ~ 20,5 кДа. Білок HBD-Еро відновлюють в розчині, що містить дітіотреїтол або меркаптоетанол, і очищають хроматографією на катіонообмінному сорбенті в якості нерухомої фази в денатуруючих умовах, після чого активну форму HBD-Еро концентрують на катіонообмінному і / або афінному сорбенті (гепарин-сефарозі) [59].

Інше дослідження стосується синтезу рекомбінантного білка HBD-Еро в клітинах лабораторного штаму *E. coli*, що несуть рекомбінантну плазмиду pL610 (з нуклеотидної послідовністю SEQ ID NO 1, а також за рахунок створення комплексного препарату HBD-Еро, іммобілізованого на ДКМ і на ДКМ, що містить BMP-2.

Рекомбінантний білок HBD-Еро має амінокислотну послідовність SEQ ID NO 2, що включає послідовність амінокислотних залишків гепарзв'язуючого домену з *Danio rerio* (SEQ ID NO 3), послідовність амінокислотних залишків спейсера (SEQ ID NO 4), послідовність амінокислотних залишків білка Еро з *Homo sapiens* (SEQ ID NO 5). Розрахункове значення молекулярної маси білка 20520,51 Так; розрахункове значення ВЕТ 9,62.

Технічним результатом, є отримання високого рівня продукції білка HBD-Еро, який після очищення формує стабільну активну форму, здатну зв'язуватися з гепарином ДКМ і індукувати прискорену регенерацію кісткової тканини.

Активність рекомбінантного білка HBD-Еро в розчині була досліджена *in vitro* на лінії клітин еритролейкемії людини TF-1 (ATCC CRL-2003). Результат виявився в вигляді специфічної стимуляції проліферації клітин і розвитку забарвлення при додаванні до клітин специфічного субстрату.

У частині формулювання препарату рекомбінантного білка HBD-Еро, іммобілізованого на ДКМ, технічний результат досягається за рахунок створення рекомбінантного білка HBD-Еро з послідовністю SEQ ID NO 2, а також за рахунок отримання композиції, в якій рекомбінантний білок HBD-Еро міститься у вигляді комплексу з гепарином в складі ДКМ і у вигляді комплексу з гепарином в складі ДКМ, що містить BMP-2.

Крім того, технічним результатом є те, що зазначені біологічно активні композиції специфічно і ефективно індують регенерацію кісткової тканини [30].

Наступний дослід стосувався створення рекомбінантного штаму синтетичним способом. Ген HBD-Еро був синтезований фірмою ЄВРОГЕН (Росія). За кодонним складом ген HBD-Еро був оптимізований для експресії в *E. coli* і був фланкований на 5'-кінці сайтом NcoI, а на 3'-кінці - сайтом Kpn2I. Оптимізацію кодонного складу синтетичного гена проводили за допомогою програми JCat (<http://www.jcat.de/>), коригування вторинної структури транскрибуємої РНК - за допомогою веб-сервера DINAMelt. Синтетично-створений ген вбудовували в плазмиду pQE6 по сайтам NcoI і Kpn2I. Отриману конструкцію pL610 з нуклеотидної послідовністю SEQ ID NO 1 трансформували в штам *E. coli* M15 [pREP4] і отримали штам-продуцент *E. coli* M15 [pREP4, pL610] з рівнем продукції білка HBD-Еро рівним 30% від тотального білка клітини. Для отримання мембран з ДКМ діафізи стегнових кісток великої рогатої худоби розрізали за допомогою стрічкової пилки на шари товщиною 1 мм і в такому вигляді проводили знежирення, декальцінування і депротейнізацію з метою видалення неколлагенових білків, після чого вирізали диски діаметром 4 мм і ліофілізували. Для іммобілізації HBD-Еро кожен диск поміщали в 100 мл розчину, що містить 10 мкг HBD-Еро в буфері, що містить 0,5 М NaCl і 25 мМ Тріс-НСl, рН 7,5, інкубували 3 години, після чого проводили трикратне відмивання тим самим буфером і ліофілізацію. Вміст

HBD-Еро становив 10 мкг на один диск. Після цього диски заморожували, ліофільно висушували і стерилізували радіаційним способом [60].

Yin-Jue Wang зі співавторами провели дослідження використовуючи плазмиду pMD18T / Еро, що кодує кДНК повної довжини. Дану плазмиду використовували як шаблон для посилення Еро з двома праймерами (передній 5'-ATTAATCCATGGCACCGCCGCGTCTGATTTGTGATAGC-3 і зворотний 5'-ACTTGCCTCGAGTTAACGGTCCCGGTACGGC-3) від полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). В клоновану ДНК вбудовували рЕТ-15b (Novagen, Німеччина) для отримання рЕТ-15b / Еро. Дана плазміда була побудована для надмірної експресії Еро і введена в *E. coli* BL21 (DE3) [61].

Дослідження проведені німецькими вченими *Poornima Devi Gurusamy* зі співавторами присвячувались експресії рекомбінантного еритропоетину в клітинах *Nicotiana tabacum*. Для створення трансгенної форми рослин ЕРО ген ампліфікувати з кДНКа з використанням специфічних праймерів гена F1 5' GCCGAGCTTCCC GGGATG 3' і R1 5' GAGTGAGCTCAGGCGTCTTC 3'.

Рекомбінантну плазмиду p^{Drive} rh EPO секвенсували з M13 вперед 5' GTAAAACGACGGCCAG 3' та назад праймером 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3' з використанням комплекту циклу секвенування циклів DYEnamic ET. Дана плазміда побудована для підвищення концентрації рекомбінантного еритропоетину [62].

У своїй роботі, вчені інституту Гамалеї провели дослідження щодо створення рекомбінантного еритропоетину з додатковим N-кінцевим гепарин-зв'язуючим білковим доменом (HBD) з кісткового морфогенетичного білка. Синтетичний ген, що кодує HBD від *Danio rerio* BMP-2, зшивали з ЕРО людини і з місцями рестрикції ендонуклеази NcoI та Kpn2I на 5'- та 3'-кінцях, відповідно. Склад кодону гена HBD-ЕРО був оптимізований за допомогою програмного забезпечення JCat; вторинна структура транскрибованої РНК була виправлена за допомогою веб-сервера DINAMelt. Синтезований ген клонували у вектор рQE6 сайтами NcoI та Kpn2I для генерування плазмиди рL610, яка використовувалася для трансформації клітин *E. coli* М-15. Результати показали, що

біологічна активність ЕРО показує функціональну активність отриманого препарату білка [63].

РОЗДІЛ 2. ПРЕПАРАТИ РЕКОМБІНАНТНИХ ЕРИТРОПОЕТИНІВ І ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Багато захворювань і патологічних станів супроводжуються зниженням кількості еритроцитів і, відповідно, гемоглобіну, що призводить до зниження "кисневої ємності крові" і розвитку симптоматичної анемії. Однією з причин даного виду анемії є зниження або повне припинення синтезу еритропоєтину. Зниження синтезу еритропоєтину розвивається на тлі таких важких станів, як пухлинний процес, ниркова недостатність, СНІД і ін. Лікування анемії у хворих з даною патологією можливо з використанням тільки двох методів - гемотрансфузія (переливання крові) або введення в організм аналога еритропоєтину. В організмі еритропоєтин синтезується в мізерних кількостях, тому єдиним методом отримання ендогенного аналога еритропоєтину є генно-інженерна технологія з використанням рекомбінантної ДНК. Розвиток біотехнології, в першу чергу методів генної інженерії і високого ступеня очищення біопрепаратів, дозволило значно збільшити кількість і номенклатуру рекомбінантних епоєтин. Однак, нормативні вимоги для оцінки якості, проведення доклінічних і клінічних досліджень препаратів рекомбінантних еритропоєтинів відсутні.

2.1. Хімічна будова, механізм синтезу і основні функції еритропоєтину

Еритропоєтин є глікопротеїном і належить до групи цитокінів І класу (сімейство факторів гемопоєтичних клітин), що підтримують життєздатність і проліферацію кровотворних клітин. Будучи основним регулятором еритропоезу, еритропоєтин стимулює утворення еритроцитів з пізніх клітин-попередників і підвищує вихід ретикулоцитів з кісткового мозку [65]. Вперше еритропоєтин був виділений і очищений з сечі хворого апластичну анемію в 1977 році, молекула природного еритропоєтину складається з 165 амінокислотних залишків. Еритропоєтин є гетерогенним глікопротеїном, що складається з декількох різних

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ					
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 2. ПРЕПАРАТИ РЕКОМБІНАНТНИХ ЕРИТРОПОЕТИНІВ І ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКА					
<i>Розроб.</i>	Приймак Д.							<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Перевір.</i>	Пенчук Ю.М.							33	14	
<i>Реценз.</i>								Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>										
<i>Затверд.</i>	Пирог Т.П.									

ізоформ, що утворюються переважно шляхом гликозилювання [66]. Сахара приєднуються до протеїну в ділянках гликозилювання шляхом утворення однієї О-зв'язку (серин) і трьох зв'язків (аспарагін).



А



Б

Рис. 2.1. структура молекули еритропоетину. А - двумірний модель молекули еритропоетину: "=" - дисульфідний зв'язок, М - манноза, в - галактоза, • - амінокислоти, N - ацетилглюкозамін, N - ацетилгалактозамін. Б - просторова модель молекули еритропоетину.

Тривимірний структура еритропоетину формується за рахунок двох дисульфідних зв'язків між цистеїну. Молекула еритропоетину представляє зв'язані між собою чотири α -спіралі, які згорнуті в компактну кулясту структуру (рис. 2.1).

Вуглеводи складають 40-50% маси молекули глікопротеїну, при цьому близько 17% припадає на сіалова кислоту. Молекулярна маса глікопротеїну 32-36 кДа, розрахункова маса білкової частини - 18,4 кДа. Ізоелектрична точка еритропоетину низька рІ 3,5-4,0, що зумовлено наявністю сіалових кислот в термінальних відділах вуглеводних ланцюжків [67].

Молекули еритропоетинів мають схожу будову у різних видів тварин, гомологія становить 80%.

У дорослої людини основна кількість еритропоетину синтезується нирками і до 10-15% синтезується гепатоцитами і епітеліальними клітинами, що оточують центральні вени. Сигналом до вироблення еритропоетину в організмі є зниження парціального тиску кисню в циркулюючій крові. У нормі вміст еритропоетину в крові коливається в межах 10-15 мМО/мл, що дозволяє підтримувати еритропоез на рівні $1,8 \cdot 10^9$ ретикулоцитів в хвилину. Серйозне кровотеча може викликати збільшення продукції еритроцитів в 10-12 разів, за рахунок підвищення в плазмі рівня еритропоетинів до 10000 мМО/мл. Період напіввиведення еритропоетину становить від 6 до 10 годин. У нормі еритропоетин виводиться нирками, потрапляючи в сечу з крові, а не з клітин нирок.

Порушення синтезу еритропоетину нирками супроводжується зниженням синтезу еритроцитів і розвитком анемії. Придушення активності еритропоезу розвивається при патології нирок, при пухлинному процесі (в результаті синтезу великої кількості прозапальних цитокінів та хіміотерапії), при дії факторів, що пригнічують поділ клітин (радіаційне випромінювання і т.п.) і ін. Розробка технології отримання рекомбінантних еритропоетинів (rHuEPOs) відкрила нову еру лікування анемії, обумовлених зниженим синтезом еритропоетину [68].

2.2. Основні види рекомбінантних еритропоетинів

Еритропоетин є першим цитокіном, який був клонований і отриманий у вигляді рекомбінантного білка. Еритропоетин, отриманий з використанням клітин комах (з вектором на основі бакуловірусів), мав молекулярну масу 23 кДа і знижена кількість вуглеводних ланцюжків. В системі *in vitro* біологічна активність

даного еритропоетину відповідала нативному, проте в дослідженнях *in vivo* була встановлена його більш низька біологічна активність. Бактеріальна система синтезу рекомбінантного еритропоетину не дозволила отримати глікопротеїн, в якому гликозилювання відповідає (або подібно) нативному еритропоетину [69]. Відомо, що бактеріальна клітина має систему гликозилювання, що принципово відрізняється від еукаріотичної. Препарат, синтезований в системі клітин *Escherichia coli*, розпізнав антитілами проти еритропоетину і мав молекулярну масу, відповідну деглікозілюванню еритропоетину.

Найбільш вдалимися з'явилися дослідження Lin F.K. з співавт. [69], які першими отримали еритропоетин в культурі клітин лінії CHO (епітеліоподобні клітини з яєчника китайського хом'ячка). Для цього була використана плазмида, яка містила ген еритропоетину людини під контролем промотора пізніх генів вірусу SV40.

Для отримання наступного рекомбінантного еритропоетину використана лінія клітин з нирки хом'ячка (ВНК), в які вбудовували дві плазмиди, Одна з яких містила ген еритропоетину людини, інша - ген дегідрофолатредуктази.

Розробка технології отримання rHuEPOs на основі клітин лінії CHO дозволила почати промисловий випуск лікарських препаратів на основі рекомбінантних еритропоетинів. Питання про те, які критерії повинні бути покладені в основу при визначенні МНН рекомбінантним еритропоетинам, розглядалися в 1989, 2009 і 2010 міжнародною групою ВООЗ (Consultation on International Nonproprietary Names), яка щорічно розглядає питання, пов'язані з присвоєнням МНН лікарських засобів. При появі перших рекомбінантних еритропоетинів було мало інформації про їх фізико-хімічних і біологічних властивостей. Надалі, з появою нових препаратів, стало зрозуміло, що препарати рекомбінантних еритропоетинів розрізняються між собою за ступенем гликозилювання. Практично неможливо в різних виробничих умовах отримати абсолютно ідентичні препарати, навіть при подібності амінокислотної ланцюжка вони будуть відрізнятися за якісними і кількісними характеристиками полісахаридних ланцюжків. Тому було прийнято рішення про те, що для

визначення МНН рекомбінантних препаратів еритропоетинів буде використовуватися корінь - poetin, а приставка (префікс) буде визначатися в залежності від того, є чи ні зміна амінокислотної ланцюжка. При незмінній амінокислотній послідовності додається "e" - епоетин. Для препаратів, які мають модифіковану послідовність амінокислот приєднується інший префікс (наприклад, дарбепоетин). В даний час відомі дев'ять видів епоетин (альфа, бета, гамма, дельта, епсилон, каппа, омега, тета і дзета). До основного найменування додається буква грецького алфавіту, яка характеризує особливості гликозилювання, фактично це відображає розробку нового виробничого процесу отримання рекомбінантного епоетину.

Препарати рекомбінантних еритропоетинів, зареєстровані органами контролю країн ЄС (EMA), США (FDA), представлені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Зареєстровані лікарські препарати рекомбінантних еритропоетинів в країнах ЄС та США

	Торгова назва	
	Країни ЄС (EMA)	США (FDA)
Epoetin alfa	Abseamed Binocrit Epoetin	Erogen
Epoetin beta	NeoRecormon	
Epoetin theta	Biopoin Eporatio	
Epoetin zeta	Retacrit Silapo	
Darbepoetin alfa	Aranesp	Aranesp
Methoxipoly-ethyleneglycol epoetin beta	Mircera	Mircera

Американська компанія «Amgen», розробивши біотехнологію отримання епоетину альфа в системі клітин CHO, отримала патент на препарат Erogen, після

продажу патенту компанії «Johnson & Johnson», остання почала випускати препарат з найменуванням Procrit для США і найменуванням Eprex для інших країн.

Епоетін бета, який синтезується клітинами СНО, був розроблений двома фірмами «Roche» і «Chugai» і вступив на ринки під назвами Neo-Recomon (Ф. «Roche») і Erogin (Ф. «Chugai»).

Наступним rHuEPO є препарат епоетин омега, для синтезу якого були використані клітини нирки хом'ячка. Права на препарат Eromax придбала фірма «Baxter», яка не стала далі розвивати препарат.

Європейські фірми «Transkaryotic» і «Aventis» розробили технологію отримання препарату Дунеро (епоетин дельта), який синтезується пухлинними клітинами фібросаркоми людини (HT-1080). Серед усіх рекомбінантних препаратів, епоетин дельта має найбільшу схожість з нативним еритропоетином, в ньому також не міститься N-гліколілнейраміновая кислота. Препарат випускався близько року і потім з комерційних причин його випуск був припинений. В даний час фірма «Sanofi-Aventis» готується до випуску препарату ДунЕро (еритропоетин сигма), також синтезованого клітинами фібросаркоми людини (HT-1080).

До відтвореним препаратів епоетину альфа відноситься розроблений «Japan Chemical Research Pharmaceuticals Co.» і схвалений Японським національним органом контролю як препарат епоетин каппа. У країнах ЄС розроблені і зареєстровані відтворені препарати епоетину альфа: Binocrit («Sandoz»), Eроetin alfa Hexal («Hexal Biotech»), Abseamed («Medice Arzneimittel») і препарати епоетину Зета: Silapo («Stada») і Retacrit (« Hospira ») [70].

У Російській Федерації, за даними реєстру лікарських засобів Міністерства охорони здоров'я, розробити й подати випускаються препарати епоетину альфа (ДержНДІ ВЧБ) і епоетину бета («Фармапарк», «Мікроген», «Біннофарм», «Ленс-Фарм» і ЗАТ МТХ).

Поруч зарубіжних фірм розроблені нові лікарські препарати еритропоетинів, що характеризуються більш високою ефективністю. Одним із шляхів підвищення ефективності rHuEPOs є збільшення часу циркуляції в крові препарату за рахунок

утворення неміцною зв'язку активного центру епоетину з відповідним рецептором на клітинах, що дозволяє йому багаторазово активувати рецептор до еритропоетину. Цього можна досягти шляхом використання одного з двох підходів - за рахунок збільшення молекулярної маси самого гНіЕРО або в результаті його полімеризації. Фірма «Атдеп» розробила препарат дарбепоетіна (епоетин альфа), в якому до амінокислотної ланцюжку приєднані 2 додаткові вуглеводні ланцюжки в положенні Asn30 і Asn88. В результаті цього, кількість сіалових залишків збільшилася до 22, частка вуглеводного компонента підвищилася до 52% молекулярної маси, яка склала 37,1 кДа.

Компанія «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд.» розробила препарат Мігсега, в якому молекула епоетину бета приєднана до метоксіполіетіленгліколю. Дана комбінація дозволила підвищити молекулярну масу до 60 кДа, при цьому полімеризація гНіЕРО викликала зниження спорідненості активного центру еритропоетину до відповідного рецептора на клітинах [71].

2.3. Фізико-хімічні і біологічні властивості препаратів рекомбінантних епоетинів

Фізико-хімічні характеристики визначають такі властивості препарату, як стабільність, активність, фармакокінетичні та фармакодинамічні параметри, імуногенність та ін., Які в кінцевому підсумку впливають на профіль безпеки та ефективності застосування лікарських препаратів рекомбінантних еритропоетинів.

Амінокислотна ланцюжок молекули еритропоетину є стабільною структурою, а вуглеводна частина молекули може змінюватися. Наприклад, олігосахариди ділянок глізілірованія можуть містити 2, 3 або 4 відгалуження. У кожному з відгалужень в термінальному відділі прикріплені негативно заряджені сіалові кислоти, які повідомляють кислотні властивості глікопротеїну. Вуглеводи О-ділянки або не містять, або містять до 2 сіалових кислот (рис. 2.2).

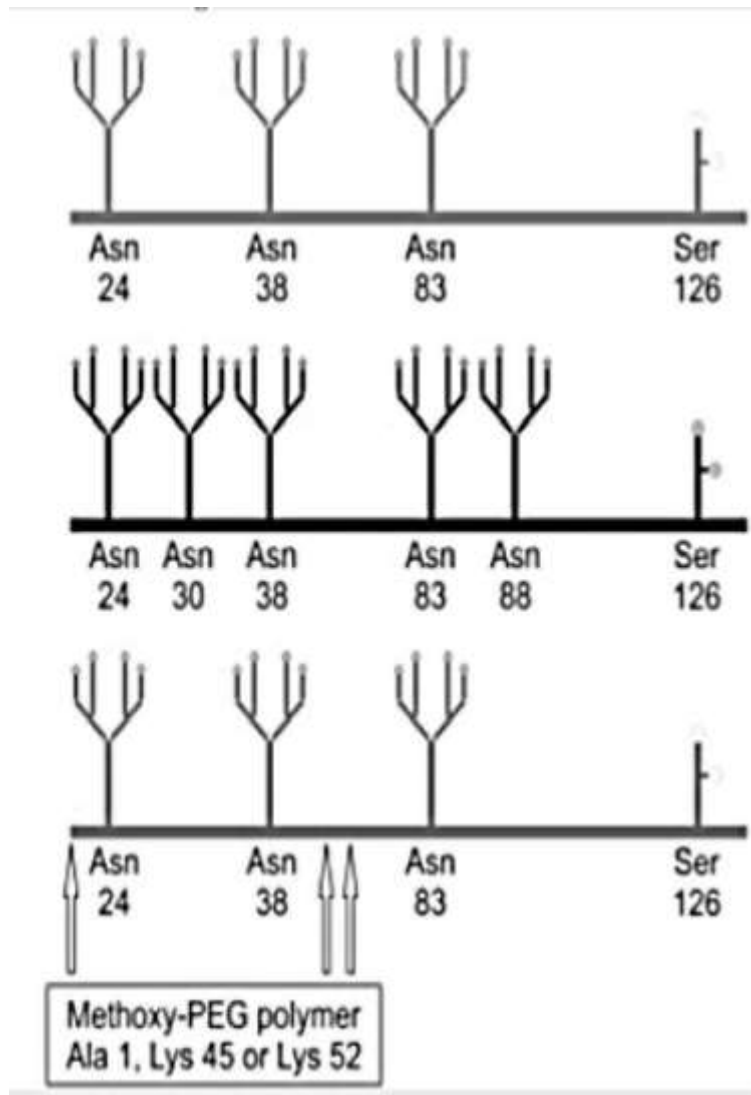


Рис. 2.2. Варіанти глікозилювання: перший ряд - глікозилювання епоетину альфа, бета тощо; другий ряд - глікозилювання дарбепоетинів; третій ряд - вуглеводні ланцюжки пегильованого епоетину.

Кількість сіалових залишків в молекулі HuEPOs може досягати 14, що становить близько 17% від усіх вуглеводних компонентів в складі глікопротеїну. Вивчення рекомбінантного епоетину альфа показало його неоднорідність, яка включає присутність ізоформ з вмістом від 9 до 14 сіалових кислот. За даними міжнародних досліджень біологічна активність різних ізоформ епоетину різна [72].

**Показники фармакокінетичних властивостей рекомбінантних
еритропоєтинів**

	Епоєтин альфа	Епоєтин бета	Дарбепоеєтин (епоєтин альфа)	Метокси- поліетилен- гліколь епоєтин бета
Молекулярна маса (кДа)	29,9	29,9	37,1	60
Вміст вуглеводів (%) в молекулі	40	40	52	не виснач.
Період напіввиведення при в/в (год)	4 - 6	4 - 12	21	134
Період напіввиведення при п/к (год)	24	13 - 28	73	139 - 142
Час досягнення максимальної концентрації при п/к введенні (год)	12-18	12 - 28	54	72 - 95
Біодоступність після п/к введення (%)	до 20	23 - 42	37	54 - 62
Кількість введень при лікування анемії в тиждень	2	1 - 3	0,5 - 1	0,25 - 0,5

Кількісний та якісний склад вуглеводної частини молекули HuEPOs визначає стабільність і специфічну, біологічну активність еритропоєтину. При відщепленні всій вуглеводної частини молекули rHuEPO за допомогою гликозидаз спостерігається втрата до 80% активності, що оцінюється в тестах *in vitro*. При

ферментативної обробці глікозильованого еритропоетину з видаленням всіх залишків сіалова кислоти відбувається втрата активності еритропоетину *in vivo*, при збереженні активності *in vitro*. Більш активне зниження активності *in vivo* пов'язано з тим, що при відсутності в термінальному відділі вуглеводного ланцюжка сіалова кислоти, відбувається зв'язування глікопротеїновими ланцюжка еритропоетину з азіалоглікопротеїном. Утворений азілоерітропоетін активно виводиться з організму з сечею. Тому, чим більше сіалових залишків в бічному ланцюзі, тим більше часу циркулює rHuEPO в крові. У той же час, чим менше вміст сіалових залишків в бічному ланцюзі, тим активніше rHuEPO взаємодіє з рецептором до еритропоетину на клітинах. Всі ці дані вказують на істотну роль структури вуглеводного компонента для біологічної активності еритропоетину *in vivo*. Мабуть, більш висока активність *in vitro* тих форм еритропоетину, які містять неповний вуглеводний компонент, пов'язана з полегшенням взаємодій еритропоетину з рецепторами. У той же час, мабуть, саме вуглеводний компонент забезпечує стабільність еритропоетину в організмі і відповідно високий рівень біологічної активності в тестах *in vivo*. Слід зазначити, що в організмі людини в печінці відбувається деградація rHuEPOs, при якій відбувається поступове відщеплення сіалових кислот [74].

Клінічні випробування рекомбінантних еритропоетинів показали, що особливості хімічної будови rHuEPOs визначають, перш за все, фармакокінетичні властивості препаратів. Наприклад, епоетин бета містить більшу кількість основних ізоформ, які викликають більш активне зв'язування з лектинами (*Erythrina cristagalli*, *Lycopersicon esculentum*, *Phaseolis vulgaris* і *Agaricus bisporus*), в порівнянні з епоетином альфа. В результаті цього, біологічна активність *in vitro* епоетину бета вище, ніж епоетину альфа. При внутрішньовенному введенні здоровим добровольцям розподіл препарату епоетину бета вище (16,9%) в порівнянні з епоетином альфа (7,7%), а період напіввиведення на 20% більше, в порівнянні з епоетином альфа. При підшкірному введенні епоетину бета рівень ретикулоцитоза вище, ніж при введенні епоетину альфа. Крім того, при підшкірному введенні больові реакції на епоетин бета ($0,08 \pm 0,06$ од) менш

виражені, ніж на введення епоетину альфа ($1,75 \pm 0,19$ од). Ефективність лікування в цьому дослідженні, склала для препарату епоетину альфа 48%, для епоетину бета - 83% [75].

Дарбепоеїн відрізняється від двох попередніх препаратів наявністю двох додаткових вуглеводних ланцюжків в N області гликозилювання (рис. 2.2). Збільшення структури і молекулярної маси в препараті дарбепоеїн дозволило значно підвищити період напіввиведення rHuEPO до 21 год при внутрішньовенному введенні і до 73 год при підшкірному введенні, щодо епоетин альфа і бета (4-6 і 4-12 год при внутрішньовенному введенні і 24 і 13-28 год при підшкірному введенні відповідно) (табл. 2.2).

Полімеризація rHuEPO в препараті Мирцера, незалежно від шляху введення, привела до підвищення періоду його напіввиведення до 134-142 год. При цьому біодоступність препарату підвищується з 20%, яка визначається у препаратів епоетину альфа, до 54-62% у пегільованих епоетин. Дані особливості фармакокінетики дозволяють при лікуванні пегільованим препаратом вводити препарат підшкірно 1 раз в 2 тижні, в той час як препарат епоетин альфа - 2 рази на тиждень. Крім того, низька спорідненість полімеризованого rHuEPO до рецептора еритропоетину на клітинах, дозволяє йому багаторазово активувати рецептор протягом тривалого часу.

2.4. Оцінка якості рекомбінантних еритропоетидинів

Використання технології рекомбінантної ДНК для виготовлення лікарських препаратів rHuEPOs не дозволяє отримати повну копію оригінального стандартного препарату. Тому препарати rHuEPOs, що випускаються різними фірмами, мають відмінності за показниками якості, безпеки та ефективності їх застосування.

Найбільш докладно сучасні вимоги до оцінки якості рекомбінантних еритропоетинів викладені в загальній фармакопейній статті Еритропоетин, концентрований розчин (Erythropoietin concentrated solution), яка була включена до Європейської Фармакопеї в 2008 р [76]. До цього моменту кожен виробник

представляв власні вимоги для оцінки якості лікарських препаратів рекомбінантних епоетін. Тому в нормативних документах від різних виробників можна зустріти суттєві відмінності за багатьма показниками якості.

Одним з основних показників якості rHuEPOs є оцінка специфічної активності препарату, яка відповідно до Європейської фармакопеї (ЕФ), визначається за активністю ретикулоцитоза у нормоцітемічних мишей при введенні їм випробуваного препарату в порівнянні зі стандартним зразком. Відсутність до 2008 р єдиних вимог до якості препаратів rHuEPOs відбилося на включенні в нормативні вимоги до епоетину альфа ширшого межі допустимих значень за показником специфічної активності (70-140%) в порівнянні з вимогами, введеними ЕФ (80-125%).

До характеристики справжності, крім визначення специфічної активності препарату, відноситься оцінка якісних і кількісних показників молекули еритропоетину методом капілярного зонного електрофорезу. Згідно вимог ЕФ, піки ізоформ 1-8 на електрофореграмме досліджуваного rHuEPO порівнюють з електрофореграмме стандартного зразка і розраховують площі відповідних піків. Нормативні вимоги за показником справжність, оцінюваного зазначеним методом, для рекомбінантних еритропоетинів, розроблених різними виробниками, істотно розрізняються. Наприклад, ізоформи 1 і 2 відсутні в епоетін альфа, в епоетін бета кількість ізоформ 1 може досягати 4%, а ізоформ 2-29%, тоді як за вимогами ЄФ кількість ізоформ 1 і 2 може бути не вище 15% (табл. 3).

Наступними показниками для якісної і кількісної характеристики справжності молекули еритропоетину є електрофорез в поліакриламідному гелі та імуноблотинг. При детектуванні результатів електрофорезу повинна виявлятися одна смуга, відповідна по положенню і інтенсивності смузі стандартного зразка. Аналогічні значення встановлені і для результатів імуноблоттинга. Дані методи є досить чутливими для кількісної та якісної оцінки молекули rHuEPOs.

Після видалення альбуміну і концентрації досліджуваних зразків при одновимірному вестерн-блот аналізі в препараті Ергех визначалися слабкі смуги в діапазоні значень між 32 і 44 кДа, в препараті Еральфон, крім смуг в цьому

діапазоні, встановлено наявність додаткових смуг в області 50 і 60 кДа. Дані іммуноблоттинга свідчать, що молекулярна маса еритропоєтину в препараті Ергех знаходиться у вузькому діапазоні від 40 до 45 кДа, тоді як молекулярна маса еритропоєтину в препараті Еральфон - в діапазоні від 32 до 45 кДа. Отримані автором результати досліджень свідчать про більш високий ступінь глікозилювання еритропоєтину в препараті Ергех в порівнянні з препаратом Еральфон. Встановлені відмінності можуть впливати на фармакокінетичні характеристики препаратів.

Крім зазначених методів, для повної характеристики справжності препаратів rHuEPOs повинні бути включені метод пептидного картування і аналіз N-кінцевий послідовності. Серед зареєстрованих лікарських препаратів рекомбінантних еритропоєтинів відмінності за даними критеріями відсутні.

Кількісна характеристика рекомбінантних еритропоєтинів включає визначення вмісту білка і сіалових кислот. Згідно зі специфікацією, діапазон допустимих меж вмісту білка в препаратах rHuEPOs різних виробників відповідає 90-110%, тобто зазначені вимоги вищі в порівнянні з вимогами ЄФ - 80-120%. Кількісний вміст сіалових кислот (в перерахунку на ацетілнейрамінової кислоти) на 1 моль еритропоєтину, регламентований нормативною документацією усіх аналізованих препаратів 10-10,4 моль / 1 моль, вимоги ЄФ - не менше 10 моль / 1 моль.

Крім відмінностей між вимогами за показниками якості rHuEPOs, включеними в специфікацію нормативних документів на препарати різних про-ізо-дів-і-те-лей і які включені в ЄФ, є відмінності між показниками, які не регламентовані ЄФ. Наприклад, при більш високому значенні рН 7,0-7,4 в препараті епоєтину Зета, значення осмоляльності вище і знаходяться в межах 260-300 мОсм / кг, щодо препарату епоєтину альфа (6,7-7,3 і 225-275 мОсм / кг) і епоєтину тета (6,3-6,7 і 272-286 мОсм / кг).

Крім зазначених у ЄФ показників якості rHuEPOs, необхідно враховувати, що всі білкові рекомбінантні препарати дуже чутливі до складу допоміжних речовин,

від яких залежить стабільність багатовимірної структури білкової молекули препарату.

Для підтримки стабільності молекул rHuEPO в готовому препараті використовується кілька підходів. Перші закордонні препарати випускалися з використанням набору амінокислот і альбуміну як стабілізатор, потім альбумін був замінений на полісорбат з гліцином. Відомі два основних складу допоміжних речовин для рекомбінантних еритропоетинів. В одному випадку використовується набір амінокислот, сечовини, кальцію хлориду і невеликі кількості полісорбату-20 в нейтральному розчині фосфатного буфера. Другий склад базується на великій кількості полісорбату-80 і гліцину в нейтральному розчині фосфатного буфера. В обох випадках ізотонічність розчину досягається за рахунок додавання натрію хлориду. У вітчизняних препаратах як стабілізатор використовується альбумін людини.

Про важливість вимог до складу допоміжних речовин, якості первинної упаковки і умов зберігання біотехнологічних препаратів свідчать повідомлення про серйозні небажані реакції разі їх порушення або недостатнього обґрунтування для використання. Так, в препараті Eprex (компанії Johnson & Johnson) як стабілізатор спочатку був використаний альбумін сироватки крові людини. Для зниження ризику передачі з альбуміном збудників вірусних інфекцій, а також збудників пріонових енцефалопатій людини, включаючи хворобу Крейцфельда-Якоба, в 1998 р альбумін був замінений на полісорбат-80 і гліцин. При цьому серед хворих, які отримували препарат Eprex, почастишали випадки хіба парціальної красноклеточної аплазії (ПККА) - близько 250 випадків за 3 роки. Розслідування причин ПККА показало, що розвиток аплазії пов'язано з однією серією препарату Eprex, в якому альбумін був замінений на полісорбат-80, препарат був розфасований в шприци з гумовими поршнями, які були не покриті захисним складом. Передбачається, що контакт полісорбату-80 з латексом викликав вилуговування останнього, поява латексу в розчині препарату ініціювало більше інтенсивне прояв імуногенності препарату і як наслідок розвиток ПККА [77].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Передумови виробництва ЛЗ

Анемія, або ж недокрів'я, малокрів'я – це клініко-гематологічний синдром, для якого характерне зниження кількості заліза в сироватці крові, кістковому мозку та депо, внаслідок чого порушується утворення гемоглобіну, а відтак еритроцитів. Значно рідше трапляються анемії при хронічних захворюваннях, ще рідше – анемії, пов'язані з дефіцитом вітаміну В12 або фолієвої кислоти (мегалобластні), гемолітичні та апластичні. За даними ВООЗ, на анемію сьогодні страждає майже чверть населення планети [6].

Поміж вікових груп населення анемія розподілена нерівномірно:

- серед дітей дошкільного віку на анемію у світі страждає близько 47,4 %,
- серед дітей шкільного віку – 25,4 %,
- серед вагітних жінок – 41,8 %,
- серед невагітних жінок – 30,2 %,
- серед чоловіків – 12,7 %,
- серед людей літнього віку – 23,9 % [78].

За даними Центру медичної статистики Міністерства охорони здоров'я України, поширеність анемії у 2018 році становила — 1515,4 на 100 000 населення, що займає 1% у структурі захворюваності [79].

Найбільшою клітинною популяцією крові є еритроцити. Для регуляції їх кількості в організмі навіть виділений окремий фермент, який назвали еритропоетин. Дана речовина виробляється клітинами нирок і в мінімальній кількості - печінки, у відповідь на зниження кисню циркулюючого з кров'ю. Однак так відбувається тільки в здоровому організмі [80].

Численні захворювання здатні істотно знизити вироблення даної речовини, що може потребувати його введення ззовні. Перший еритропоетин виділявся з крові.

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Розроб.</i>		Приймак Д.					47	8
<i>Перевір.</i>		Пенчук Ю.М.				Кафедра БТМ		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.						

На даний момент в аптеках можна купити тільки синтетично отриманий еритропоетин. Це пов'язано з труднощами в отриманні донорського матеріалу, виділення і очищення природної речовини. До того ж штучно отримане з'єднання нічим не поступається природному аналогу. Ціна препаратів еритропоетину залежить від кількісного вмісту в них гормону і компанії виробника. Також препарати можуть відрізнятися в залежності від генетичних матриць, на підставі яких проводиться синтез штучної молекули. За цим принципом виділяють альфа, бета і омега різновиди еритропоетину (епоетину) [81].

Дані препарати застосовують в дозі 0,002 г, три рази на тиждень [82].

Населення світу становить близько 8 млрд людей. Прийmemo, що близько 25 % людей у світі хворіють на анемію, що становить 2 млрд чоловік. Населення України становить близько 42 млн людей. Згідно даних, що наведені вище, станом на 2018 рік на 100000 чоловік припадає 1515 хворих. Отже, в Україні може бути близько 639 801 людини, яка хворіє на анемію, що у подальшому може призвести до летальних наслідків.

3.2. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Еритропоетин — фізіологічний стимулятор еритропоезу. Секретується в нирках і в перисинусоїдальному клітинах печінки. Виробництво еритропоетину печінкою переважає в ембріональній і перинатальній періоди, в той час як ниркова секреція переважає протягом зрілого віку. Він активує мітоз і дозрівання еритроцитів із клітин-попередників еритроцитарного ряду. Секреція еритропоетину нирками посилюється при крововтраті, різних анемічних станах (залізо, фолат- і В₁₂-дефіцитних анеміях, анеміях, пов'язаних з ураженнями кісткового мозку та ін.), При ішемії нирок (наприклад, при травматичному шоці), при гіпоксичних станах.

Секреція еритропоетину нирками також посилюється під впливом глюкокортикоїдів, що служить одним з механізмів швидкого підвищення рівня гемоглобіну та кисень-постачає здатності крові при стресових станах. Рівень

гемоглобіну і кількість еритроцитів у крові підвищуються вже через кілька годин після введення екзогенного еритропоєтину.

Еритропоєтин викликає посилене споживання кістковим мозком заліза, міді, вітаміну В₁₂ і фолатів, яке призводить до зниження рівнів заліза, міді і вітаміну В₁₂ в плазмі крові, а також зниження рівнів транспортних білків — феритину і транскобаламіна.

Еритропоєтин підвищує системний артеріальний тиск. Він також збільшує в'язкість крові за рахунок збільшення співвідношення еритроцитарної маси до плазми крові.

Було показано, що еритропоєтин надає свої ефекти шляхом зв'язування з рецептором еритропоєтину (ЕроR).

Еритропоєтин високо глікозильований (40 % від загального молекулярного ваги); період напіврозпаду в крові близько п'яти годин. Період напіврозпаду може варіюватися у ендогенних і різних рекомбінантних форм.

ЕРО зв'язується з рецептором еритропоєтину на поверхні клітин-попередників і активує JAK2 сигнальний каскад.

Високоактивний прояв рецептора еритропоєтину визначає місцезнаходження еритроїдних клітин-попередників.

Клітини-попередники мають високий рівень сприйнятливості до еритропоєтину. Хоча є відомості, що рецептори еритропоєтину знаходяться в ряді інших тканин (в серці, в м'язах, в нирках, в нервовій тканині), достовірність результатів цих досліджень спотворюється за рахунок наявності антитіл (anti-ЕроR). Експерименти, проведені в контрольованих умовах, не підтвердили наявності рецептора в цих тканинах. У крові, еритроцити самі не реагують на рецептор еритропоєтину. Проте, була знайдена непряма залежність тривалості життя еритроцитів в крові від рівня еритропоєтину в плазмі крові.

Еритропоєтини стимулюють проліферацію і диференціацію клітин еритроїдного паростка внаслідок дії на специфічні рецептори еритропоєтину, які містяться на попередниках еритроцитів у кістковому мозку.

Еритропоетин індукує еритропоез, стимулюючи розподіл і диференціювання еритроїдних клітин-попередників, що призводить до збільшення кількості еритроцитів і гематокриту. Еритропоетин також стимулює вивільнення ретикулоцитів з кісткового мозку в кровотік, де вони дозрівають до еритроцитів. У нормі концентрація еритропоетину в сироватці крові становить 10-30 мЕ/мл і регулюється рівнем оксигенації тканин. При зниженні вмісту кисню в тканинах концентрація еритропоетину збільшується в 100-1000 разів.

3.3. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

Глобальна база даних ВООЗ є єдиним джерелом оцінки поширеності анемії з можливістю отримати інформацію на рівні країн, регіонів та світу в цілому. В якості індикатору використовується концентрація гемоглобіну в крові, порогові значення норми якого для різних груп населення (дітей, підлітків, дорослих та вагітних жінок) були визначені експертами ВООЗ в Женеві у 1992 році.

Дані щодо поширення анемії збиралися з регіонів для всіх груп населення з 1993 по 2019 роки.

Ці дані були отримані від дітей дошкільного віку (76,1%), вагітних (69%) та невагітних жінок (73,5%). Охоплення інших груп населення значно нижче: 33% дітей шкільного віку, 40,2% чоловіків и 39,1% людей похилого віку. В цілому, охоплення населення становило близько 48,8%.

Поширеність анемії серед населення Землі становить близько 24,8%. В абсолютних цифрах це близько 1 620 000 000 людей, які страждають від анемії. У дітей дошкільного віку, поширеність анемії становить 47,4% (293 000 000 дітей у всьому світі). Найбільш поширена анемія в Африці (67,6%) та Південно-Східній Азії (65,5%).

В східній частині Середземномор'я поширеність становить 46%, в інших регіонах ВООЗ близько 20% (Північна та Південна Америка, Європа та Західна частина Тихого океану). Серед вагітних жінок поширеність трохи менша; однак, поширення анемії в регіонах має таку ж тенденцію, яка відмічається серед дітей дошкільного віку.

Найбільша поширеність в Африці (57,1%) та Південно-Східній Азії (48,2%), потім в Східному Середземномор'ї (44,2%), Західній частина Тихого океану (30,7%), в регіонах Європи та Південної Америки 25% та 24,1% відповідно. В цілому, 56 400 000 вагітних жінок страждають на анемію (поширеність в світі 41,8%). Серед невагітних жінок поширеність анемії трохи менша, ніж у вагітних. В цілому, це близько 468 400 000 невагітних жінок, які страждають від анемії (поширеність в світі 30,2%).

Найбільш поширена в Африці (47,5%) та Південно-Східній Азії (35,7%). В регіоні Східного Середземномор'я, поширеність анемії становить 32,4%, в Західній частині Тихого океану – 20,5%, в Європейському регіоні – 19% та 17,8% в Північній та Південній Америці.

Окрім того, глобальна поширеність анемії серед дітей шкільного віку становить 25,4%, серед чоловіків 12,7%, а серед людей літнього віку 23,9%.

За даними Центра медичної статистики МОЗ України поширеність анемії складала у 2017 році 1 613,4 на 100 000 населення, у 2018 – 1 515,4 на 100 000 населення, це становить 1% в структурі захворюваності.

На залізодефіцитну анемію припадало 1 457,7 (90,35%) на 100 000 населення в 2018 році та 1 372,8 (90,59%) в 2019 році. Показники розраховані без урахування тимчасово окупованих територій АР Крим та м. Севастополя, непідконтрольних Україні територій Донецької та Луганської областей.

3.4. Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції

Найвідомішими компаніями-виробниками препаратів еритропоєтину в Україні є Епоєтин «Фармекс» [11], Епобіокрин «Біофарма» [12], Епоєтин «Київмедпрепарат» [13] та Еповітан «Фармак» [14].

Лікарські протианемічні препарати, представлені на ринку України

Назва (Виробник)	Діюча речовина	Дозування	Вартість*, грн/дозу (Вартість флакону, грн)
Епоетин «Фармекс»	еритропоетин (епоетин альфа) людини рекомбінантний - 10000 МО	150 ОД/кг 3 рази на тиждень	230
Епобіокрин «Біофарма»	епоетин альфа 10000 МО	150 ОД/кг 3 рази на тиждень	393,70
Епоетин «Київмедпрепарат»	еритропоетин (епоетин альфа) по 10000 МО	150 ОД/кг 3 рази на тиждень	350
Еповітан «Фармак»	епоетин альфа 10000 МО	150 ОД/кг, 3 рази на тиждень	375

3.5. Розрахунок річної потужності виробництва

Враховуючи високу вартість препаратів рекомбінантного еритропоетину та велику кількість людей, які потребують використання даного продукту, розрахуємо добову потребу у препараті для 100000 хворих анемією по Україні на один день:

$$0,0002 \text{ г} \times 100000 = 20 \text{ г/добу}$$

Потреба в еритропоетині на місяць:

$$20 \times 30 = 600 \text{ г/місяць}$$

Для забезпечення продукції на рік:

$$600 \text{ г} \times 12 = 7200 \text{ г/рік} = 7,2 \text{ кг/рік}$$

Згідно з наведеними вище даними можна розрахувати потужність виробництва продукту.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд} = 300$), враховуючи втрати (20%) [16], кількість препарату еритропоетину на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 7200 / 300 = 24 \text{ г/добу}$$

Кількість готового препарату за цикл, кг/цикл:

$$G_{цк} = G_{нтд} \times T_{ц} / 24 = 24 \times 48 / 24 = 0,048 \text{ кг/цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл:

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цк} \times CP_{гп} / P_{кр} \times (1 - E_{св}) = 1,1 \times 0,048 \times 0,9 / 2 \times (1 - 0,15) = 0,03 \text{ м}^3$$

$K_1 = 1,1$ - коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій;

$CP_{гп}$ – вміст сухої речовини в готовому продукті (0,9);

$P_{кр}$ – концентрація продукту в культуральній рідині (2 г/л);

$E_{св}$ – сумарні втрати при виділенні готового продукту (0,15).

Вихід препарату у кг культуральної рідини:

$$P_{кр} = G_{цк} / V_{кр} = 0,048 / 0,3 = 0,16 \text{ кг}$$

Визначаємо кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = G_{нт} / G_{цк} = 7200 / 480 = 15 \text{ цикли}$$

Отже, приймаємо 15 виробничі цикли.

3.6. Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів

Розрахуємо, кількість еритропоетину, що потрібно отримати за цикл ферментації для підрахунку кількості стадій приготування посівного матеріалу.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд} = 300$), враховуючи втрати (20%) [16], кількість препарату рекомбінантного еритропоетину на добу ($G_{нтд}$) становитиме:

$$G_{нтд} = G_{нт} / T_{рд} = 7200 / 300 = 24 \text{ г/добу}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за один виробничий цикл, з урахуванням втрат:

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цк} \times CP_{гп} / P_{кр} \times (1 - E_{св}) = 1,1 \times 0,048 \times 0,9 / 2 \times (1 - 0,15) = 0,03 \text{ м}^3$$

$K_1 = 1,1$ - коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій;

$CP_{гп}$ – вміст сухої речовини в готовому продукті (0,9);

$P_{кр}$ – концентрація продукту в культуральній рідині (2 г/л);

$E_{св}$ – сумарні втрати при виділенні готового продукту (0,15).

Геометричний об'єм ферментера для отримання $0,01 \text{ м}^3$ культуральної рідини, з коефіцієнтом заповнення 0,6 має становити:

$$V_{г} = V_{крц} / K_{зап} = 0,03 / 0,6 = 0,05 \text{ м}^3,$$

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

Виходячи з того, що потрібного нам ферментеру для отримання $0,03 \text{ м}^3$ культуральної рідини, обираємо найближчий за геометричним об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 0,063 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{ф} / V_{сф1} = 0,03 / 0,063 = 0,5, \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря)

Приміщення.

Стерильну продукцію необхідно виробляти в чистих зонах, доступ у які персоналу і надходження обладнання, сировини і матеріалів має здійснюватися через повітряні шлюзи. Чисті зони мають обслуговуватися таким чином, щоб відповідати стандарту чистоти, і постачатися повітрям, що пройшло через фільтри відповідної ефективності .

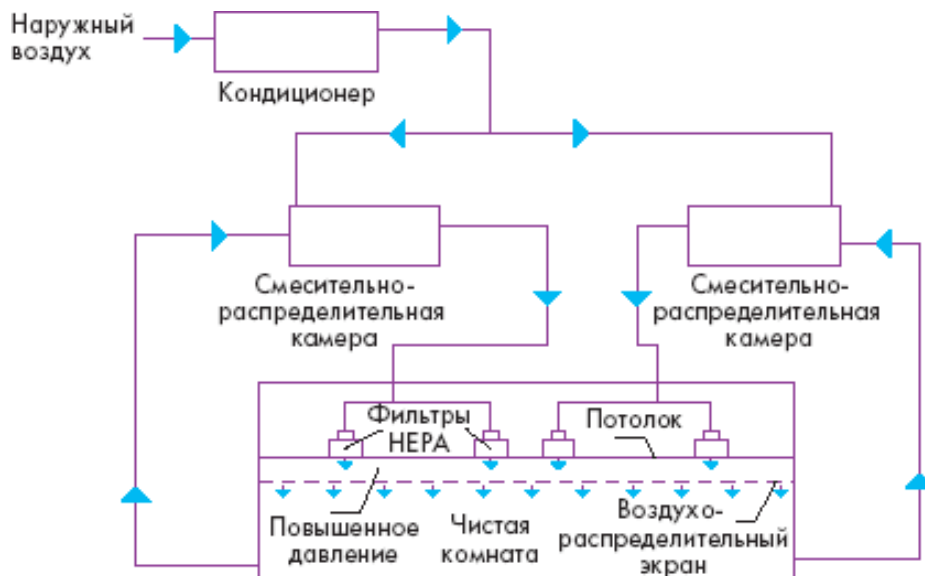


Рис.4.1. Схема вентиляції

Чисті зони для виробництва стерильної продукції класифікуються відповідно до необхідних характеристик навколишнього середовища. Кожна виробнича операція потребує відповідного рівня чистоти навколишнього середовища у функціонуючому стані для зведення до мінімуму ризику контамінації частками або мікроорганізмами продукції чи оброблюваних матеріалів.

Враховуючи правила **GMP**, стадія приготування поживного середовища повинна проходити в класі чистоти С. Під час приготування посівного матеріалу,

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Приймак Д.			РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ		
Перевір.		Пенчук Ю.М.					
Реценз.							
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
					Літ.	Арк.	Акрушів
						55	58
					Кафедра БТМ		

роботу з культурами мікроорганізмів проводять в стерильних умовах з дотриманням правил асептики. Розміщення робочих приміщень для роботи з мікроорганізмами відповідає зоні В з виділеною зоною класу А (ламінарна зона). Для дотримання асептичних умов при культивуванні в біореакторах використовують приміщення, що відповідають класу чистоти Д. Важливою є стадія ліофілізації(сублімаційне висушування), яка дозволяє довгий час зберігати активність субстанції. Після закінчення сушіння припиняють нагрівання та відключають вакуумний насос, поступово зменшуючи вакуум і подаючи через фільтр стерильне атмосферне повітря чи інертний газ, що забезпечує більш тривале зберігання матеріалу. Згідно **GMP**, на всіх стадіях виробництва зонування приміщень здійснюється за принципом групування всіх приміщень з однаковими рівнями реально існуючих чи потенційно можливих контамінантів, розділення цих зон між собою та розділення цих зон між собою та відмежування їх від навколишнього середовища бар'єрами (шлюзами). Таким чином, якість продукції, ефективність та безпечність біотехнологічного виробництва забезпечується системним дотриманням відповідних нормативів.

Клас А. Локальна зона для операцій, при яких контамінація може становити високий ризик для якості продукції: стадія ліофілізації субстанції; зони наповнення, закупорювання скляних шприців. Такі умови забезпечуються ламинарним потоком повітря на робочому місці. Системи ламинарного потоку повітря на робочому місці забезпечують рівномірну швидкість повітря 0,45 м/с.

Клас В. Стадія стерилізуючої фільтрації; навколишнє середовище для зони класу А.

Класи С і D. Чисті зони для здійснення менш критичних стадій виробництва стерильної продукції: ферментація; центрифугування біомаси; приготування розчину інсуліну; миття і стерилізація скляних шприців, стерилізація устаткування, засобів для закупорювання та спецодягу.

Перегляд етикетування, пакування і маркування здійснюється в приміщенні сірої зони. Для переміщення матеріалів у виробничі ділянки різних класів чистоти передбачені матеріальні шлюзи.

В приміщенні зон класу чистоти D персонал дістається через персональні шлюзи. Персонал, що обслуговує технологічні операції з асептичного розливу, переміщується в зону С через персональні шлюзи.

Повітря навколишнього середовища виробничих приміщень повинно відповідати характеристикам, наведеним у таблиці 4.2.

Таблиця 4.2

Клас	Оснащений стан		Функціонуючий стан	
	Максимально допустима кількість часток в 1 м ³ повітря при розмірі часток однакового чи більшому			
	0,5 мкм	5 мкм	0,5 мкм	5 мкм
A	3 500	0	3 500	0
B	3 500	0	350 000	2 000
C	350 000	2 000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	не нормується	

Основні відмінні риси чистих приміщень:

1. По архітектурно-будівельних рішеннях і внутрішній обробці приміщень:

- застосування принципу побудови "приміщення в приміщенні";
- застосування раціонального облаштування проходів вентиляційних трас і електричних комунікацій, систем опалення, водопостачання й каналізації;
- застосування спеціальної конструкції герметичних огорожень, які:
 - мають гладкі внутрішні поверхні, легко доступні для миття й обробки дезінфікуючими засобами;
 - мають герметичні стики між стінами, підлогою й стелею;
 - виготовлені з вогнестійких і нетоксичних матеріалів, стійких до впливу дезінфікуючих засобів і ультрафіолетового опромінення;
- застосування для покриття підлоги антистатичного лінолеуму.

2. По технологічних рішеннях:

- застосування раціональних технологічних і апаратурних схем;

- виключення взаємного перетину шляхів проходження персоналу, "чистих" і "брудних" технологічних потоків, що забезпечується плануванням чистих приміщень;

- забезпечення входу в чисті приміщення через повітряні шлюзи;
- передачу вантажів через матеріальні шлюзи й передаточні вікна.

3. *По опаленню, вентиляції, мікроклімату й повітряному середовищу приміщень:*

- визначення продуктивності систем вентиляції відповідно до класів приміщень по чистоті й тепловому навантаженні, застосування енергозберігаючих режимів роботи систем, у тому числі застосування 30%-го "чергового" режиму в неробочий час;

- високоефективне триступеневе очищення (фільтри класу H13-H14);
- кондиціонування й зволоження повітря;
- раціональна організація перепадів тисків між приміщеннями, що дозволяє оптимально використати можливості повітряного середовища й уникнути переміщення повітря з менш чистих зон у більш чисті;

- моніторинг основних кліматичних параметрів у чистих приміщеннях.

4. *По освітленню:*

- застосування герметичних світильників, здатних витримувати санітарну обробку дезінфікуючими засобами;

- застосування ультрафіолетових опромінювачів для знезаражування повітря.

Таким чином, забезпечення всього технологічного процесу повинно відповідати вимогам Належної виробничої практики.

Санітарна підготовка персоналу.

В чистих зонах повинна бути присутньою лише мінімальна кількість необхідного персоналу; це особливо важливо при проведенні технологічного процесу в асептичних умовах. Інспектування і контроль, наскільки можливо, слід здійснювати ззовні чистих зон. Весь персонал (включаючи співробітників, які

займаються прибиранням і технічним обслуговуванням), який працює в таких зонах, повинен регулярно проходити навчання з дисциплін, пов'язаних з належним виробництвом стерильної продукції, включаючи питання гігієни й основи мікробіології. Необхідні суворі вимоги до особистої гігієни і чистоти. Співробітники, зайняті у виробництві стерильних препаратів(це відноситься і до даного виробництва), мають бути проінструктовані про те, що вони зобов'язані доповідати про будь-які обставини, що можуть бути причиною поширення аномальної кількості або типів забруднень; при виникненні таких обставин бажані періодичні перевірки здоров'я співробітників. Працюючий в приміщенні персонал є активним джерелом забруднення. Тому в “чистих” приміщеннях під час роботи повинна знаходитися мінімальна кількість працюючих.

Обґрунтування вибору дезінфікуючих засобів.

При виборі дезінфікуючої речовини необхідно враховувати не тільки її бактерицидні властивості і спектр дії, але й можливу токсичність для людини. Дезінфікуючі засоби, що використовуються у технологічному процесі, який забезпечує виробництво препарату інсуліну зареєстровані в Україні та дозволені для використання на підприємствах фармацевтичної промисловості. Дезінфікуючі засоби повинні відповідати наступним вимогам:

- бути універсальними (можливість застосування одного і того ж засобу для дезінфекції різних об'єктів);
- бути активними відносно широкого спектру мікроорганізмів;
- бути безпечними для персоналу, що зайнятий на етапах приготування і застосування робочих розчинів дезінфікуючих засобів;
- стабільність при зберіганні і транспортуванні;
- низька агресивність відносно конструкційних матеріалів.

З огляду на наведені вище вимоги, а також економічну доцільність нами обираються наступні дезінфікуючі засоби:

Дезінфікуючі засоби для обробки рук персоналу

Для даного процесу в якості засобу для асептики шкіри рук обираємо розчин 76%-го етилового спирту та препарат «Стериліум».

Спирт етиловий 76%

Знайшов широке застосування бо:

1. Володіє бактерицидною дією щодо широкого спектру мікроорганізмів.
2. Тривале зберігання – протягом 1 місяця.
3. Економічність – достатньо 5 мл на одну обробку.
4. Не токсичність.
5. Не залежить від умов навколишнього середовища, а саме – світла, тому має переваги, наприклад, відносно розчину перекису водню.

Препарат «Стериліум» має наступні властивості:

1. Швидкодіючий засіб, який зберігає свою дію протягом 1 години на незахищеній шкірі рук та протягом 3 годин під рукавичками.
2. Не подразнює шкіру.
3. Не порушує водно-жировий баланс шкіри.
4. Має фунгіцидну, бактерицидну, пролонговану дію.

Дезінфікуючі засоби для обробки виробничих приміщень та обладнання

В даному технологічному процесі під час прибирання застосовують 3-6% - ний розчин перекису водню.

Розчин перекису водню:

1. Має бактерицидні властивості – здатність спричиняти загибель як вегетативних, так і спорових форм в залежності від концентрації та температури робочого розчину.
2. Не має неприємного запаху.
3. Не піддає корозії метали.

Безпечний у використанні – не має токсичного впливу на макроорганізм.

Обґрунтування вибору підготовки вентиляційного повітря

Повітря виробничих приміщень – потенційне джерело забруднення, тому його очищення є одним з ключових питань ведення технологічного процесу.

Вентиляційне повітря виконує ряд важливих функцій:

- видалення забруднень
- створення необхідної зони у виробничому приміщенні
- створює комфортні умови для роботи персоналу

Для одержання повітря з необхідними характеристиками мають використовуватись способи, які пройшли валідацію, внесені в технологічний і технічний регламенти і дозволені за встановленим порядком уповноваженим державним органом.

Для забезпечення виробництва стерильних препаратів знепиленим стерильним повітрям використовують системи з ламінарним потоком повітря по всій площі приміщення або в певних робочих зонах.

Приміщення з *ламінарним потоком* — це такі приміщення, в яких повітря подається в напрямку до робочої зони через фільтри, що займають усю стіну або стелю, і видаляється через поверхню, протилежну входіві повітря.

При виборі способу стерилізації повітря потрібно враховувати, крім надійності стерилізації, економічність, можливість контролю стерилізації, зручність експлуатації.

Традиційна технологія чистих приміщень заснована на подачі повітря через пилові HEPA фільтри. Пилові фільтри являють собою спеціальну "тканину", здатну затримувати частки пилу з повітря. Принцип їхньої роботи досить простий: повітря вентилятором продавлюється через фільтр і тим самим звільняється від часток пилу. HEPA-фільтри видаляють пилові частки від

0,3 мкм, проганяючи крізь себе весь наявний у приміщенні повітря по кілька десятків разів у годину.

HEPA фільтри є на сьогоднішній день одними з найпоширеніших завдяки ефективній затримці часток аж до 0,3 мкм. HEPA фільтри можуть мати різну форму, оскільки їхні властивості визначаються структурою матеріалу, з якого вони

виготовлені. Їхній принцип дії заснований на затримці часток пилу в розгалуженій мережі дрібних каналів, через які продувається очищає повітря.

У сучасному повітроочисному встаткуванні цього досягають, якщо використовується одночасно два-три типи з вищевказаних фільтрів.

Для доведення параметрів повітря по кількості часток до встановлених норм доцільним буде застосування двоступеневого очищення з використанням фільтра **EU13** -високоєфективна фільтрація (HEPA) до 99,95% на фінішній стадії для приміщень класів чистоти С, та треступеневе очищення у зонах чистоти А і В з використанням фільтру **EU14** -високоєфективна фільтрація (HEPA) до 99,95% на фінішній стадії. Використання HEPA фільтрів на наш погляд має багато переваг, а саме висока ефективність, зручність у використанні, вигідність з точки зору ціна-якість.

4.2. Обґрунтування підготовки первинної упаковки

Основні технічні вимоги до шприців такі: прозорість циліндра шприца, змоченого водою, для забезпечення видимості лікарських речовин; переміщення поршня в циліндрі без заїдань і ривків; поверхні металевих частин шприців повинні бути без пошкоджень, ум'ятин, подряпин, тріщин та інших дефектів, що порушують цілісність гальванічного покриття; герметичність з'єднання скляного циліндра з наконечником і поршня з циліндром; чіткість і стійкість до стирання штрихів і цифр шкал; стійкість до механічного впливу при транспортуванні і до багаторазової обробки, яка передбачає дезінфекцію кип'ятінням, передстерилізаційне очищення і повітряну стерилізацію. Термін служби шприців багаторазового застосування — не менше 1 року.

Шприци одноразового застосування виготовляють з певних сортів поліпропілену, полістиролу і співполімеру стиролу та акрилонітрилу, дозволених до застосування для медичних цілей органами охорони здоров'я. Для поршня використовують високоякісний натуральний каучук або силіконовий каучук з покриттям поверхні поршня полідиметилсилоксаном. Місткість шприців — 1; 2; 5;

10; 20; 30; 50 і 150 мл. Подвійна шкала не допускається. До додаткових технічних вимог належать: апірогенність і стерильність шприців.

4.3. Обґрунтування вибору підготовки води

Невід'ємною стадією допоміжних робіт у ході технологічного процесу є **водопідготовка**. Вода, яка використовується у виробництві ін'єкційних лікарських форм, повинна бути максимально хімічно очищеною і відповідати вимогам НТД. Приймаючи до уваги те, що даний препарат є розчином для ін'єкцій на цій стадії готується вода очищена та вода для ін'єкцій, яка використовується в якості розчинника.

Якість води має велике значення на сучасному фармацевтичному підприємстві. Вода використовується практично на всіх стадіях виробництва. Це мийка приміщень і устаткування, санітарно-гігієнічні цілі, приготування аналітичних розчинів, використання як теплоносій і холодоагент, приготування компонентів і готового продукту.

Отримання **води очищеної** та **води для ін'єкцій** достатньо дорога стадія процесу, поєднує велику кількість операцій, але все це обумовлено вимогами до стерильної продукції.

Можливі забруднення й джерела зараження вихідної води:

Розчинені неорганічні речовини; забруднення органічного характеру; мікроорганізми; особливі забруднення.

Неорганічні забруднення

- розчинені мінеральні солі,
- залишки добрив,
- побутові й промислові відходи.

Органічні забруднення

- залишки тваринного або рослинного походження,
- побутові й промислові відходи,
- залишки пестицидів і гербіцидів.

Мікроорганізми

- бактерії,
- водорості,
- віруси,
- гриби.

Особливі забруднення

- глина й земля,
- залізо, марганець і оксиди металів,
- частки корозії й залишки інших речовин, що втримуються в трубопроводах.

Нами передбачено наступні стадії процесу водопідготовки: знесолювання, зворотній осмос (у звоотноосмотичній установці здійснюється очищення води від солей, органічних домішок, твердих суспензій і бактерій), який має 2 ступені очищення, ультрафіолетове опромінення, триступенева дистиляція для отримання води для ін'єкцій.

Лише після здійснення даних етапів вода буде відповідати усім поставленим вимогам та може бути використана у основному технологічному процесі.

Вода очищена (Aqua purificata), яка використовується у виробництві ін'єкційних лікарських форм, повинна бути максимально хімічно очищеною і відповідати вимогам НТД. У кожній серії отриманої води обов'язково перевіряють значення рН (5,0—6,8), наявність відновлювальних речовин, вугільного ангідриду, нітратів, нітритів, хлоридів, сульфатів, кальцію і важких металів. Допускається присутність амоніаку — не більше 0,00002 %, сухого залишку — не більше 0,001 %. Для безперервної оцінки якості одержуваної води застосовують вимірювання питомої електропровідності.

Найбільш ефективним для даного процесу методом отримання води очищеної, яка буде задовольняти усі поставлені вимоги є застосування установки зворотного осмосу.

Зворотний осмос (гіперфільтрація) — перехід розчинника (води) із розчину через напівпроникну мембрану під дією зовнішнього тиску. Надлишковий робочий тиск сольового розчину набагато більший за осмотичний. Рушійною силою зворотного осмосу є різниця тисків по обидва боки мембрани.

Метод зворотного осмосу полягає у фільтруванні розчинів під тиском через напівпроникні мембрани, що пропускають розчинник (воду) і затримуючі молекули або іони розчинених речовин.

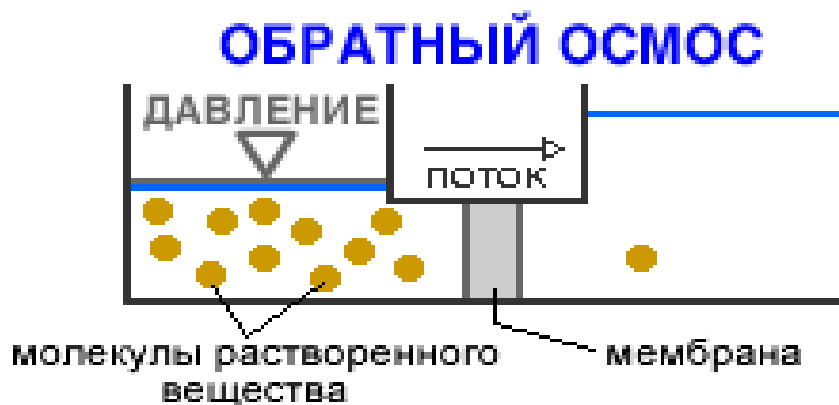


Рис. 4.2 *Схема зворотного осмосу*

Для очищення питної води застосовують мембранні установки зворотного осмосу з рулонним фільтруючим елементом.

Зворотньоосмотична синтетична мембрана

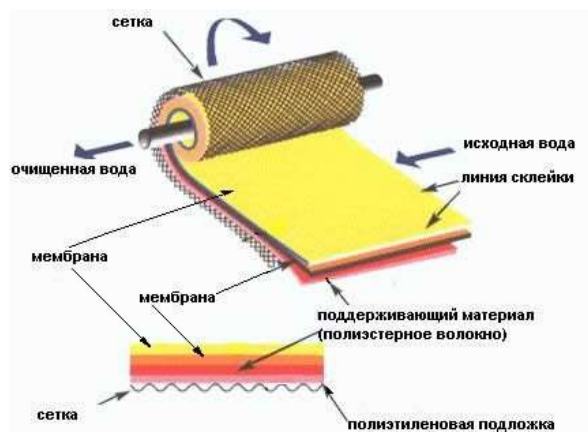


Рис.4.3 *Пристрій зворотньоосмотичної синтетичної мембрани*

Ефективність зворотного осмосу оцінюють по селективності мембрани - здатності втримувати іони й молекули різного розміру, а також по питомій

продуктивності одиниці поверхні. Сьогодні синтезовані полімерні мембрани із широким діапазоном розмірів пор і з високою механічною міцністю. Як наслідок, комплектуючи мембранний апарат набором мембран зі зменшуваним по ходу руху рідини розміром пор, можна одержати з розчину органічних і неорганічних з'єднань особливо чисту воду.



Рис. 4.4 Мембранна установка серії ДВС-М фірми "ВОДЭКОФИЛЬТР"

Відмінні риси та переваги установок серії ДВС-М:

- Високий рівень автоматизації й надійності;
- Низькі експлуатаційні витрати;
- Простота в обслуговуванні;
- Ергономічний дизайн;
- Доступність, безпека.

Вода для ін'єкцій (Aqua pro injectionibus) повинна задовольняти всі вимоги, висунуті до води очищеної, а також має бути стерильною й апірогенною.

Для отримання води для ін'єкцій у виробництві застосовується ультрафіолетове опромінення та метод дистиляції, а саме трьохкорпусна дистиляційна установка.

Дистиляція є природним процесом очищення води, що складається зі стадії випарювання й конденсації. Будь-який забруднювач, що випаровується при більш високій, чим вода, температурі, може бути вилучений у процесі дистиляції з високою ефективністю (звичайно більше 99%).

Очищення дистиляцією – енергоємний процес через високі енерговитрати на випарювання води. Раціональні технологічні схеми, однак, можуть істотно знизити енерговитрати. До таких схем відноситься багатокорпусна установка, коли на обігрів наступного корпусу застосовується вторинна пара попереднього більш "гарячого" корпусу.

Якість одержаного дистиляту задовільна, тому що в корпусах достатня висота парового простору і передбачене видалення краплинної фази з пари за допомогою сепараторів.

Для забезпечення апірогенності отримуваної води необхідно створити умови, які запобігають потраплянню пірогенних речовин у дистилят.

Тому конструктивним вирішенням питання підвищення якості дистиляту є застосування дистиляційних апаратів відповідних конструкцій, в яких виключена можливість перекидання крапельно-рідкої фази через конденсатор у збірник. Це досягається влаштуванням спеціальних відбивачів, високим розташуванням паропроводів відносно поверхні паротворення. Доцільно також регулювати обігрів випарника, забезпечуючи рівномірне кипіння й оптимальну швидкість паротворення, тому що надмірне нагрівання веде до бурхливого кипіння і перекидання крапельної фази.

Схема роботи дистилятора



Дистилятори NORLAND обладнані системою контролю якості води (TDS monitor), заснованої на вимірі провідності води. Чим більше у воді розчинених домішок, тим вище її провідність. Якщо датчик указує, що забруднення води в камері кип'ятіння підвищується до 10 ppm, система автоматично видаляє з її воду з домішками, що нагромадилися.

Процес дистиляції, що реалізується в промислових установках, повністю аналогічний природному процесу кругообігу води (випарювання, конденсація). При випарюванні, вода залишає всі домішки, які вона могла містити в собі. Жоден інший метод очищення не дає такої якості, як природні процеси. Чистота води, отриманої в результаті дистиляції володіє найвищою якістю. Крім того, дистиляція виявляється єдиним ефективним засобом виключення мікробіологічних забруднень води. Дистиляція є єдиним нехімічним і ефективним засобом позбутися від зараження.

Необхідним є наявність *системи розподілу води очищеної й води для ін'єкцій*.

Системи зберігання й розподілу води очищеної й води для ін'єкцій являють собою циркуляційний контур, у який включена ємність для зберігання. Всі поверхні, що перебувають у контакті з водою, повинні бути виконані з матеріалів, допущених до контакту з рідкими лікарськими препаратами з відповідним ступенем обробки. Швидкість руху води по трубопроводах повинна забезпечувати турбулентність потоку. У системах не повинно бути застійних зон. Відстань від установки зворотного осмосу або дистилятора до накопичувальної ємності, а також від розбірних клапанів до безпосереднього місця споживання води повинне бути зведене до мінімуму. Необхідно забезпечити й можливість стерилізації цих ділянок. У системах розподілу необхідно контролювати температуру. Трубопроводи, як правило, ізолюються. Необхідно забезпечити можливість безперервного моніторингу якості й періодичного відбору проб для повного аналізу.

4.4. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування

Технологія одержання рекомбінантного еритропоетину базується на використанні трансгенних клітин. Для одержання еритропоетину використовують різні клітинні лінії, найчастіше це бактеріальні та клітини ссавців [87].

Нині для отримання рекомбінантного еритропоетину використовують такі клітинні лінії як: *E. coli BL21* (DE3), клітини китайського хом'ячка CHO та дріжджі *Pichia pastoris*. Саме тому для вибору біологічного агента, найдоцільніше порівняти особливості одержання еритропоетину вище перерахованих продуцентів.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей культивування *E. coli BL21* (DE3), CHO та *Pichia pastoris* наведено у таблиці 1.3.

З даних наведених у табл. 2.1 можна зробити висновок, що найбільшу концентрацію білка (3,2 г/л) за часу культивування (18 год) отримують з клітин *E. coli* в порівнянні з іншими культурами CHO (15 г/л, 168 год) та *Pichia pastoris* (3,15 г/л, 24 год).

Таблиця 2.1

Особливості одержання рекомбінантного еритропоєтину за допомогою *E. coli* BL21 (DE3), СНО та *Pichia pastoris*

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Концентрація білка г/л	Особливості процесу біосинтезу та виділення цільового продукту	Література
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	Триптон-10; Дріжджовий екстракт-5; NaCl-10; Ампіцилін -0,1	18	3,2	Культивують при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ та рівнем $\text{pH}=6$, при перемішуванні 180об/хв. Після центрифугування клітини заморожують до $t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Заморожену бактеріальну біомасу (1 г) розморожували і суспендовали у співвідношенні 1: 10 (мас. / об.) у буфері лізінгу (20 мг/мл HCl, $\text{pH}=8,0$, 100 мг/мл NaCl, 1%, 1 мг/мл фенілметилсульфонілфторид та 100 мкг / мл лізоциму. Клітинну суспензію інкубують протягом 20 хв при кімнатній температурі і за допомогою ультразвуку відбувався розпад заморожених клітин. Отриманий фугат центрифугували протягом 30 хв при 20 000 об/хв при $10\text{ }^{\circ}\text{C}$	Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Lyaschuk, A. M., Poponova, M. S., Galushkina, Z. M., Soboleva, L. A., Karyagina, A. S. Recombinant human erythropoietin with additional processable protein domains: Purification of protein synthesized in <i>Escherichia coli</i> heterologous expression system. <i>Biochemistry</i> .2017; 82(11): 1285–1294. doi:10.1134/s0006297917110062

CHO	DMEM-F12; 5% бичача ембріональна сироватка;	168	15	Культуру ссавців вирощують за допомогою вказаного середовища з додаванням бікарбонату натрію- 26; Нерес- 15; Глутамін-6; пірувату натрію-1 та 2-меркаптоетанол-0,00001. t = 27 °C, рівень рН 7,3-7,5. В результаті всіх етапів дослідження було отримано культуру, яка виробляла 10 ⁷ одиниць ЕРО на 1 л культури за 24 год.	Способ получения рекомбинантного эритропоэтина человека и полученный эритропоэтин, фармацевтическая композиция // Патент России №2215748.2004/ Матаморос Фернандес Лобви
<i>Pichia pastoris</i>	Дріжджовий екстракт – 1; пептон – 2; фосфат калію-100; дріжджова азотиста основа-1,34; біотин-0,00004; метанол-1.	24	3,15	Культуру інкубували при t = 30 ° C при струшуванні (220 об / хв) і через різні проміжки часу збирали супернатанти центрифугуванням. Супернатанти осаджували додаванням трьох обсягів ацетону і інкубували при t = 20 ° C протягом ночі. Потім суміші центрифугували (10000 об / хв, t = 4 ° C), а гранули розчиняли в фосфатно-сольовому буфері (PBS).	<u>Ser Huy Teh, Mun Yik Fong, and Zulqarnain Mohamed. Expression and analysis of the glycosylation properties of recombinant human erythropoietin expressed in <i>Pichia pastoris</i>. <i>Genet Mol Biol</i>. 2011 Jul-Sep; 34(3): 464–470. doi: 10.1590/S1415-47572011005000022.</u>

Проте, одного аналізу особливостей одержання білка недостатньо для вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування. Для остаточного вибору продуцента, ще одним з етапів є проведення порівняння вартості кожного з досліджуваних середовищ (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
E. coli BL21 (DE3), CHO та *Pichia pastoris***

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн.) на 1 л середовища	Джерело інформації (1,2,3,4,5,6,7)*
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Триптон-10;	1790	17,9	1
	Дріжджовий екстракт-5;	1283	6,415	2
	NaCl-10	5	0,05	1
	Ампіцилін	662	0,06	8
	Вартість 1л середовища – 24,4 грн			
CHO	DMEM-F12-10;	5383	53,83	3
	бичача ембріональна сироватка-5	27700	138,5	4
	Вартість 1л середовища – 192,3 грн			
<i>Pichia pastoris</i>	Дріжджовий екстракт – 1;	1283	1,283	2
	пептон – 2;	240	0,48	2
	фосфат калію-1;	25	0,025	5
	Дріжджовий автолізат -1,34;	570	0,77	1
	біотин-0,00004;	625	0,00025	6
	метанол-1.	24	0,024	7
	Вартість 1л середовища – 2,6 грн			

Примітка.* – Ціни наведено станом на листопад 2020 р

1. <http://flagma.ua>;
2. http://agar.com.ua/Yeast_Extract_250
3. <https://zakupki.com.ua/tender/3798712/ru>;
4. <https://www.helicon.ru/catalog/reagenty/kultivirovanie-kletok/syvorotki/>;
5. <https://prom.ua/p761168518-fosfaty-kaliya-e340.html>;
6. <https://prom.ua/p1038936525-biotin-10000-mkg.html>; 7. <https://prom.ua/p942150819-spiro-metilovyj.html>;
- 8 - <https://vettorg.info>

Проаналізувавши таблицю 2.2 та провівши порівняльну характеристику цін, ми отримали такі результати, що найдешевше середовище для вирощування та культивування спостерігається у *Pichia pastoris* (2,6 грн), у *E.coli* воно становить 24,4 грн, а найдорожче середовище, за рахунок додавання дороговартісного компоненту – бичачої ембріональної сироватки, спостерігається у клітин CHO і становить 192,3 грн.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 мг цільового продукту при культивуванні *E. coli* BL21 (DE3), CHO та *Pichia pastoris*

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація білка мг/л	Умовна вартість 1 мг цільового продукту, грн/мг	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного білка за годину, мг/год
<i>E.coli</i>	24,4	3200	$7,6 \times 10^{-3}$	18	177,8
CHO	192,3	15000	$1,3 \times 10^{-2}$	168	89,3
<i>Pichia pastoris</i>	2,6	3150	$8,3 \times 10^{-4}$	24	131,2

Дослідивши такі фактори як тривалість культивування, концентрація білка та вартість компонентів поживного середовища, порівнявши три біологічні агенти *E. coli* BL21 (DE3), CHO та *Pichia pastoris*, ми отримали такі результати, що за умови найменшої тривалості культивування та отримання найвищого показника кількості утвореного білка 177,8 мг/год, для фармацевтичного виробництва рекомбінантного еритропоетину, доцільним буде використання клітинної лінії бактерій *E.coli* BL21 (DE3).

4.5. Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Однією з основних стадій даного процесу виробництва є ферментація.

Рекомбінантні мікроорганізми широко використовуються для отримання різноманітних білкових продуктів, що застосовуються в медицині (*інсуліну*). Білки синтезуються найбільш інтенсивно в період від середини експоненціальної фази до її завершення.

Все це повинно враховуватися при виборі параметрів великомасштабних процесів ферментації. Оптимізація синтезу необхідного продукту – серйозна наукова проблема. Якщо йдеться про білок, то для її вирішення звичайно використовують клоновані гени, що знаходяться під контролем сильних регульованих промоторів. Спочатку вважали, що для отримання потрібної кількості продукту буде достатньо конститутивної експресії клонованого гена. Проте досвід показав, що при безперервній транскрипції і трансляції клонованого гена виснажуються всі енергетичні ресурси клітини і її зростання сповільнюється.

Оптимальною температурою для даного процесу є 37°C. Істотний вплив на рівень синтезу рекомбінантного білка можуть робити величина рН, яка в даному технологічному процесі становить **6,8-7,0**. Зниження рН нижче 6,8 приводить до появи нерозчинного осаду інсуліну, підвищення вище 7,1 – до утворення дезамідної форми.

Всі біореактори можна підрозділити на три основні групи:

1. реактори з механічним перемішуванням;
2. барботажні колони, через які для перемішування вмісту пропускається повітря або інший газ;
3. ерліфтні реактори із внутрішньою або зовнішньою рециркуляцією; перемішування й циркуляція культурального середовища в них забезпечується потоком газу (звичайно повітря), за рахунок якого між верхнім і нижнім шаром культурального середовища виникає градієнт щільності.

Частіше за все використовуються біореактори першого типу. Вони володіють наступними перевагами:

- дозволяють легко міняти технологічні умови;
- завжди є у продажу;
- забезпечують ефективну доставку газу до клітин, що ростуть

(володіють високим об'ємним коефіцієнтом масообміну);

- вже давно використовуються для вирощування різних мікроорганізмів.

В реакторах з механічним перемішуванням газ (як правило, повітря) подають в культуральне середовище під тиском через розбрикувач – кільце з безліччю маленьких отворів або трубку з одним отвором.

В першому випадку утворюються дрібні пухирці повітря і забезпечується їх більш рівномірний розподіл, проте розбрикувачі у вигляді трубок виконуються частіше, оскільки вони рідше закупорюються.

Для рівномірного розподілу газу по всьому об'єму біореактора використовуються мішалки - одна або декілька. Вони розбивають крупні пухирці повітря, разносять їх по всьому реактору і збільшують час перебування в культуральному середовищі.

Розмір біореактора лімітується нею здатністю ефективно віддавати тепло, що виділяється мікроорганізмами в ході метаболізму і що вивільняється в результаті перемішування. Якщо тепловіддача недостатня, температура середовища може перевищити критичною, що зменшить вихід продукту. Для відводу тепла використовують охолоджуючу сорочку або змійовики, що поміщаються всередину реактора. Внутрішнє охолодження більш ефективно, проте змійовики часто покриваються шаром клітин, що ростуть, що утрудняє охолодження, а іноді заважає інтенсивному перемішуванню культурального середовища.

Тому в нашому випадку обираємо ректор з сорочкою охолодження.

Біореактори конструюють так, щоб їх можна було стерилізувати; звичайно для цього використовують пару під тиском. Усередині реактора не повинне бути «мертвих зон», недоступних для пара під час стерилізації. Обробці підлягають її клапани, датчики, вхідні і вихідні отвори.

Гібридний білок після стадії виробничої ферментації накопичується в клітинах штама-продуценту, тому необхідним етапом даного виробництва є

центрифугування. Метою цього процесу є відділення клітин від культуральної рідини. Під час процесу клітини осідають на стінки центрифуги з подальшим збиранням та подачею в мобільну ємність для гомогенізації. Так як продуцентом у технологічному процесі є бактерія *Escherichia coli* для її виділення використовують бактофуги. Перевагою її використання є герметичність, можливість охолодження суспензії, та здатність відокремлювати частки малих розмірів з високою роздільною здатністю.

Спосіб культивування *E.coli* BL21 (DE3) обираємо виходячи з фізіолого-біохімічних ознак продуцента:

- по відношенню до кисню *E.coli* BL21 (DE3)– факультативний анаероб;
- • за ростовими факторами – ауксотроф;
- • оптимальне значення рН для росту і біосинтезу становить 6;
- • продуцент – мезофіл, оптимальна температура росту 37 °С [3];
- • умовно-патогенними є лише певні штами;
- • глибинний спосіб культивування [88].

Глибинний спосіб культивування має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, поліпшити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва. При глибинному способі культивування раціональніше споживаються мікроорганізмами поживні речовини середовищ, що дає можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого живильного середовища, отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю. А оскільки продуцент є аеробним мезофілом, що збільшує ризик контамінації при поверхневому чи твердофазному культивуванні. Саме при глибинному культивуванні у ферментері можна створити асептичні умови для культивування даного продуцента [89].

Періодичний спосіб культивування характеризується незмінністю поживного середовища в ферментері, склад якого в процесі розвитку поступово змінюється. Процес протікає постадійно: у ферментер набирають живильне середовище і задають посівний матеріал; після розмноження мікроорганізмів і накопичення продуктів їх обміну зрілу культуру вивантажують, а все обладнання, комунікації та запірні пристрої пормивають, а потім стерилізують парою [22].

Для культивування *E.coli* BL21 (DE3) потрібно обрати ферментер з механічним перемішуванням барботажного типу. Основною перевагою механічного перемішування є те, що можна легко змінювати технологічні умови та ефективно подавати до клітин повітря, що впливає на характер розвитку мікроорганізмів та їхню біосинтетичну активність. Такі ферментери можуть бути оснащені: лопатевими, турбінними, або дисковими мішалками.

Так як об'єм ферментера становить 63 л, то для культивування бактерій оберемо ферментер з триярусною турбінною мішалкою відкритого типу і барботером. Турбінна мішалка дає можливість розподіляти кисень рівномірно в поживному середовищі. Оскільки мікроорганізм є факультативним анаеробом, то потрібен барботер, для подачі повітря до поживного середовища [90].



Рис. 4.5 Ферментер компанії-виробника «Біотехно», об'ємом 63 л

Отже, культивування продуцента рекомбінантного еритропоєтину *E. coli* BL21 (DE3) здійснюють в асептичних умовах глибинним способом у періодичному режимі протягом 18 годин. Температура культивування становить 37 °С, рН середовища культивування становить 6. Аерація становить 1 об'єм повітря на 1 об'єм середовища за 1 хв. в ферментері, швидкість перемішування – 180 об/хв [91].

4.6. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва ЛЗ.

Відділення біомаси від культуральної рідини

Пройшовши стадію культивування, неочищений білок знаходиться у збірнику тимчасового зберігання. Саме тому, першим етапом на шляху до отримання цільового продукту у придатному для використання вигляді є поділ культуральної рідини і біомаси - сепарація. Існують різні методи сепарації:

Відстоювання - процес повільного розшарування рідкої дисперсної системи (суспензії, емульсії, піни) на складові фази: дисперсійне середовище та дисперсійну фазу, яке проходить під дією сили тяжіння.

Недоліки. Відстоювання не забезпечує виділення з суміші тонкодисперсних часток, які характеризуються повільною швидкістю осідання, тому відстоювання використовують для грубого розподілу неоднорідних систем. У процесі відстоювання частки дисперсної фази осідають або піднімаються на поверхню, накопичуючись, відповідно, на дні посудини або поверхні рідини. Осідання високодисперсних систем часто супроводжується збільшенням часток унаслідок коагуляції чи флокуляції. Структура осаду залежить від фізичних характеристик часток дисперсної системи та умов відстоювання. Він буває щільним при відстоюванні грубодисперсних систем. Полідисперсні суспензії тонкоподрібнених продуктів утворюють пухкі гелеподібні осади [15].

Фільтрування (фільтрація) - це відділення рідини або газу від зважених в них твердих частинок в процесі пропускання їх через пористі матеріали, що називаються фільтрами. При цьому тверді частки затримуються на фільтрі (розміри пор фільтра менше розмірів часток). Рідина, що пройшла через фільтр, називають фільтратом. В лабораторіях матеріалом для фільтрів служить фільтрувальний (непроклеїний) папір, який випускається промисловістю трьох ступенів пористості: марка Б (найбільші пори), марка С (середні по діаметру пори) і марка М (найбільш дрібні пори).

Недоліки. Якщо поживне середовище містить в'язкі компоненти, які унеможливають проходження крізь пори, процес фільтрування є неможливим [16].

Центрифугування - це поділ грубодисперсних систем, що складаються з рідких і твердих компонентів з різними густинами, за допомогою спеціальних апаратів, які називаються центрифугами. Принцип дії центрифуги заснований на створенні великої відцентрової сили, під впливом

якої швидкість поділу компонентів суміші, вміщеній у центрифугу, збільшується в багато разів порівняно зі швидкістю поділу їх під дією сили тяжіння. Метод центрифугування широко застосовується в біології, медицині і техніці, нерідко замінюючи процеси фільтрування, відстоювання і віджимання [17].

Недоліки. Складність конструкції, високі вимоги до точності виготовлення вузлів, підвищена витрата енергії на привід, мала робоча поверхня, висока вартість.

Ультрафільтрація - це процес пропускання суспензії через спеціальну мембрану. Ультрафільтрація займає проміжне місце між зворотнім осмосом і мікрофільтрацією. Одна з переваг ультрафільтрації - це можливість зберегти сольовий склад води з одночасним очищенням води від домішок і патогенних мікроорганізмів без застосування хімічних інгредієнтів. Пори ультрафільтраційної мембрани знаходяться в діапазоні від 0,05 мкм до 1 нмкм.

Ультрафільтрація здійснює затримку колоїдних і тонкодисперсних домішок, мікроорганізмів, бактерій і вірусів, розчинених солей важких металів, заліза, ртуті, миш'яку, марганцю, свинцю і т.д [17].

Недоліки. Невеликі за розміром пори фільтрів можуть забиватися, що призводить до зниження продуктивності, тому існує необхідність періодичної промивки матеріалу мембрани.

Коагуляція - процес злипання колоїдних часточок перебігає порівняно легко під дією самих різних факторів: введення електролітів, неелектролітів, заморожування, кип'ятіння, перемішування, дії сонячного світла тощо. У процесі електролітної коагуляції часто спостерігається іонообмінна адсорбція: іони коагулянта з більшою валентністю або більшим адсорбційним потенціалом витісняють протиіони спочатку дифузного шару, а потім і адсорбційного шару.

Недоліки. Обмін проходить в еквівалентній кількості, але заміна протиіонів приводить до того, що при достатній концентрації електролітів у

дисперсному середовищі часточки гублять стійкість і при зіткненні злипаються [18].

Флотація - захоплення біомаси мікроорганізмів бульбашками піни і виділення її з пінної фракції. Метод заснований на різній змочуваності і здатності накопичуватися на поверхні розділу фаз. Флотація можлива тільки при неповному змочуванні поверхні частинок, що виділяються рідиною. Зазвичай це досягається шляхом додавання невеликих кількостей спеціальних речовин - флотореагентів. Продукти флотації: пінний продукт і камерний продукт [19].

Недоліки. Флотація не дає гарантій повного відділення біомаси від культуральної рідини, тому застосування даного методу є недоцільним.

Проаналізувавши вищевказані методи, для виділення клітин з великих обсягів культурального середовища (в промислових масштабах) було обрано високошвидкісне центрифугування за допомогою відповідних центрифуг напівбезперервної дії. Суспензію клітин безперервно подають в барабан центрифуги, клітини концентруються в ньому, освітлена рідина видаляється. Коли барабан заповнюється обложеними клітинами, центрифугу зупиняють і клітини збирають. Незручність цього способу - необхідність зупинки процесу, ймовірність витоку мікроорганізмів в навколишнє середовище, неможливість повного видалення клітин з середовища [20].

Оптимальним варіантом є використання центрифуги марки ФВП901К (табл.4.3), з такими технічними характеристиками:

Таблиця 4.3

Показники	Значення
Модель	ФВП901К
Розрахункова продуктивність по осаду, кг/г	до 600
Фактор розділення, g	1100
Ротор: діаметр, м	0,9

частота обертання, хв^{-1}		1500
Встановлена потужність, кВт		30,05
Тиск, атм		3-6
Габаритні розміри, мм	довжина	213
	ширина	180
	висота	180
Маса, т		2,3

Центрифуга ФВП901К має такий вигляд (Рис.4.4):



Рис.4.4. Центрифуга ФВП901К [21]

Обґрунтування способу дезінтеграції клітин

Для руйнування (дезінтеграції) клітин використовують набір методів, що належать до трьох груп: фізико-механічні, хімічні та ензиматичні (ферментні). Усі методи мають бути ефективними та не призводити до денатурації білка.

До фізичних методів належать: осмотичний шок, термошок, плазмоліз, заморожування-відтаювання, висушування клітин, ультразвук та іонізуюча радіація.

До біологічних методів відносять: інгібування біосинтезу клітинної оболонки, дія фагів, одержання мутантних форм мікроорганізмів–продуцентів ферментів із легкокоруйнівними стінками.

Механічні поділяються на: балістичний, екструзивний і декомпресійний.

Хімічні методи: дія кислот, лугів, солей органічних розчинників, поверхнево-активних речовин.

Ензиматичні методи включають в себе: дію лізоциму та інших літичних ферментів.

Проаналізувавши дані методи, є необхідність обрати найефективніший метод. Фізичні способи дезінтеграції являються більш економічними, ніж хімічні і біолого-ферментативні, адже вони є найпростішими в застосуванні та економічно-вигідними, оскільки не використовуються дорогі реактиви і ферментні препарати [22].

Задля збереження властивостей білка, після розморожування біомаси було проведено ресуспендування в буфері лізису, що включало в себе додавання 100 мкг / мл лізоциму, після цього інкубування суміші протягом 20 хв при кімнатній температурі з подальшим руйнуванням клітин, використовуючи ультразвуковий дезінтегратор Sonics Vibracell (*Рис.4.5*) на льоду.

Оскільки застосування ультразвуку є не досить безпечним методом, було прийнято рішення використання ультразвукового дезінтегратора наступним методом:

4 секундний цикл: 2 секунди ультразвуку, 2 секунди спокою. Так як, не всі ультразвукові обладнання мають програми настройки, застосовують цикли зручні експериментатору, наприклад 30 сек ультразвуку, 30 сек спокою. На 1 грам клітин припадає 3 хвилини роботи ультразвуку. Рекомендується робити перерву в роботі ультразвуку, щоб розчин зі зруйнованими і ще не зруйнованими клітинами охолов. Ультразвукове

руйнування клітин - процес з великим виділенням тепла, тому його проводять на холоді, на практиці це означає, що посудину з розчином клітин оточений снігом або льодом. Це захищає білки від теплової денатурації і інших можливих хімічних реакцій в клітині.



Рис. 4.5. Ультразвуковий дезінтегратор Sonic Vibracell

Обґрунтування способу відділення та очищення цільового продукту

Наступний етап включає в себе процес ультрафільтрації зруйнованих клітин, метою якого є осадження не зруйнованих клітин і клітинного дебриса.

Ультрафільтрація - це процес пропускання суспензії через спеціальну мембрану. Ультрафільтрація займає проміжне місце між зворотнім осмосом і мікрофільтрацією. Одна з переваг ультрафільтрації - це можливість зберегти сольовий склад води з одночасним очищенням води від домішок і патогенних мікроорганізмів без застосування хімічних інгредієнтів. Пори ультрафільтраційної мембрани знаходяться в діапазоні від 0,05 мкм до 1 нмкм [18].

Ультрафільтрація здійснює затримку колоїдних і тонкодисперсних домішок, мікроорганізмів, бактерій і вірусів, розчинених солей важких металів, заліза, ртуті, миш'яку, марганцю, свинцю і т.д.



Рис 4.6. Ультрафільтраційна установка Bucher Ultrastar XL

Після процесу ультрафільтрації з'являється необхідність в розділенні білка за зарядом, тобто відділення від низькомолекулярних часток.

Розділення білка за зарядом

Для фракціонування білків в залежності від їх заряду найчастіше використовують методи: адсорбційної, розподільної, іонообмінної хроматографії, або методи ізоелектричного фокусування, електрофоретичне розділення білків та ін [23].

Адсорбційна хроматографія ґрунтується на відмінностях в полярності білків, в залежності від якої вони вибірково адсорбуються на твердих носіях різних типів. Застосування даного методу дозволяє отримати високий ступінь очищення білків. Найбільш широко вживаними сорбентами є іонообмінники і фосфат кальцію (гідроксилапатит) [23].

У *розподільній хроматографії*, на відміну від адсорбційної, нерухою фазою виступає водний шар, що утримується твердою фазою (силікагель, папір). Речовини, багаторазово розподіляються між водним шаром і фазою розчинника, що рухається, і з різною швидкістю переміщуються по довжині колонки або паперу. Розподільну хроматографію на папері часто використовують для аналізу пептидів й амінокислот. Адсорбентом служать нитки целюлози, а розчинником – суміш органічних

розчинників, наприклад: бутиловий спирт-оцтова кислота-вода. Хроматограму проявляють, висушують і аналізують місцезнаходження компонентів, що розділяються, тим або іншим способом [23].

Методом іонообмінної хроматографії білки або амінокислоти розділяють на основі відмінностей в загальному заряді молекул. Метод базується на зв'язуванні іонізованих груп білків із протилежно зарядженими групами іонообмінників (катионообмінників чи аніонообмінників). Міцність зв'язування білка із смолою пропорційна заряду білка. Для розділення кислих і нейтральних білків використовують аніонообмінник, в якому використовуються аміни або органічними основи. Для розділення основних білків – катионообмінник, що містить фенольні, сульфо- і карбоксильні групи.

Для розділення білків використовуються іонообмінники на основі целюлози (карбоксиметилцелюлоза (КМЦ) і діетиламіноетилцелюлоза (ДЕАЕ-целюлоза), декстранів і агароз, похідних полістиролу, що мають "пухку" структуру, завдяки якій білок може проникати у пори [23].

Рідинна хроматографія – спосіб препаративного поділу сумішей рідких або твердих речовин, заснований на різній спорідненості поділюваних речовин до нерухомої (сорбент) і рухомої (елюент) фаз. Як правило, чим краще речовина сорбується нерухомою фазою – тим повільніше речовина виходить з колонки [23].

В даному випадку найдоцільніше використовувати іонообмінну хроматографію.

Іонообмінну хроматографію проводилася за допомогою хроматографічної системи BioLogic низького тиску (Bio-Rad, США). Концентрацію білка визначали по абсорбції білкового розчину при 280 нм, використовуючи теоретичні (розраховані) коефіцієнти поглинання білка та за допомогою аналізу білкової біцинхонінової кислоти (AppliChem, Німеччина).



Рис 4.7. Хроматографічна система BioLogic

Гідроліз білка

Оскільки використання готового препарату еритропоєтину являє собою внутрішньовенне введення, є необхідність переведення білка з високомолекулярного в низькомолекулярний. Задля цього наступним етапом в процесі отримання рекомбінантного еритропоєтину є його гідроліз.

Гідроліз – розпад білків до амінокислот під дією ферментів в живих організмах або при нагріванні з розчинами кислот чи лугів.

Найдоцільніше проводити протеолітичний гідроліз білків за методикою Gasparyan із модифікаціями.

Обробку білка 6His-s-tag-EPO ентерокіназою проводили в буфері, що містить 10 мМ Трис-НСl (рН 7,5-8,0) та 200 мМ NaCl. Аліквоту (10 мкл) розчину ентерокінази зі специфічною активністю 0,1 од / мкл додавали до 9 мл розчину білка з концентрацією 0,1 мг / мл та інкубували протягом 3 год при кімнатній температурі (25 ° С). Ефективність гідролізу оцінювали за допомогою PAGE.

Після гідролізу 6His-s-tag-EPO з ентерокіназою розщеплений rhEPO очищали за допомогою афінної хроматографії на сорбенті WorkBeads 40 Ni (Рис.4.8) [24].



Рис.4.8. Афінна хроматографія

Отриманий білковий препарат піддавали процесу фасування у скляні шприци.

Фасування у скляні шприци

Розчин після попередніх етапів потрапляє в апарат для фасовки. Розчин з рекомбінантним еритропоетином доцільно фасувати в попередньо підготовлені стерильні скляні шприци. Для фасування використовували апарат фірми Ромасо, моделі Масофар ІF200. Оскільки даний апарат призначений для фармацевтичних виробництв і дозволяє наповнювати близько 12000 тисяч скляних шприців на годину. Після наповнення скляних шприців їх збирають на піддони, які в подальшому переносять на стадію висушування. Фасування продукту відбувається в зоні чистоти А [25].



Рис 4.9. Апарат для наповнення скляних шприців Масофар ІF200

Опис лікарського засобу згідно АНД

**Аналітичний нормативний
документ**

**для проведення вхідного контролю якості
Рекомбінантного еритропоєтину людини
(концентрований розчин)**

ОБЛАСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ

Ця аналітична нормативна документація поширюється на Рекombінантний еритропоетин людини (концентрований розчин), виробництва фірми «PROBIOMED, S.A. de C.V.», Мексика і який застосовується ВАТ «Київмедпрепарат» для виробництва готових лікарських засобів.

Хімічна назва: еритропоетин людини

Структурна формула (амінокислотна послідовність):

APPR LICDSR	VLERYLLEAK	EAENITTGCA
EHCSLNENIT	VPDTKVN FYA	WKRMEV GQQA
VEVWQGLALL	SEAVLRGQAL	LVNSSQPWEP
LQLHV DKA VS	GLRSLTTLLR	ALGAQKEAIS
PPDAASAAPL	RTITADTFRK	LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA	CRTGD	

Молекулярна формула: $C_{815}H_{1317}N_{233}O_{241}S_5$

Молекулярна маса: 30,6 kDa

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Рекомбінантний еритропоетин людини

(концентрований розчин)

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю*	Примітки
Опис	Прозора або з незначною опалесценцією безбарвна рідина.	За п. 1, візуально	Контролює ВКЯ
Ідентифікація	А. Біологічна активність. Має проявляти специфічну біологічну активність в умовах тесту «Кількісне визначення».	За п. 2 А, біологічний метод (in vivo) та метод ІФА.	Контролює ВКЯ
	В. Електрофорез ДСН ПАГ. На електрофореграмі для випробуваного розчину (а) повинна виявлятися одна дифузна смуга, яка за електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю співпадає зі смугою для розчину порівняння (а).	За п. 2 В, електрофоре з у ДСН ПАГ, ДФУ, 2.2.31	Контролює ВКЯ
	С. Імуноблотинг. На електрофореграмі для випробуваного розчину (б) повинна виявлятися одна дифузна смуга, яка за електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю повинна співпадати зі смугою для розчину порівняння (б).	За п. 2 С, імуноблотинг	Контролює ВКЯ
	Д. Ізоелектрофокусування. На електрофореграмі діапазон розподілу ізоформ за ізоелектричною точкою для випробуваного розчину та розчину порівняння повинні співпадати та знаходитись в інтервалі pI 2,5–5,0	За п. 2 D, метод ізоелектрофокусування	Контролює ВКЯ

	Е. Пептидне картування. Хроматограми випробуваного розчину і розчину порівняння повинні відповідати одна одній.	За п. 2 Е, метод пептидного картування	Контролює ВКЯ
Прозорість	За ступенем каламутності має витримувати порівняння з еталонним розчином II.	За п. 3, ДФУ, 2.2.1	Контролює фірма виробник
Кольоровість	Має бути безбарвним.	За п. 4, ДФУ, 2.2.2, <i>метод II.</i>	Контролює фірма виробник
pH	Від 6,5 до 7,5.	За п. 5, ДФУ, 2.2.3	Контролює ВКЯ
Димер і високомолекулярні домішки	Сума площ усіх піків, крім основного, що мають час утримання менший, ніж основного піку, не повинна перевищувати площі піку розчину порівняння (2,0 %).	За п. 6, ДФУ, 2.2.30 гельфільтрація	Контролює ВКЯ
Сіалові кислоти	Не менше 10 моль сіалових кислот (обчислено як N-ацетилнейрамінова кислота) на 1 моль еритропоетину.	За п. 7	Контролює ВКЯ
ДНК штаму продуцента	Не більше 100 пг на 1 000 МО.	За п. 8, метод слот-гібридації	Контролює ВКЯ
Бактеріальні ендотоксини	Не більше 20 МО на 100 000 МО еритропоетину.	За п. 9, ДФУ, 2.6.14	Контролює ВКЯ
Білок	Не менше 0,5 мг/мл.	За п. 10, ДФУ, 2.2.25	Контролює ВКЯ
Кількісне визначення.	Питома активність не менше 100 000 МО/мг білка. Питома активність не менше 100 000 МО/мг білка. *Виконується один з двох альтернативних методів.	За п. 11 А, біологічний метод. За п. 11 В, метод ІФА	Контролює ВКЯ

* - ДФУ, діюче видання.

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. **Опис.** Прозора або з незначною опалесценцією безбарвна рідина.

2. **Ідентифікація.**

А. Біологічна активність. Має проявляти специфічну біологічну активність в умовах тесту «Кількісне визначення».

В. Електрофорез ДСН ПАГ. Визначення проводять методом електрофорезу у поліакриламідному гелі (ДСН-ПАГ) (ДФУ, 2.2.31) з використанням приладу для вертикального електрофорезу білків (Lagon Plus, Fisher Bioblock Scientific, B29178 або аналогічної якості) у 12 % акриламідному гелі.

Розчин 100 г/л натрію додецилсульфату Р. 1,00 г натрію додецилсульфату Р розчиняють у 5 мл води Р, ретельно перемішують та доводять тим самим розчинником до 10 мл.

Розчин 100 г/л амонію персульфату (10 % ПСА у воді). 0,10 г амонію персульфату Р розчиняють в 1,00 мл води Р.

0,1 % розчин бромфенолового синього. 100 мг бромфенолового синього Р розчиняють у 80 мл води Р, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл.

Розчин зберігають протягом 6 міс при температурі 2–8 °С.

2-кратний не відновлювальний розчин для зразків. 0,5 мл 1М буферного розчину трис-гідрохлориду рН 6,8, 0,4 мл гліцерину Р, 0,8 мл розчину 100 г/л натрію додецилсульфату Р, 0,4 мл 0,1 % розчину бромфенолового синього доводять водою Р до об'єму 8,0 мл.

Розчин зберігають при кімнатній температурі протягом 2 міс.

Розділюючий гель (12 %). Розділюючий гель готують з розрахунку на об'єм 30 мл: 10,0 мл води Р, 11,9 мл 30 % розчину акриламід/бісакриламід (29:1) Р, 7,5 мл 1,5 М буферного розчину трис-гідрохлориду рН 8,8 Р, 0,3 мл

розчину 100 г/л натрію додецилсульфату P, 0,3 мл розчину 100 г/л амонію персульфату P, 0,012 мл тетраметилетилендіаміну P. Суміш перемішують, уникаючи надмірної аерації та відразу заливають між скляними пластинами.

Концентруючий гель. Концентруючий гель готують з розрахунку на об'єм 10 мл: 6,8 мл води P, 1,7 мл 30 % розчину акриламід/бісакриламід (29:1) P, 1,25 мл 1 M буферного розчину трис-гідрохлориду рН 6,8 P, 0,1 мл розчину 100 г/л натрію додецилсульфату P, 0,1 мл розчину 100 г/л амонію персульфату P, 0,01 мл тетраметилетилендіаміну P. Суміш перемішують, уникаючи надмірної аерації та відразу заливають між скляними пластинами.

Розчин порівняння (а). До вмісту контейнеру C3 Erythropoietin BRP (EP CRS) (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000) додають 0,25 мл води P або беруть 0,25 мл PC3 BAT “Київмедпрепарат”, додають 0,25 мл 2-кратного не відновлювального розчину для зразків. Розчин інкубують при температурі 95 °С протягом 2 хв, охолоджують та використовують для електрофоретичного розділення.

Розчин порівняння (б). Розбавляють C3 Erythropoietin BRP (EP CRS) (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000) водою P до концентрації 0,1 мг/мл або PC3 BAT “Київмедпрепарат” розбавляють водою P до концентрації 0,1 мг/мл, додають рівний об'єм 2-кратного не відновлювального розчину для зразків. Розчин інкубують при температурі 95°С протягом 2 хв, охолоджують та використовують для електрофоретичного розділення.

Розчин порівняння (в). Використовують розчин білків-маркерів молекулярних мас (Sigma кат. № M3913 або аналогічної якості) згідно інструкції фірми виробника.

Розчин порівняння (г). Використовують розчин порівняння білків-маркерів молекулярних мас (BioRad кат. № 161-0376 або аналогічної якості) згідно інструкції фірми виробника.

Випробовуваний розчин (а). Розводять субстанцію водою *P* до концентрації білка 0,5 мг/мл. Додають до 50 мкл отриманого розчину рівний об'єм 2-кратного не відновлювального розчину для зразків. Розчин інкубують при температурі 95 °С протягом 2 хв, охолоджують та використовують для електрофоретичного розділення.

Випробовуваний розчин (б). Розводять субстанцію водою *P* до концентрації білка 0,05 мг/мл. Додають до 50 мкл отриманого розчину рівний об'єм 2-кратного не відновлювального розчину для зразків. Розчин інкубують при температурі 95 °С протягом 2 хв, охолоджують та використовують для електрофоретичного розділення

Заливають розділюючий гель на 3,5 см нижче верхнього краю внутрішньої скляної пластинки. Нашаровують 2 бутанол *P1* для рівномірної полімеризації поверхні. Після полімеризації видаляють 2 бутанол *P1* та промивають гель водою *P*. Заливають концентруючий гель та вставляють гребінець для утворення лунок. Після полімеризації гребінець видаляють.

Встановлюють камеру в прилад для електрофорезу. Електродні камери заливають *буферним робочим розчином для електрофорезу в системі ДСН ПАГ Р*, щоб розчин на 5 мм покривав поверхню стартового гелю у першій електродній камері та на 5-10 мм покривав електроди другої електродної камери.

У лунки стартового гелю вносять зразки в об'ємі по 20 мкл в наступному порядку: розчин порівняння (в), розчин порівняння (а), випробовуваний розчин (а), декілька лунок пропустить, розчин порівняння (б), випробовуваний розчин (б) та розчин порівняння (г).

Підключають прилад до джерела постійного струму Consort (Fisher Bioblock Scientific, кат № B9850F або аналогічний) та встановлюють режим 15 мА. Після того як фронт *бромфенолового синього Р* на 0,5-1 см. зайде в

розділюючий гель режим струму змінити до 30 мА. Вимикають струм, коли фронт *бромфенолового синього Р* досягне нижнього краю скляних пластинок камери. Зливають електродний буфер та обережно знімають гель зі скляних пластинок. Гель розрізають навпіл вздовж напрямку електрофоретичного розділення між випробуваним розчином (а) та розчином порівняння (б). Виявлення білків в першій частині гелю, що містить розчини порівняння (в), (а) та випробовуваний розчин (а), проводять шляхом фарбування *розчином Кумасі фарбувального Р*, для чого відрізають відповідну частину гелю, відмивають 1-2 рази 5мМ розчином соляної кислоти, відмивають *водою Р* і занурюють її в розчин для фарбування на 1,5-2 год при кімнатній температурі.

Зливають розчин для фарбування та заливають 100 мл розчину для відмивання, інкубують при 37 °С протягом 1 год. Відмивку повторюють 5 – 6 разів до повної прозорості гелю.

Гелеву пластинку загортають в поліетилен та фотографують фотокамерою.

Обробку електрофореграми проводять за допомогою денситометра Systeme d'imagerie Bio-Vision CN1500 (Fisher Bioblock Scintific B8913H), або GelScan 6.0 BioSciTec GmbH Software Entwickl, Германія, або аналогічного. Електрофореграма є придатною для обчислення в разі, якщо значення електрофоретичної рухливості білків розчину порівняння (в) (білки-маркери молекулярних мас) обернено пропорційна значенню десяткового логарифма їх молекулярних мас.

Препарат задовольняє вимоги, якщо на електрофореграмі випробуваний розчин (а) утворює дифузну білкову смугу, яка за електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю співпадає зі смугою для розчину порівняння (а).

С. Імуноблотинг.

Буферний розчин для переносу. 5,8 г трис(гідроксиметил)амінометана P, 5,86 г гліцину P розчиняють у 500 мл води P, додають 3,85 мл розчину 100 г/л натрію додецилсульфату P, 200 мл спирту метилового P та доводять водою P об'єм до 1000 мл.

Термін придатності розчину 6 місяців.

Другу частину поліакриламідного гелю, отриману після електрофоретичного розділення випробуваного розчину (б), розчину порівняння (б) та (г) використовують для проведення імуноблотингу.

Для електропереносу використовують модуль Mini VE SE300 (Fisher Bioblock Scientific кат. № B98323 або аналогічної якості). На нітроцелюлозну мембрану для блотингу (Sigma, кат. № N7892 або аналогічної якості) поміщають поліакриламідний гель, поверх якого нашаровують 5 аркушів фільтрувального паперу та наносять буферний розчин для переносу.

Модуль підключають до джерела постійного струму Consort (Fisher Bioblock Scientific, кат № B9850F або аналогічної якості). Встановлюють струм рівним $0,8 \text{ mA/cm}^2$ поверхні гелю. Проводять електроперенос протягом 2 год. Джерело напруги відключають. Імунодетекцію проводять з використанням набору для проведення вестернблоту «ProteoQwest™ Colorimetric Western Blotting Kit, TMB Substrate, (for Rabbit Antibodies)» (Sigma, кат № PQ0121 або набір аналогічної якості, в якому вторинні антитіла повинні бути специфічними до антитіл кроля) згідно інструкції фірми виробника. В якості первинних антитіл використовують поліклональні антитіла кроля до еритропоєтину людини рекомбінантного експресованого в лінії клітин хом'ячка «Anti-Erythropoietin antibody produced in rabbit» (Sigma, кат. № E2531 або аналогічної якості) згідно інструкції фірми виробника. Для контролю специфічності імунодетекції використовують набір Chemichrome™ Ultimate (Sigma, кат. № C2117 або аналогічної якості). Всі етапи інкубації мембрани в розчинах проводять у ємності з плоским дном при кімнатній температурі та постійному перемішуванні.

Обробку мембрани проводять за допомогою денситометра Systeme d'imagerie Bio-Vision CN1500 (Fisher Bioblock Scientific B8913H) або аналогічного. Електрофореграма є придатною для обчислення у разі:

- якщо не спостерігається неспецифічної імунодетекції;
- якщо ідентифікуються чіткі білкові смуги для розчину порівняння (б);
- якщо значення електрофоретичної рухливості білків розчину порівняння (г) (білки-маркери молекулярних мас) обернено пропорційна значенню десятковому логарифму їх молекулярних мас.

Препарат задовольняє вимоги, якщо на електрофореграмі випробовуваний розчин (б) утворює дифузну білкову смугу, яка за електрофоретичною рухливістю та інтенсивністю співпадає зі смугою для розчину порівняння (б).

Д. Ізоелектрофокусування.

25% розчин поліакриламід. 24,25 г акриламід *P*, 0,75 г метиленбісакриламід *P*, додають 50 мл води *P*, перемішують до повного розчинення та доводять водою *P* до об'єму 100,0 мл. Розчин фільтрують та зберігають у темному закритому посуді при температурі 2–8 °C не більше місяця.

25 % розчин гліцерину. 25 г гліцерину *P* доводять водою *P* до 100 мл. Перемішують до повного розчинення.

Розчин зберігають протягом 1 місяця.

Суміш для полімеризації гелю. Суміш готують у наступних пропорціях на 100 мл:

55 мл – вода *P*.

20 мл – 25 % розчин акриламід.

20 мл – 25 % розчин гліцерину.

5 мл – 40 % розчин амфолітів (Pharmalyte, broad range pH 3-10, Amersham Pharmacia Biotech Ltd, кат № 17-0451-01).

До 100 мл отриманої суміші додають 15 мкл 1 г/л розчину *амонію персульфату Р*, ретельно перемішують, уникаючи надмірної аерації та дегазують.

Полімеризація гелю. Збирають пристрій для полімеризації гелю в порядку, зазначеному в інструкції з експлуатації. До суміш для полімеризації гелю додають 3 мкл *тетраметилетилендіаміну Р*, суміш ретельно перемішують, уникаючи надмірної аерації та заливають між скельцями. Гель полімеризується протягом 30–60 хв. Можливе використання готових гелів.

Катодний буфер. 20 мл 1 М розчину *натрію гідроксиду Р* доводять водою *Р* до об'єму 1000 мл.

Розчин використовують свіжоприготованим.

Анодний буфер. 10 мл 1 М розчину *ортофосфорної кислоти Р* доводять водою *Р* до об'єму 1000 мл.

Розчин використовують свіжоприготованим.

Випробовуваний розчин. Субстанцію діалізують, використовуючи діалізну систему Float-A-Lyzer (Fisher Bioblock Scientific B13863 або аналогічна) проти 100 мл *води Р* на протязі 6-12 годин.

Розчин порівняння. *C3 Erythropoietin BRP (EP CRS)* (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000), розчинений у 0,25 мл *води Р*, або *PC3 BAT "Київмедпрепарат"* діалізують, використовуючи діалізну систему Float-A-Lyzer (Fisher Bioblock Scientific B13863) проти 100 мл *води Р* на протязі 6-12 годин.

Ультратонкий поліакриламідний гель для ізоелектрофокусування формують, використовуючи камеру Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, кат №18-1018-06 або аналогічна). Поліакриламідний гель полімеризують 30–60 хв, після чого його поміщають на керамічну охолоджуючу пластину (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, кат №18-1103-46 або аналогічна), приєднану до термостату охолоджуючого (MultiTemp III Thermostatic Circulator 230 VAC II, Amersham Pharmacia Biotech Ltd, кат №18-1102-78 або

аналогічний). Разом з пластиною гель поміщають в електродну камеру, на гель наносять випробований розчин та розчин порівняння в об'ємі 15 мкл, на відповідні електродні паперові смужки наносять катодний та анодний буфери. Підключають охолодження керамічної пластини. Наносять розчин маркерних білків у об'ємі згідно інструкції до використання (Sigma, кат № I3018 або аналогічний). Камеру приєднують до джерела постійного струму EPS 3501 XL Power Supply (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, кат № 18-1130-05 або аналогічне). Ізоелектрофокусування проводять, змінюючи напругу послідовно в наступному порядку: 200 В протягом 20 хв, 400 В – 20 хв, 800 В – 20 хв, 1200 – 3 год. Префокусування – 700 В протягом 30 хв.

Вимикають струм, видаляють електродні паперові смужки. Білки в гелі виявляють методом фарбування сріблом з використанням набору PlusOne Silver Staining Kit, Protein (Amersham Pharmacia Biotech, кат № 17-1150-01 або аналогічної якості). Обробку електрофореграми проводять за допомогою денситометра Systeme d'imagerie Bio-Vision CN1500 (Fisher Bioblock Scientific, кат. № B8913H або аналогічний)

Критерієм придатності системи є розділення маркерних білків по всій довжині гелю. Випробований розчин вважається ідентифікованим, якщо на електрофореграмі діапазон розподілу ізоформ за ізоелектричною точкою для випробованого розчину та розчину порівняння співпадають та знаходяться в інтервалі рІ 2,5-5,0.

Е. Пептидне картування. Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ДФУ, 2. 2. 29).

Випробований розчин. 1,0 мл препарату діалізують протягом 6-12 год проти 100 мл *трис-ацетатного буферного розчину рН 8,5 Р*, використовуючи діалізну систему Float-A-Lyzer (Fisher Bioblock Scientific B13863 або аналогічна). 0,5 мл одержаного розчину поміщають у пластикову центрифужну мікропробірку і додають 10 мкл свіжоприготованого розчину

трипсину *P* з концентрацією 1 мг/мл. Мікропробірку герметично закривають і поміщають у водяну баню при температурі +37 °С на 18 год. Після цього реакцію зупиняють заморожуванням розчину.

Розчин порівняння. Вміст віали *C3 Erythropoietin BRP (EP CRS)* розчиняють в 0,25 мл *води P* або використовують 0,25 мл *PC3 BAT "Київмедпрепарат"*. Далі розчин готують так само і одночасно з випробовуванням розчином.

Контрольний розчин. Вода P.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором в наступних умовах:

- колонка розміром 250*4,6 мм, заповнена *силікагелем бутилсилільним для хроматографії P* з розміром часток 5 мкм;

- рухома фаза А: 0,6 мл *кислоти трифтороцтової P* розчиняють в 1000 мл *води P*;

- рухома фаза В: 0,6 мл *кислоти трифтороцтової P* розчиняють в 100 мл *води P* і доводять об'єм розчину до 1000 мл *ацетонітрилом для хроматографії P*;

- детектування за довжини хвилі 214 нм;

- використовують наступну програму градієнта:

Час, хв.	Рухома фаза А, % об/об	Рухома фаза В, % об/об	Швидкість рухомої фази, мл/хв
0-10	100	0	0,75
10-125	100→39	0→61	0,75
125-135	39→17	61→83	1,25
135-145	17→0	83→100	1,25
145-150	100	0	1,25

Перед початком хроматографування колонку врівноважують початковим складом рухомої фази не менше 15 хв.

Перед аналізом проводять інжекцію холостої проби в умовах досліду. Хроматогафують 100 мкл контрольного розчину, розчину порівняння і випробовуваного розчину.

Профіль хроматограми випробовуваного розчину має відповідати профілю розчина порівняння.

3. Прозорість (ДФУ, 2.2.1). За ступенем каламутності має витримувати порівняння з еталонним розчином II.

4. Кольоровість (ДФУ, 2.2.2, метод II). Має бути безбарвним.

5. рН (ДФУ, 2.2.3). Від 6,5 до 7,5.

6. Димер та високомолекулярні домішки Визначення проводять методом ексклюзивної хроматографії (ДФУ, 2.2.30).

Випробовуваний розчин. Препарат доводять рухомою фазою до концентрації 0,2 мг/мл.

Розчин порівняння. До 0,02 мл випробовуваного розчину додають 0,98 мл рухомої фази.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором в наступних умовах:

- колонка “TSK-Gel G2000 SW” (Supelco, cat.#805102) розміром 0,6 м*7,5 мм, заповнена *силікагелем гідрофільним для хроматографії P* з розміром пор, придатним для розділення глобулярних білків в діапазоні відносних молекулярних мас 20000 – 200000, або аналогічна ;

- рухома фаза: 1,15 г *динатрію гідрофосфату безводного P*, 0,2 г *калію дигідрофосфату P* і 23,4 г *натрію хлориду P* розчиняють в 1000 мл *води P*, при необхідності доводять рН одержаного розчину до 7,4;

- детектування за довжини хвилі 214 нм;

- швидкість рухомої фази 0,5 мл/хв.

Хроматографують по 100 мкл розчину порівняння і випробовуваного розчину. Час хроматографування становить не менше 60 хв.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо площа основного піка на хроматограмі розчину порівняння становить 1,5% - 2,5% від площі основного піка на хроматограмі випробовуваного розчину.

На хроматограмі випробовуваного розчину сума площ піків, час утримування яких менше часу утримування основного піка, не має перевищувати площу основного піка на хроматограмі розчину порівняння (2 %).

7. Сіалові кислоти.

Випробовуваний розчин (a). Препарат розводять рухомою фазою з тесту «Димер і високомолекулярні домішки» до концентрації еритропоетину 0,3 мг/мл.

Випробовуваний розчин (b). До 0,5 мл випробовуваного розчину (a) додають 0,5 мл рухомої фази з тесту «Димер і високомолекулярні домішки».

Розчин порівняння (a). 10 мг *N*-ацетилнеурамінової кислоти *P* розчиняють в 100 мл води *P*. Розведення розчинів порівняння готують змішуючи одержаний розчин з водою *P* наступним чином (Таблиця 2):

Таблиця 2

Розчин порівняння	Об'єм розчину порівняння (a), мл	Об'єм води <i>P</i> , мл
(b)	0,8	0,2
(c)	0,6	0,4
(d)	0,4	0,6
(e)	0,2	0,8
(f)	0,0	1,0

Кожен розчин порівняння готують у 3-х повтореннях. Поміщають по 100 мкл кожного з випробовуваних і розчинів порівняння у скляні пробірки об'ємом 10 мл. У кожну з пробірок додають по 1,0 мл *резорцинолового реактиву P*. Пробірки закривають і інкубують при 100 °С протягом 30 хв. Після цього їх охолоджують на льодяній бані. До кожної з пробірок додають

по 2,0 мл суміші *бутанол Р: бутил ацетат Р* (1:4) (об./об.). Вміст ретельно перемішують і вистояють до розділення шарів. Коли верхній шар стане зовсім прозорим, його обережно відділяють, щоб не зачепити нижній шар. Вимірюють оптичну густина всіх розчинів при 580 нм. Будується калібрувальний графік за поглинанням розчинів порівняння (а)–(f). За калібрувальним графіком знаходять концентрації сіалових кислот у випробуваних розчинах (а) і (b). Визначають кількість молей сіалових кислот і еритропоетину в 1 мл випробуваних розчинів (а) і (b) за формулами:

$$X_{\text{сіал.}} = \frac{C_{\text{сіал.}}}{309 \times 1000},$$

$$X_{\text{ер.}} = \frac{C_{\text{ер.}}}{30600 \times 1000}, \text{ де:}$$

$X_{\text{сіал.}}$ – кількість молей в 1 мл розчину сіалових кислот;

$X_{\text{ер.}}$ – кількість молей в 1 мл розчину еритропоетину;

$C_{\text{сіал.}}$ – одержана концентрація сіалових кислот, в мг/мл;

$C_{\text{ер.}}$ – концентрація еритропоетину у розчині, в мг/мл;

309 – молярна маса *N*-ацетилнеурамінової кислоти *Р*, г/моль;

30 600 – молярна маса еритропоетину, г/моль;

1 000 – перерахунок міліграм в грам.

Кількість молей сіалових кислот (*N*) на 1 моль еритропоетину обчислюють за формулою:

$$N = \frac{X_{\text{сіал.}}}{X_{\text{ер.}}}$$

Обчислюють середнє значення ($N_{\text{середнє}}$). $N_{\text{середнє}}$ повинно бути не менше 10.

Результат вважається достовірним, якщо оптична густина паралельних розведень розчинів порівняння відрізняється не більше 10 %, а величина оптичного поглинання розчину порівняння перевищує величину оптичного поглинання випробовуваного розчину (а) в 1,5–2,5 раз.

8. ДНК штаму продуцента.

Вміст ДНК штама-продуцента не повинен перевищувати 100 пг на 1 000 МО.

Розчин порівняння. До розчину субстанції з активність 100 000 МО додають ДНК сперми лосося (Sigma, кат. № DE7290 або аналогічної якості) до концентрації 1 мкг/мл, суміш гідролізують ендонуклеазою рестрикції (Hinf I, Amersham Pharmacia Biotech, E1061Y або аналогічної якості). Роблять 10 розведень з коефіцієнтом розбавлення 1/2. Розчинник *вода Р*. Концентрація ДНК у розведеннях повинна становити: 1 мкг/мл; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95 нг/мл.

Розведення використовувати відразу після приготування.

Випробовуваний розчин. Субстанцію доводять *водою Р* до активності 100 тис МО, готують 7 розведень з коефіцієнтом розбавлення 1/2. Розчинник *вода Р*.

Розведення використовувати відразу після приготування.

Негативний контрольний зразок. *Вода Р*.

Мічення ДНК біотином та її виявлення проводять методом «випадкового відбору», використовуючи набір «Нерадиоактивное мечение ДНК» (НПО «Силекс М», кат. № K2600 або аналогічної якості) та «Выявление ДНК, меченой биотином» (НПО «Силекс М», K2800 або аналогічної якості) згідно інструкції фірми виробника.

На нітроцелюлозну мембрану для гібридизації ДНК (Sigma, кат. № N5281 або аналогічної якості) наносять по 100 мкл розведень розчину порівняння, випробовуваного розчину та негативного контрольного зразку. Для нанесення використовують прилад для слот-гібридизації (Fisher Bioblock Scintific, B45525 або аналогічної якості), де для створення розрідження використовують вакуумний насос Air Cadet (Fisher Bioblock Scintific, кат. № B8742P або аналогічної якості). Проявлення смуг ДНК проводять до чіткої візуалізації смуги останнього розведенням розчину порівняння.

Кількісне визначення проводять за допомогою денситометра Systeme d'imagerie Bio-Vision CN1500 (Fisher Bioblock Scientific, кат. № B8913H) у випадку:

- якщо інтенсивність забарвлення смуги з негативним контрольним розчином не перевищує інтенсивність забарвлення смуг, які відповідають останньому розведенню розчину порівняння та випробуваного розчину;

- якщо всі смуги з розведенням розчину порівняння візуалізовані, а інтенсивність забарвлення між ними прямо пропорційно залежить від кількості нанесеної ДНК.

Отримане значення слід розділити на ступень розведення препарату при приготуванні випробуваного розчину.

9. Бактеріальні ендотоксини (ДФУ, 2.6.14). Не більше 20 МО на 100 000 МО еритропоетину.

10. Білок. Випробування проводять методом спектрофотометрії (ДФУ, 2.2.25).

Випробовуваний розчин. Субстанція еритропоетину.

Буферний розчин. Розчин 4 г/л амонію гідрокарбонату Р у воді Р.

До 1 мл субстанції додають 4 мл буферного розчину.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвиль 280 нм та 320 нм у кювету з товщиною оптичного шляху 10 мм, використовуючи як компенсуючий буферний розчин.

Концентрацію білка (C_6) в мг/мл обчислюють за формулою:

$$C_6 = 1,33 \times (D_{280} - D_{320}) \times 5, \text{ де:}$$

D_{280} і D_{320} - оптична густина розчину за довжини хвиль 280 нм і 320 нм, відповідно;

5 - розведення препарату;

1,33 - коефіцієнт екстинкції еритропоетину за довжини хвилі 280 нм.

Концентрація білка в препараті повинна складати не менше 0,5 мг/мл.

11. Кількісне визначення. Питома активність не менше 100 000 МО/мг білка.

А. Питома активність in vivo.

Визначення біологічної активності in vivo базується на визначенні рівня стимуляції утворення ретикулоцитів кровотворною системою нормоцитемичних мишей у порівнянні з *C3 Erythropoietin BRP (EP CRS)* (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000) або *PC3 BAT* “Київмедпрепарат”.

Випробовуваний розчин (а). Розчин субстанції розводять фосфатно-альбуміновим забуференим фізіологічним розчином pH 7.2 P1 у 1250 разів. В дві з трьох пронумерованих поліпропіленових мікропробірки об'ємом 1,5 мл вносять по 900 мкл, в третю – 800 мкл фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину pH 7.2 P1. В першу мікропробірку (№1) додають 100 мкл розчину субстанції, ресуспендують та переносять 100 мкл розчину в мікропробірку (№2). Аналогічну процедуру повторюють, переносячи 200 мкл розчину з мікропробірки №2 в №3. Вміст останньої мікропробірки додають до 24 мл фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину pH 7.2 P1.

Випробовуваний розчин (б). До 9 мл випробовуваного розчину (а) додають рівний об'єм фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину pH 7.2 P1.

Випробовуваний розчин (в). До 9 мл випробовуваного розчину (б) додають рівний об'єм фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину pH 7.2 P1.

Розчин порівняння (а). *C3 Erythropoietin BRP (EP CRS)* (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000) розчиняють фосфатно-альбуміновим забуференим фізіологічним розчином pH 7.2 P1 в 441 раз до кінцевої активності 80 МО/мл. Вміст флакону *C3 Erythropoietin BRP (EP CRS)* розчиняють в 1 мл води P. В мікропробірку вносять 900 мкл фосфатно-

альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1 додають 100 мкл розчину стандартного зразку, ретельно перемішують. До 0,57 мл одержаного розчину вносять 24,4 мл фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1 та ретельно перемішують.

Розчин порівняння (б). До 9 мл розчину порівняння (а) додають рівний об'єм фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1.

Розчин порівняння (в). До 9 мл розчину порівняння (б) додають рівний об'єм фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1.

Розчин антикоагулянту. 1 мл розчину 0,5 М динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти Р доводять водою Р до об'ємом 100 мл.

Розчин зберігають протягом 6 міс в герметичному скляному посуді.

Для визначення використовують білих мишей віком біля 8 тижнів та масою (20 ± 1) г, які утримувались за стандартних умов віварія протягом щонайменше 10 днів. Тварин розділяють на шість груп, кожна з яких повинна складатися з щонайменше з 8 піддослідних. Групи нумерують. Семи тваринам кожної групи проводять внутрішньочеревно ін'єкцію по 0,5 мл випробованого розчину або розчину порівняння в наступному порядку: група №1 – випробовуваним розчином (а), №2 – випробовуваним розчином (б), №3 – випробовуваним розчином (в), №4 – розчином порівняння (а), №5 – розчином порівняння (б), №6 – розчином порівняння (в). Одна з восьми тварин не отримує ін'єкцію жодним розчином. Після обробки тварин повторно розділяють по групам так, що б в кожній групі містилось по шість тварин, які отримали ін'єкцію однаковими розчинами, по одній тварині – одним з п'яти інших розчинів та по одній необробленій тварині (контрольний тест). Продовжують утримання в стандартних умовах віварію протягом чотирьох діб та роблять забір крові з хвостової вени. Для цього хвіст тварини занурюють у воду Р та роблять надріз, з якого за допомогою скляної або

одноразової пластикової піпетки відбирають кров і вносять для її стабілізації до рівного об'єму розчину антикоагулянту. До 100 мкл стабілізованої крові вносять 300 мкл розчину бриліантового креазолового (Fluka, кат. № 16035 або аналогічної якості), ретельно перемішують та інкубують при кімнатній температурі протягом 40 хв. По завершенню інкубації готують мазки для мікроскопії. Для цього суміш крові та розчину бриліантового креазолового повторно перемішують, 20 мкл наносять на підготовлену поверхню предметного скельця, яку відразу ж розмазують предметним скельцем та висушують на повітрі. Визначають співвідношення ретикулоцитів до еритроцитів, використовуючи для цього мікроскоп та відеосистему на базі фотокамери. Для підрахунку кількості кілітин роблять захват видимого в об'єктиві зображення. Підраховують кількість ретикулоцитів (клітини синього кольору з крапками-включеннями) на 1 тис. еритроцитів (клітини блакитного кольору). Визначають коефіцієнт підвищення кількості ретикулоцитів (КПКР) для кожного з випробовуваних розчинів та розчинів порівняння за співвідношенням кількостей ретикулоцитів (на 1 тис. еритроцитів) для кожної з піддослідних тварин по відношенню кількостей кількості у контрольних тварин (тварини, що не отримали ін'єкцію жодним з розчином). Розраховують залежність КПКР від логарифма активності еритропоєтину у розчині порівняння (а), (б) та (в). За розрахованим КПКР для випробовуваного розчину (а), (б) та (в) визначають істинне значення активності для кожного з них. Отримане значення активності помножують на відповідний коефіцієнт розведення препарату. Для випробовуваного розчину (а) коефіцієнт розведення становить 1250, для випробовуваного розчину (б) – 2500, для випробовуваного розчину (в) – 5000. Знаходять середнє арифметичне отриманих значень активності. Питому активність визначають за формулою:

$$A_{п} = \frac{A}{C}, \text{ де}$$

$A_{п}$ – питома активність субстанції;

A – активність субстанції в 1 мл;

C – концентрація білка (мг/мл).

Питома активність субстанція повинна бути не менше 100 000 МО/мг білка.

В. Питома активність методом ІФА.

Вміст рекомбінантного еритропоетину людини в субстанції визначений методом ІФА повинен становити не менше 100 000 МО/мг білка.

Випробовуваний розчин. Розчин субстанції з активністю що відповідає вимогам чутливості набору ProConEPO2. Готують не менше трьох розведень. Розчинник буфер для розведення зразків із набору.

Розчин порівняння. Розчин *C3 Erythropoietin BRP (EP CRS)* (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000) або *PC3* з активністю що відповідає активності випробовуваний розчину. Готують не менше трьох. Розчинник буфер для розведення зразків із набору.

Визначають активність випробуваних розчину та розчинів порівняння відносно внутрішнього стандарту набору ProConEPO2 (ТОВ “Протеїновий контур”, Росія, кат. № K041 або аналогічної якості), згідно інструкції фірми виробника. За 100 % приймають значення розчинів порівняння. Активність розведень субстанції відносно стандартного зразка повинна знаходитись в межах від 85 до 125 %. Довірчий інтервал (R) визначають за рівнянням, що описує залежність десяткового логарифма активності від оптичної густини зразка в імуноферментній реакції. Враховуючи коефіцієнт розведення кожного з розчинів, розраховують активність стандартного зразка та субстанції (МО/мл).

Питому активність визначають за формулою:

$$A_{п} = \frac{A}{C}, \text{ де}$$

$A_{п}$ – питома активність субстанції;

A – активність субстанції в 1 мл;

C – концентрація білка (мг/мл).

Примітка. Реактиви, титровані розчини та індикатори, наведені в аналітичній нормативній документації, описані у відповідних розділах діючого видання ДФУ.

УПАКОВКА

Субстанція у скляних пляшках з боросилікатного скла з притертими кришками.

Групова і транспортна тара відповідно до НД фірми.

МАРКУВАННЯ

На етикетці вказують країну-виробник, фірму-виробник і її товарний знак, назву препарату англійською мовою, міжнародну непатентовану назву, концентрацію білка в мг/мл, активність у МО/мл, об'єм у мл, «Стерильно», номер серії, термін придатності.

Транспортне маркування відповідно до НД фірми-виробника.

ТРАНСПОРТУВАННЯ

Відповідно до НД фірми-виробника, при температурі не вище 8 °С.

ЗБЕРІГАННЯ

В оригінальній упаковці, при температурі від 2°С до 8°С.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Розділ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання для виробничого культивування
продуцента (Табл 5.1.).

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання для виробничого культивування

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
Н-11 Н-15 Н-18	Насос відцентровий	3	Насос марки Pedrollo РКм 30. Продуктивність від 30 л/хв до 300 л/хв . Сталь.
ПЗ-1	Пристрій для забору повітря	1	Повітрозбірник ВВ-3,2-1. Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу DF 1100. Фільтруючий матеріал – нетканний матеріал, продуктивність – 1100 Е = 80 % .
К-3	Компресор	1	Гвинтовий компресор серії ADP720, продуктивність 300 м ³ /год, тиск всмоктування 1,0 Мпа .
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії типу RA-200 фірми «ОМІ», продуктивність 20м ³ /хв .
Р-5	Ресивер	1	Ресивер повітряний серії типу РВ 900/10 бежецького заводу (Росія), об'єм 900 л, робочий тиск 10 Атм .
Т-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач серії СВМ фірми " Systemair", потік повітря 1,5 м/с, виготовлений з листової сталі з алюцинковим покриттям.
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Панельний осередковий фільтр класу F9. Фільтруючий матеріал мікроскловолокно. Максимальна робоча температура: 300 °С. Ступінь очищення становить 90- 99 % .

НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.	Арк.	Акробіє
Розроб.		Приймак Д.						113
Перевір.		Пенчук Ю.М.			Кафедра БТМ			
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

Ф-10 Ф-13 Ф-20	Індивідуальний фільтр очистки повітря	3	Фільтри Donaldson P770735 виготовляється у вигляді фільтропатронів Е = 99,99 % .
I-8	Інокулятор	1	Інокулятор об'ємом 10 л, оснащений сорочкою, барботером, трубою перетискування, пробовідбірником, лопатевою мішалкою (до 20-1500 об/хв), сталь AISI 304. Виробник: «BIOSTAT Cplus» .
P-9 P-16	Реактор-змішувач для приготування композиції А	2	Реактори-змішувачі об'ємом 30 л; 343 л. Реактори оснащені мішалками (W=100 об/хв.). Нержавіюча сталь .
P-10 P-12	Реактор-змішувач для приготування композиції Б	2	Реактори-змішувачі об'ємом 7 л; 50 л. Реактори оснащені мішалками (W=100 об/хв.). Нержавіюча сталь .
I-14	Інокулятор	1	Інокулятор, об'ємом 0,006 м ³ , оснащений паровою сорочкою, барботером, мішалкою, пробовідбірником, трубою перетискання та автоматичним датчиком рівня піни. Швидкість перемішування (до 8-500 об/хв). Нержавіюча сталь.
ФР-17	Виробничий ферментер	1	Ферментер компанії «BIOТЕХНО» об'ємом 0,063 м ³ оснащений мішалкою із нержавіючої сталі, швидкість перемішування (до 16- 1000 об/хв). Також має барботер для подачі стерильного повітря та нижній спуск. Нержавіюча сталь.

Специфікація обладнання для виділення та очищення білку наведена у *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Пристрій для забору повітря оснащений металевою сіткою для видалення механічних забруднень.28
Ф-2	Фільтр грубої очистки	1	Панельний металічний фільтр (G2). Фільтруючий матеріал – плетена алюмінієва проволочка, E = 75 %. Виробник: «General filter» (Італія).29
В-3	Вентилятор	1	Вентилятор серії МВ Продуктивність: 500 – 30000 м3/год Повний тиск: 250 – 1600 Па Виробник: «Атон Сервіс» (Україна)
Т-4	Теплообмінник	1	Теплообмінник для нагрівання/охолодження повітря Systemair PGK. Робочий тиск 1,6 МПа. Виробник: «Systemair» (Швеція).30
Ф-5	Фільтр попередньої очистки	1	Фільтр F9. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно з алюмінієвими розділювачами, E = 98%. Виробник: «General filter» (Італія).
Ф-6	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр H14. Фільтр складається з корпусу, який представляє собою алюмінієвий або оцинкований профіль, всередині якого покладений фільтруючий матеріал у вигляді гофри. E = 99,99%. Виробник: фірми Luxfilter (Росія)
Ф-7	Фільтр ультратонкої очистки з ламінізатором	1	Фільтр U17. Фільтр складається з корпусу, який представляє собою алюмінієвий або оцинкований профіль, всередині якого покладений фільтруючий матеріал у вигляді гофри. E = 99,9999995%. Поверх фільтруючого матеріалу натягнута ламінаційна тканина. Виробник: фірми Luxfilter (Росія)
Н-8	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo PKm 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31
ПФ-9	Піщаний фільтр	1	Піщаний фільтр для води тип WGSF 10, Виробник: Aquina

			Країна виробник: Німеччина Швидкість фільтрації 10 літр/хв.32
ВФ-10	Вугільний фільтр	1	Фільтр ECOSOFT FPA 2162 CG125 Витрата води на регенерацію 0.8-1.9 м3. Країна-виробник Україна Продуктивність 10 л/ч.33
Н-11	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31
ІМ-12	Іонообмінний модуль	1	Двох колонна система пом'якшення води, що містить 5 кг кварцового піску та 75 л іонообмінних смол. Пом'якшувач повністю автоматичний, запускається одинарною головкою із подвійною системою керування, яка контролює виробництво пом'якшеної води та час роботи пом'якшувача. Номінальна продуктивність: 600 л/год.34
Н-13	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31
УЗО-14	Установка зворотнього осмосу	1	Система зворотнього осмосу складається із однієї, двох та трьох колон діаметром 4 дюйми, що містять 2 осмотичні мембрани типу HIGH POWER . Система підключена до ПК та містить вмонтований лічильник води, що дає можливість керувати та контролювати виробництво осмосу та концентрату. Номінальна продуктивність: 300-900 л/год Виробник: Toray, Японія. Мембрана ТМН20А-430.35
Н-15	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31
З-16	Збірник	1	Збірник об'ємом відповідно 630 л оснащений вбудованим тенном для підтримування температури, сталь 12Х18Н10Т.36
Н-17	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31

БД-18	Багатоступінчастий дистилятор	1	Багатоступінчастий дистилятор МЕСО 3МЕ5 для отримання води для ін'єкцій Продуктивність по дистиляту 273-291 л / год.37
Р-19 Р-28	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач об'ємом 630 л. Реактор оснащений мішалкою (W=100 об/хв.). Нержавіюча сталь.38
Н-20	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31
Ц-21	Центрифуга	1	Продуктивність: до 600 кг/г; фактор розділення: 1100; ротор- діаметр:0,9; частота обертання:1500; встановлена потужність: 30,05кВт.39
Н-22	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31
Н-23	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31
УЗД-24	Ультразвуковий дезінтегратор	1	Потужність 1800 Вт. Робоча частота: 19,5-20,5 кГц. Електроживлення: 100 ~ 240 В, 50 ~ 60 Гц. Таймер: є. Місткість подрібнювача: 50-1200 мл Регулювання температури: є40
УУ-25	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка Bucher MiniStar з мембранами від компанії Міліпор, розмір пор 9 нм. Швейцарія.41
Н-26	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31
ІХ-27	Іонообмінний хроматограф	1	Хроматографічна система BioLogic Ір Насос: Швидкість потоку: 0,05-20 мл/хв Робочий тиск: до 0,2 МПа Робоча температура: 4-40оС Збір фракцій: Колектор фракцій на 100 пробірок, діаметром до 13мм.42
Н-29	Насос відцентровий	9	Насос марки Pedrollo РКм 90. Продуктивність 0,4 м3/год, потужність 0,75 кВт. Сталь.31

АХ-30	Афінний хроматограф	1	Хроматограф Perkin Elmer Напруга: 100-120 В/220/240 В Струм: 1,6 / 0,8 А Потужність: 120 ВА Зовнішні розміри (Ш) x (Д) x (В): 34 x 49 x 17 см.43
ГФ-31	Стіл для сортування поршнів, шприців та ковпачків	1	Прямокутної форми, покритий зверху листом нержавіючої сталі. Обладнаний нависними лампами денного світла. З трьох сторін стіл обмежений бортиком висотою 150 мм. Сталь 12Х18Н10Т.
ГФ-32	Установка для миття ковпачків	1	Установка складається з рами, камери миття; трубопроводів для подачі повітря, пари, води очищеної; трубопроводу переливу, електродвигуна, електрошафи. Продуктивність 68–80 тисяч штук за цикл. Тривалість циклу не більше 120 хв. Об'єм камери 0,78 м3. Виробник: ВАТ «НИКТИ спецоборудование», м. Маріуполь.
ГФ-33	Установка миття, силіконування, стерилізації і сушіння гумових поршнів	1	Установка складається зі станини, посудини, камери миття, насоса з приводом, трубопроводу передачі поршнів, апарата стерилізації, пульта керування, ємностей для стерильних поршнів. Продуктивність установки, поршнів за цикл, 90 тисяч штук. Тривалість одного циклу роботи установки 180 хв. Завантаження поршнів вручну, вивантаження – самопливом. Трубопроводи подачі пари й очищеної води оснащені фторопластовими фільтрами. Виробник: ВАТ «НИКТИ спецоборудование», м. Маріуполь.
ГФ-34	Автомат для миття шприців АМФ-9-6	1	Автомат миття шприців складається з столу-накопичувача, ланцюгового транспортеру, блоку вібраторів, ванни для води очищеної, вузла споліскування шприців, електропульту управління. Продуктивність 5400 шприців за годину. Мийна машина оснащена вузлом для продування шприців за допомогою стисненого повітря. Виробник: ПАТ «Київмедпрепарат»

ГФ-35	Фасувальний автомат	1	Апарат для розливу марки AFG-320V-LE, RRD. Складається з накопичувача карусельного типу для шприців з безступінчастим регулюванням швидкості обертання; автомата фасувально-закупорювального, обладнаного пристроєм з кондиціонером і ламінаром, автомата для обкатування шприців алюмінієвими ковпачками, стрічкового конвеєра. Продуктивність 132 до 320 шприців за хвилину. Виробник фірма «Bosch»
ФПА-37	Фасувально-пакувальний апарат	1	Фасувально-пакувальний апарат Axomatic.46

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

6.1. Опис технологічної схеми біосинтезу еритропоетину

Технологічна схема біосинтезу *E.coli* BL21 (DE3) для одержання рекомбінантного еритропоетину включає допоміжні роботи (санітарна підготовка виробництва, підготовка аераційного повітря і поживних середовищ) та технологічний процес (підготовка посівного матеріалу і біосинтез білка).

Технологічну схему біосинтезу біомаси наведено у графічній частині курсового проекту.

ДР 1. Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрязабірник (ПЗ-1) на висоті 8 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 1.2. Попереднє грубе очищення повітря

Попередню очистку повітря здійснюють у фільтрі (Ф-2), що забезпечує ступінь очищення 80%. При проходженні повітря через фільтр грубого очищення, пил, механічні частки діаметром 5–10 мкм затримуються, знижується кількість контамінантів.

ДР 1.3. Компресування повітря

Стиснення повітря відбувається за допомогою компресора (К-3), при цьому створюється тиск величиною 0,4 Мпа, температура повітря підвищується від 120 до 250°C. Знищується значна кількість контамінуючої мікрофлори.

ДР 1.4. Охолодження повітря та видалення зайвої вологи

Для видалення вологи, що утворилася при компресуванні, повітря піддають швидкому охолодженню до 19 °С у теплообмінному апараті (Т-4),

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Приймак Д.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрівія</i>
<i>Перевір.</i>		Пенчук Ю.М.					120	23
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.						

далі видалену вологу подають на ресивер (Р-5), у якому відбувається видалення зайвої вологи до $W = 60 \%$.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

З метою запобігання утворення конденсату пари, на волокнах головного та індивідуальних фільтрів, охолоджене повітря у теплообміннику (Т-6) нагрівають до температури $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Повітря пропускають через головний фільтр (Ф-7), в якому фільтрувальним матеріалом є мікроскловолокно. Ступінь очищення становить $E = 95 \%$.

ДР 1.7. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Перед кожним апаратом встановлюють індивідуальний фільтр (Ф-10, Ф-13, Ф-20), в якому фільтруючим матеріалом є боросилікат. Ступінь очищення становить $E = 99,999 \%$.

ДР 2. Приготування та стерилізація поживного середовища

ДР 2.1 Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту об'ємом 300 мл в колбах на качалках

Вміст компонентів для приготування 300 мл середовища наведено у *табл. 6.1.*

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 0,3 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 300 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Триптон	10	3	А	94,5
Дріжджовий екстракт	5	1,5		
Вода		90		
<u>NaCl</u>	10	3	Б	153
Вода		150		
Ампіцилін	0,1	0,03	В	52,5
Вода		52,47		
Разом:		300		300

ДР 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 3 г триптона, 1,5 г дріжджового екстракту, переносять в колбу об'ємом 250 мл, додають 90 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С 40 хв.

ДР 4.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують 3 г NaCl, вносять в колбу об'ємом 250 мл, додають 150 мл дистильованої води, закривають ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при температурі 131 °С 40 хв.

ДР 4.1.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують 0,03 г ампіциліну. Наважку переносимо у колбу об'ємом 100 мл і додаємо 52,5 мл води дистильованої, перемішуємо. Розчин набираємо в шприц для фільтрування. На шприц надягаємо міліпоровський фільтр, діаметром пор 0,2

мкм. Стерилізація здійснюється продавлюванням через фільтр у стерильну колбу. Розчин вносить у поживне середовище. Зберіганню не підлягає.

ДР 2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

Вміст компонентів для приготування 3,0 л поживного середовища наведено в *табл. 6.2*.

Таблиця 6.2

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 3,0 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 3,0 л середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Триптон	10	0,3	А	1,4
Дріжджовий екстракт	5	0,2		
Вода		0,9		
<u>NaCl</u>	10	0,3	Б	0,8
Вода		0,5		
<u>Ампіцилін</u>	0,1	0,003	В	0,5
Вода		0,47		
Конденсат		0,3		
Разом:		3,0		3,0

ДР 4.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують 300 г триптона, 200 г дріжджового екстракту, переносять в колбу об'ємом 2 л, додають 900 мл питної води, перемішують. Колбу закривають ватно-марлевою пробкою та стерилізують в автоклаві при температурі 112 °С 40 хв.

ДР 4.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують NaCl- 300 г, переносять в колбу об'ємом 1 л, додають 500 мл питної води, перемішують до розчинення солі. Потім

розчин переносять в інокулятор об'ємом 10 л і додають 1000 мл питної води, перемішують, і стерилізують за температури – 131°C тиску – 0,2 МПа, впродовж 40 хвилин.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують 3 г ампіциліну. Наважку переносимо у колбу об'ємом 50 мл і додаємо 5 мл питної води, перемішуємо. Розчин набираємо в шприц для фільтрування. На шприц надягаємо міліпоровський фільтр, діаметром пор 0,2 мкм. Стерилізація здійснюється продавлюванням через фільтр у стерильну колбу. Розчин вносить у поживне середовище. Зберіганню не підлягає.

ДР 4.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в ферментері об'ємом 60 л

Вміст компонентів для приготування 30 л поживного середовища наведено в *табл. 6.3*.

Таблиця 6.3

Розрахунок вмісту компонентів для приготування 30 л середовища.

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 30 л середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Триптон	10	300	А	9350
Дріжджовий екстракт	5	150		
Вода		9000		
<u>NaCl</u>	10	300		17300
Вода		17000		
Ампіцилін	0,1	3	В	2350
Вода		347		
Конденсат		3000		
Разом:		30		30

ДР 4.3.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах зважують триптон - 300 г, дріжджовий екстракт - 150 г, вносять у збірник об'ємом 30 л (Р-9) через об'ємно-ваговий дозатор додають 9 л питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 35-40 °С до повного розчинення. Після чого, самопливом розчин зі збірника подають в інокулятор (І-14). В сорочку інокулятора подають гостру пару та стерилізують при температурі 112 °С протягом 1 год.

ДР 4.3.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах зважують NaCl - 300 г, вносять у збірник об'ємом 20 л (Р-10) через об'ємно-ваговий дозатор додають 17 л питної води, вмикають мішалку та подають пару в сорочку до температури 35-40 °С до повного розчинення. Після чого, за допомогою насоса розчин зі збірника подають в інокулятор (І-). В сорочку інокулятора подають пару до температури 80-90 °С, далі в апарат подають гостру пару та стерилізують при температурі 131 °С протягом 1 год.

ДР 3.3.4. Приготування та стерилізація композиції В

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують 3 г ампіциліну. Наважку переносимо у колбу об'ємом 750 мл і додаємо 347 мл питної води, перемішуємо. Розчин стерилізуємо, використовуючи фільтр з порами 0,2 мкм.

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1. Підтримання колекційної культури E.coli BL21 (DE3)

Колекційну культуру *E.coli* BL21 (DE3) зберігають у пробірках з МПА. Пересіви здійснюють кожні 3–4 місяці. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

ТП.3.2 Одержання робочої культури E.coli BL21 (DE3) на чашках Петрі.

Колекційну культуру, що зберігається у пробірках з вказаним вище середовищем, розсівають петлею до ізолюваних колоній на чашки Петрі з суцільним агаром і вирощують при температурі 30°C.

ТП 3.3. Вирощування робочої культури

Отримані ізолювані колонії від ТП 3.2 пересівають петлею в пробірки з середовищем складу (г/л): триптон – 20, дріжджовий екстракт – 10, NaCl– 10 (одна ізолювана колонія використовується для засіву однієї пробірки). В пробірки пересівають ізолювані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Вирощують бактерії при 30 °С впродовж 9 годин.

ТП 3.4. Вирощування інокуляту в колбах на качалках

У колбу об'ємом 750 мл з композицією А (від ДР 2.3.1) в асептичних умовах вносять композицію Б (від ДР 2.3.2) та композицію В (від ДР 2.3.3). Перемішують і розливають стерильним мірним циліндром (200 мл) по 150 мл у дві качалочні колби об'ємом 750 мл.

Культивування *E.coli* BL21 (DE3) здійснюють в колбах на качалці (180 об/хв) впродовж 9 год. Після вирощування інокуляту здійснюють мікробіологічний контроль в кожній колбі.

Після перевірки посівного матеріалу на відсутність сторонньої мікробіоти, в лабораторному боксі посівний матеріал зливають в стерильну засівну колбу об'ємом 750 мл.

ТП 3.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л

В інокулятор (І-8), зі стерильною композицією А (від ДР 2.4.1) вносять композицію Б (від ДР 2.4.2) та композицію В (від ДР 2.4.3).. Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від ТП 3.4) подають в асептичних умовах через стерильну засівну колбу, об'ємом 1 л.

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 28 – 30°C), та культивують

впродовж 9 год. Кожні 4 – 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 3.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 60 л

В інокулятор (І-14), зі стерильною композицією А (від ДР 2.5.1) вносять композицію Б (від ДР 2.5.2) та композицію В (від ДР 2.5.3).. Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від ТП 3.5) подають в асептичних умовах через трубу перетискання, під надлишковим тиском, подаємо у виробничий ферментер.

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку (для підтримання температури 28-30°C), та культивують впродовж 9 год. Кожні 4 – 6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрації біомаси.

ТП 4. Біосинтез

ТП 4.1. Виробниче культивування

У ферментер (ФР-17) зі стерильною композицією А (від ДР 3.3.1) через трубу перетискання, під надлишковим тиском вносять композицію Б (від ДР 3.3.2) та композицію В (від ДР 2.3.3)..

Перед внесенням посівного матеріалу, відбирають пробу для проведення мікробіологічного контролю.

Посівний матеріал (від ТП 3.5) подають через трубу перетискування з інокулятора (І-14).

Вмикають мішалку, подають стерильне повітря в барботер, подають пару в рубашку та культивують при температурі 37 °С впродовж 18 годин.

Кожні 4–6 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю, визначення рівня біомаси та концентрації.

6.2. Опис технологічної схеми одержання готового препарату

Технологічна схема виділення та очищення одержання рекомбінантного еритропоєтину включає в себе технологічний процес (дезінтеграція клітин кишкової палички, відділення білка від культуральної рідини та його очищення, гідроліз білка, фасування у шприци, сушіння білка, закупорювання шприців, пакування маркування та відвантаження) та допоміжні роботи (підготовка повітря, водопідготовка, підготовка шприців, ковпачків та коробок).

Технологічну схему виділення та очищення білка наведено у графічній частині курсового проекту.

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря для цеху

Контроль мікробної обнасіненості повітря виробничих приміщень проводять за допомогою «Прибору для бактеріологічного аналізу повітря» системи Кротова не рідше 2-3 рази в тиждень. Вміст аерозольних часток визначають за допомогою оптичного лічильника часток 1 раз в тиждень.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору зовнішнього повітря необхідно враховувати існуючі та можливі джерела аерозольних і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі рослини та ін). Забір повітря проводиться за допомогою повітрязабірника (ПЗ-1). Забір атмосферного повітря відбувається на висоті близько 5 м.

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром понад 10 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують – фільтри грубої очистки G 4 (Ф-2), злегка змащене пружне скловолокно спеціального плетіння. В середині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал. Ступінь очищення становить $E = 90\%$.

ДР 1.3. Стабілізація термодинамічних показників

Повітря за допомогою вентилятора (В-3) подається до кожухотрубного теплообмінника (Т-4), охолоджується за допомогою холодоагенту фреону або підігрівається до 17–18 °С в залежності від пори року, коли проводиться забір повітря.

ДР 1.4. Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки

Попередня фільтрація відбувається на фільтрі F 9 (Ф-5), який призначений для попередньої очистки повітря від великодисперсних часток розміром більше 5 мкм (великий пил, продукти корозії), а також для захисту більш ефективного фільтру тонкої очистки. Ступінь очищення повітря 98%.

ДР 1.5. Очищення повітря на фільтрах тонкої очистки

Очищення повітря від пилу та мікроорганізмів здійснюється на фільтрах особливо тонкої очистки Н 14 (Ф-6). Після нього повітря направляється до приміщень класів чистоти В.

ДР 1.6. Очищення повітря на фільтрах ультратонкої очистки

Очищення повітря здійснюється на фільтрах особливо ультратонкої тонкої очистки U17 (Ф-7). Ступінь очищення повітря 99,999995%. Після нього повітря направляється до локальної зони класу чистоти А.

ДР 2. Водопідготовка

Вода береться з міської водопровідної мережі подається за допомогою автоматичної системи тиску. Ця вода використовується для забезпечення подачі води на соціальні потреби. Воду очищену отримують з води питної. Воду для ін'єкцій отримують з води очищеною.

ДР 2.1. Отримання води очищеної

Етапи отримання води очищеної : спочатку воду підігрівають, після цього пропускають через грубу фільтрацію за допомогою піщаних фільтрів, далі відбувається процес пом'якшення, фільтрація через вугільний фільтр і зворотній осмос.

ДР 2.2. Очищення на піщаному фільтрі

На даному етапі відбувається відокремлення з води механічних частинок розміром 50-100 мкм, а також видалення з води заліза марганцю і сірководню. В якості фільтруючого матеріалу використовують марганцево-зелений пісок (ПФ-9), який служить каталізатором окиснення розчинених у воді двовалентного заліза і марганцю розчиненим киснем, після чого вони переходять в нерозчинну форму і випадають в осад. Утворений осад видаляється після проведення періодичного промивання.

ДР 2.3. Пом'якшення води

Завдяки процесу пом'якшення знижується жорсткість води за рахунок видалення іонів кальцію і магнію. Пом'якшення дозволяє значно знизити вміст іонів перед подачею на зворотній осмос. В якості фільтруючого матеріалу можна використати смолу DOWEX HCR-S. Пом'якшення працює на принципі заміни іонів кальцію і магнію іонами натрію і періодично регенеруються розчином хлориду натрію.

ДР 2.4. Очищення на вугільному фільтрі

Для збереження зворотньо-осмотичних мембран від деградації при наявності в воді активного хлору передбачено його видалення на фільтрі з активним вугіллям (ВФ-10). Також знижується кольоровість води та зменшується вміст низькомолекулярних речовин.

ДР 2.5. Зворотній осмос

Очищення води на установці зворотнього осмосу (УЗО-14) необхідна для забезпечення високої знесоленості води, наприклад можна використовувати двоступінчасту установку зворотного осмосу, яка призначення для повного видалення з води іонів розчинених солей, колоїдних домішок і механічних частинок. Видалення домішок відбувається за рахунок використання напівпроникної мембрани, воду подають під тиском, що перевищує осмотичний. Для покращення ефективності процесу

використовують тангенціальну подачу до поверхні мембрани при рециркуляції.

ДР 2.6. Ультрафіолетове опромінення

Ультрафіолетове опромінення призначене для підтримки мікробіологічної чистоти. Всередині корпусу бактерицидних ламп розташовуються дві труби – внутрішня з кварцового скла, і зовнішня з полівінілхлориду, герметично з'єднані гумою і спеціальними герметиками між собою. Сама бактерицидна лампа розташовується усередині колби з кварцового скла. Її промені безперешкодно проникають через кварцове скло і знищують все живе у воді, що проходить між внутрішньою і зовнішньою колбою.

ДР 2.7. Вода для ін'єкцій

Вода очищена передається до багатоступінчастої дистиляційної установки (БД-18), в основі роботи якої лежить принцип багаторазового випарювання і конденсації попередньо підготовленої води. Пар, який утворюється в першій колоні, конденсується в дистилят, підігріваючи при цьому другу колону, пар з другої колони нагріває третю колону, яка вже працює при атмосферному тиску. Так тільки в останній колоні отриманий пар охолоджують, енергію при цьому використовують на підігрів тільки першої колони дистилятора, а охолоджуючу воду – тільки в останній колонці, для того щоб охолодити пару.

ДР 2.8. Зберігання води для ін'єкції

Воду для ін'єкцій потрібно зберігати в реакторах або в баках виготовлених з нержавіючої сталі в асептичних умовах (З-16). Воду для ін'єкцій дозволено зберігати протягом 24 годин з моменту отримання. При тривалішому зберіганні вода поглинає з повітря діоксид і кисень. Вода зберігається при температурі 80-90°C під тиском 3 атм та постійному перемішуванні 300 об/хв.

ДР 3. Підготовка шприців

Зі складу шприци у картонних ящиках передають на попередній перегляд і перекладання. Після розтарення шприци встановлюють у положення «горлом вгору» на пристрій для перекладання (ГФ-29) у нержавсталеву трибортову тару. Проводять візуальний перегляд і відбраковують шприци, що мають включення, відхилення від вимог НД за зовнішнім виглядом та геометричними параметрами. Брак збирають у контейнери, маркують етикетками і передають на утилізацію.

ДР 3.1. Миття шприців

Шприци в трибортовій тарі передають на миття, яке проводиться очищеною водою за допомогою ультразвуку на машині атоматичного миття шприців типу АМФ-9-6 (ГФ-35).

Температура води очищеної від 40 до 50 °С. Контроль температури за допомогою приладів контуру розподілу води очищеної. Тиск очищеної води на лінії – від 0,20 до 0,24 МПа.

ДР 3.2. Ополіскування шприців

Шприци вручну подаються на накопичувальний стіл АМФ-9-6, потім за допомогою шнека ланцюгового транспортеру занурюються у ванну з водою. Ванна обладнана ультразвуковими магнітострикційними випромінювачами, що впливають на процес миття ультразвуком. Після чого шприци надходять до вузла ополіскування внутрішньої і зовнішньої поверхонь ін'єкційною водою (температурою від 80 до 95 °С), що надходить через форсунки.

ДР 3.3. Сушіння та стерилізація шприців

Після ополіскування у шприци подається стиснуте повітря, за допомогою якого з шприців видаляється залишкова волога і шприци переорієнтовуються «горлом вгору». Чисте стиснуте повітря попередньо проходить через фільтр з номінальною тонкістю фільтрації 0,2 мкм.

Шприци, що надходять із мийної машини АМФ-9-6 подаються за допомогою шнека на конвеєрну стрічку тунельного стерилізатора «Pyroklenz-600» спочатку в зону сушіння-стерилізації, потім у зону стабілізації-охолодження.

Зони тунельного стерилізатора знаходяться в зоні ламінарного потоку стерильного повітря. Повітря за допомогою вентилятора через попередній фільтр подається на фільтр стерилізації «HEPA» при температурі 330-350 °C, що підтримується за допомогою регулюючого приладу пульта управління. Час перебування шприців у зоні сушіння-стерилізації – 9 хв, у зоні охолодження-стабілізації – 5-7 хв. У зоні охолодження-стабілізації шприци охолоджуються стерильним повітрям до температури 50-60 °C. Шприци, що виходять з тунельного стерилізатора, подаються на накопичувальний стіл фасувального автомата (ГФ-35) у стерильну зону. Накопичувальний стіл знаходиться у зоні ламінарного потоку технологічного повітря.

Контроль температури здійснюється по реєструючому приладу, розташованому на пульті управління.

У разі потреби стерильні шприци можуть зберігатися в закритих кришками деках не більше 24 год в умовах, що виключають можливість порушення стерильності шприців. Деки з флаконами маркують етикетками встановленого зразка із значенням назви матеріалу, номеру партії, кількості, дати та часу стерилізації, прізвища і підпису відповідального.

Тривалість операції підготовки шприців – від 8,0 до 10,0 год.

ДР 4. Підготовка поршнів

При надходженні на підприємство поршні проходять вхідний контроль у ВКЯ і зберігаються на складі сировини та матеріалів в умовах, закладених у АНД.

Після розтарення проводять попередній перегляд і сортування гумових поршнів, відбраковуючи гумові пробки з видимими дефектами: відхиленням

та зовнішнім виглядом, відтінок кольору, геометричні розміри на фасувальному столі (ГФ-29). Брак збирають у контейнери, маркують етикетками і відправляють на утилізацію.

Підготовку поршнів проводять на установці для миття, силіконування, стерилізації і сушіння (ГФ-29).

Стиснуте повітря, що подається на установку, проходить очищення на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 10,0 мкм.

Пара, що надходить у камеру стерилізації установки, проходить очищення на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 10,0 мкм і на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 0,2 мкм. Тиск пари на лінії від 0,15 до 0,20 МПа.

Очищена вода, яка подається в камеру миття, проходить очищення на фільтрі з номінальною тонкістю фільтрації 5,0 мкм. Тиск очищеної води на лінії від 0,20 до 0,25 МПа.

Процес підготовки поршнів проходить у п'ять етапів:

I етап – миття;

II етап – ополіскування;

III етап – силіконування;

IV етап – стерилізація і сушіння.

ДР 4.1. Миття поршнів

У камеру миття вручну порціями завантажують поршні. Для миття використовують миючий засіб «Біомой».

Процес I етапу миття ведеться при температурі очищеної води від 44 °С до 46 °С протягом 16 хв в автоматичному режимі. Контроль температури – за допомогою реєструючого приладку. Відцентровий насос перекачує пробки з водою з ємкості миття в ту ж ємкість (для видалення гумового пилу та інших механічних домішок). По закінченні цього етапу автоматично відкривається клапан зливу води (вентиль подачі перекривається), промивні води передають у збірник-нейтралізатор цеху ХО. При показнику рН у межах 6,5 –

9,0 і температурі не вище 40 °С промивні води направляють у каналізацію. Промивні води зливають протягом 10 хв.

ДР 4.2. Ополіскування поршнів

Ополіскування поршнів очищеною водою ведуть протягом 32 хв з переливом через зливальний карман. Температура очищеної води від 44 °С до 46 °С, контроль температури – за допомогою приладу реєструючого. Доливання і переливання очищеної води не припиняється протягом всього етапу. Промивні води передають у збірник-нейтралізатор цеху ХО. Воду з рН 6,5-9,0 і температурою не вище 40 °С протягом 15 хв зливають в каналізацію.

ДР 4.3. Силіконування поршнів

Процес силіконування проводять у камері миття. Апарат наповнюють водою для ін'єкцій до верхнього рівня. Для приготування розчину силіконової емульсії використовують мірний посуд 2 класу. Беруть 60-90 мл силіконової емульсії КЭ-10-16 і розчиняють у 700 мл води для ін'єкцій. Температура процесу силіконування від 80 °С до 95 °С. Контроль температури – за допомогою приладу реєструючого.

Загальна тривалість процесу ополіскування, починаючи, з досягнення заданої температури – 24 хв.

По закінченню процесу ополіскування пробки разом з частиною розчину перекачують в апарат стерилізації. Розчин силіконової емульсії під тиском повітря 0,2 МПа зливають у збірник-нейтралізатор цеху ХО.

ДР 4.4. Стерилізація і сушіння поршнів

У посудину подають пару для нагрівання поршнів до температури від 120 °С до 124 °С при тиску від 0,11 до 0,13 МПа. Контроль тиску – за допомогою мановакууметра. Тривалість процесу стерилізації складає 48 хв. Після стерилізації починається процес сушіння.

Сушіння здійснюється стерильним стиснутим повітрям і вакуумом. Стерильне стиснене повітря надходить в апарат стерилізації підігрітим за допомогою ТЕНів до 70 °С. Посудина періодично обертається на 180°, у

результаті чого стікає вода, що утримується в порожнинах поршнів. Здійснюється контроль температури процесу сушіння та контроль тиску – за допомогою мановакууметра. Тривалість процесу сушіння складає 80 хв.

По закінченні сушіння подача повітря в апарат припиняється. Упевнившись у відсутності залишкового тиску в апараті стерилізації, відкривають люк вивантаження і перевантажують пробки в рухомі ємкості для стерильних поршнів, що входять у комплект установки (ГФ-27). Ємкості попередньо обробляють розчином перекису водню (3,0%) і розчином спирту етилового (76%).

Ємкості з партією стерильних поршнів маркують етикетками встановленого зразка із значенням назви матеріалу, номеру партії, кількості, дати та часу стерилізації, прізвища і підпису відповідального.

ДР 5. Підготовка ковпачків

При надходженні на підприємство гумові пробки проходять вхідний контроль у ВКЯ і зберігаються на складі сировини та матеріалів в умовах, закладених у АНД.

Після розтарення проводять перегляд і сортування ковпачків, відбраковуючи ковпачки з порушеною формою, забруднені, темні чи в плямах, такі, що мають вм'ятини, зрізи та інші дефекти (ГФ-76). Брак збирають в контейнери, маркують етикетками і відправляють на утилізацію.

ДР 5.1. Миття і ополіскування ковпачків

Здійснюють на установці для миття ковпачків (ГФ-31).

Очищена вода для миття ковпачків, нагріта в теплообміннику до 60 °С. Далі очищена вода проходить крізь фільтр з номінальною тонкістю фільтрації 5,0 мкм. Тиск очищеної води на лінії від 0,20 до 0,25 МПа.

Використовують миючий розчин «Біомой». Температура миття від 35 до 60 °С. Миття продовжується 22 хв і задається програмою. Через 22 хв включається клапан доливання очищеної води. Злив води відбувається через

зливальну трубу до датчика нижнього рівня в збірник-нейтралізатор цеху ХО.

Ополіскування проводять водою очищеною з температурою від 35 до 60°C протягом 45 хв.

При митті та ополіскуванні ковпачків барабан обертається з реверсуванням через 1(4) хв. Тривалість процесів миття та ополіскування задається програмою.

Ковпачки вивантажують у нержавсталеві деки шаром 30-40 мм, деки закривають кришками.

ДР 5.2. Стерилізація ковпачків

Проводяться в апараті для повітряної термообробки (ГФ-32) при температурі від 178 до 182 °С протягом 60 хв. Здійснюється контроль температури – за допомогою реєструючого приладу. Після стерилізації деки з ковпачками вивантажують у приміщення для охолодження класу чистоти В. Термін зберігання стерильних ковпачків – не більше 24 год.

Ємкості із стерильними алюмінієвими ковпачками маркують етикетками встановленого зразка із значенням назви матеріалу, номеру партії, кількості, дати та часу стерилізації, прізвища і підпису відповідального.

Тривалість операції підготовки ковпачків – від 7,5 до 8,0 год.

ТП 6. Відділення біомаси

ТП 6.1. Відділення біомаси центрифугуванням

Зі збірника тимчасового зберігання (Р-19) культуральна рідина, за допомогою насосу (Н-20) надходить у центрифугу (Ц-21). Відцентрове центрифугування являє собою процес розділення суспензій в центрифугах з дірчастими барабанами. Внутрішня поверхня такого барабана покрита фільтрувальною тканиною. Суспензія відцентровою силою відкидається до стінок барабана, при цьому тверда фаза (біомаса) залишається на поверхні тканини, а рідина під дією відцентрової сили проходить крізь шар осаду і

тканина видалається назовні через отвори в барабані. Коли барабан заповнюється обложеними клітинами, центрифугу зупиняють і клітини збирають.

Біомаса, відділена від культуральної рідини надходить одразу на наступну стадію - руйнування бактеріальної клітини. Культуральна рідина також вручну переноситься на пересувну ємність.

ТП 7. Руйнування бактеріальної клітини

ТП 7.1. Руйнування бактеріальної клітини методом ультразвукової дезінтеграції

Відділена від культуральної рідини біомаса, з центрифуги (Ц-21) за допомогою насосу (Н-23) надходить в ультразвуковий дезінтегратор (УЗД-24), де за допомогою хвиль ультразвуку відбувається руйнування бактеріальної клітини. Дезінтегратор генерує черговість хвиль високого і низького тиску в рідині. Під час циклу низького тиску ультразвукові хвилі створюють невеликі вакуумні бульбашки в рідині, які руйнуються під час циклу високого тиску. Це явище називається кавітація. Викликають імплзю кавітаційного міхура сильні гідродинамічні сили зсуву. Вони ж розбивають стінки клітинної структури та фермент вивільняється назовні.

Вивільнений білок разом з уламками клітини переносять вручну на наступну стадію ультрафільтрацію.

ТП 8. Відокремлення залишків

ТП 8.1. Відокремлення залишків ультрафільтрацією

Після ультразвукової дезінтеграції (УЗД-24) супернатант за допомогою відцентрового насосу потрапляє в ультрафільтраційну установку (УУ-25). Супернатант проходить через пори діаметром 20 нм, на яких затримується всі високомолекулярні компоненти, при цьому тиск ультрафільтраційній установці має бути 0,1 МПа. Після ультрафільтраційної

установки утворюється 2000 літрів пермеату, який переходить на стадію хроматографії.

ТП 9. Очищення білка

ТП 9.1. Очищення білка за допомогою методу іонообмінної хроматографії

Після стадії ультрафільтрації (УУ-25) еритропоетин за допомогою насосу (Н-26) потрапляє на стадію іонообмінної хроматографії (ІХ-27). Білкові екстракти та зразки білка з різних стадій очищення до PAGE готували в буфері зразків Laemmli, що містить 2 мМ EDTA, 125 мМ трис-НСІ (рН 6,8), 20% гліцерину, 4% SDS та 0,015% бромового фенолу синього з додаванням 0,2 М редуктору дентітрейтолу (ДТТ) або без нього. Проби розбавляли буфером для зразків у співвідношенні 1: 1, нагрівали протягом 5 хв при 95 ° С і центрифугували протягом 5 хв при 16000 об/хв; супернатант завантажували на поліакриламідний гель. Електрофорез білка в гелі проводили за допомогою інструменту SE 260 Amersham Mighty Small II для вертикального електрофорезу для гелів 8 × 9 см та набору реагентів від GE Healthcare (США). Після електрофорезу гель фарбували Coomassie Brilliant Blue R-250 за стандартною процедурою. Для оцінки видимої молекулярної маси використовували білкові маркери з молекулярною масою 14-97 кДа (Bio-Rad). Гелі зображали за допомогою системи Gel Doc™ XR + (Bio-Rad), а щільність гелевих смуг оцінювали за допомогою програмного забезпечення Quantity One (Bio-Rad).

Після руйнування 1 г вологої біомаси осад, що містив промиті тіла включення (250 мг), розчиняли в 10 мл 6 М гідрохлориду гуанідину, 0,1 М ДТТ та 20 мМ Трис-НСІ (рН 8,0), інкубували при 4 ° С протягом ночі і центрифугували протягом 30 хв при 9000 об/хв . Потім денатурований білок розбавляли повторно буфером, що містить 0,5 М L-аргініну, 20 мМ Трис-НСІ (рН 8,5) у співвідношенні 1: 15 до кінцевої концентрації білка ~ 0,1 мг / мл та інкубували протягом 24 год при 4 ° С . Розчин повторно обробленого

білка діалізували проти 10 об'ємів буфера, що містить 4 М сечовини, 20 мМ Трис-НСІ (рН 6,8) протягом 24 год і центрифугували протягом 30 хв при 9000 об/хв. Супернатант піддавали колонній хроматографії на сорбенті WorkBeads 40 S. Пройшовши етап очищення в іоннообмінній хроматографії, еритропоетин вручну переносили на стадію гідролізу.

ТП 10. Гідроліз білка

ТП 10.1. Протеолітичний гідроліз білка

Обробку білка 6His-s-tag-EPO ентерокіназою проводили в буфері (P-27), що містить 10 мМ Трис-НСІ (рН 7,5-8,0) та 200 мМ NaCl. Аліквоту (10 мкл) розчину ентерокінази зі специфічною активністю 0,1 од / мкл додавали до 9 мл розчину білка з концентрацією 0,1 мг / мл та інкубували протягом 3 год при кімнатній температурі (25 ° С). Ефективність гідролізу оцінювали за допомогою PAGE.

Після гідролізу (P-27) 6His-s-tag-EPO з ентерокіназою розщеплений rhEPO очищали за допомогою афінної хроматографії (АХ-30) на сорбенті WorkBeads 40 Ni. Колонку з 3 мл сорбенту врівноважували 20 мМ розчином Tris-НСІ (рН 8,0), зв'язування білка та промивання колонки п'ятьма об'ємними колонками проводили в тому ж буфері, і всі операції проводилися зі швидкістю потоку 1 мл /хв.

Цільовий білок, очищений від продуктів гідролізу, елюювали в перших промивних фракціях. Поглинання розчину білка при 280 нм становило 0,08, що приблизно відповідало концентрації білка 0,066 мг / мл з урахуванням теоретичного коефіцієнта вимірювання (1,206 для EPO). Отже, враховуючи об'єм комбінованої фракції (8 мл), загальна кількість очищеного білка становила 0,53 мг. Препарат білка був гомогенним у SDS-PAGE.

Об'єднані фракції після хроматографії на WorkBeads 40 Ni діалізували проти 25 мМ ацетатного буфера амонію (рН 4,5) протягом 24 год при 4 °

С. Співвідношення діалізованого зразка і буфера для діалізу становило 1: 10. Отриманий білковий препарат піддавали процесу фасування.

ТП 11. Фасування рекомбінантного еритропоєтину у шприци

Утворений розчин подається на апарат розливу, який знаходиться в класі частоти А. Фасування виконують за допомогою апарату Macofar IF200 (ГФ-35). У шприци об'ємом 5 мл наливають 2 мл розчину і після чого заповнені шприци закупорюють поршнем.

ТП 12. Закупорювання шприців

Наступною стадією є закупорювання. Шприци передаються на апарат для закупорювання SVC 1206-N2. В шприц вставляється поршень та одягається кришка, а також наноситься маркування. Після чого шприци переходять на стадію пакування.

ТП 13. Пакування маркування та відвантаження

Шприци поступають на фасувально-пакувальний апарат (ФПА-37), яка запаковує кожен флакон в окрему первину тару. Крім шприців також кладеться інструкція для застосування (лист-вкладиш). Після чого запакована партія відправляється в карантинну зону, де чекає рішення з її реалізації. Під час пакування в первину тару контролюється цілісність шприців, якість нанесення етикетки, правильність і чіткість маркування, а також комплектність упаковки.

Далі утворена партія відправляється на конвеєр , де запаковують первину тару у вторинну і відправляють на склад для реалізації.

ЗВ 14. Знешкодження відходів

ЗВ 14.1. Знешкодження газоподібних відходів

Відпрацьовані гази (від ДР 1.5, ДР 1.6) подають на знешкодження методом каталітичного спалювання.

ЗВ 14.2. Знешкодження рідких відходів

Знешкодження рідких відходів (від ДР 1.3, ДР 3.1, ДР 3.2, ДР 4.1, ДР 4.2, ДР 4.3, ДР 5.1, ТП 6.1) відбувається шляхом пропускання останніх через фільтри комплексної очистки на локальних очисних спорудах. Відфільтрована вода спускатися в каналізацію.

ЗВ 14.3. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи (від ПМВ 14, ДР 2.2), що можуть містити біологічно небезпечні залишки збирають в окремий резервуар та піддається термічній обробці, для того, щоб інактивувати живі клітини продуцента. Після цього відходи відправляються на локальні очисні споруди.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

В процесі одержання посівного матеріалу та виробничого культивування здійснюють технологічний, хімічний та мікробіологічний контроль.

Протягом усього процесу культивування періодично (кожні 4 – 6 год) відбирають проби культуральної рідини для мікробіологічного контролю (мікроскопіювання зразків та висів на щільні поживні середовища), визначення концентрації біомаси і цільового продукту, а також вмісту джерел вуглецю (триптону)[37].

7.1 Мікробіологічний контроль може здійснюватись шляхом розсіву на чашки Петрі з агаризованими середовищами або мікроскопіюванням. Більш доцільним є використання методу мікроскопіювання, адже процес розсіву на чашки Петрі є довготривалим. Для мікроскопіювання використовують препарат «роздавлена крапля».

Для приготування препарату за методом «роздавленої краплі» на поверхню чистого сухого предметного скла наносять краплю стерильної води. Скляною паличкою або бактеріологічною петлею в краплю вносять невелику кількість досліджуваної культури і обережно розподіляють її в рідині для отримання однорідної суспензії. Приготовану краплю накривають покривним склом, уникаючи утворення бульбашок повітря. Якщо частина рідини виступає за край покривного скла, надлишок середовища можна промокнути вузькою смужкою фільтрувального паперу. Мікроскопіюють системою зі збільшенням 40X (рис. 7.1). Спостерігають колонії. В препараті не допускається наявності жодних інших мікроорганізмів [38].

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Приймак Д.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		Пенчук Ю.М.					143	18
<i>Реценз.</i>						Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Пирог Т.П.						

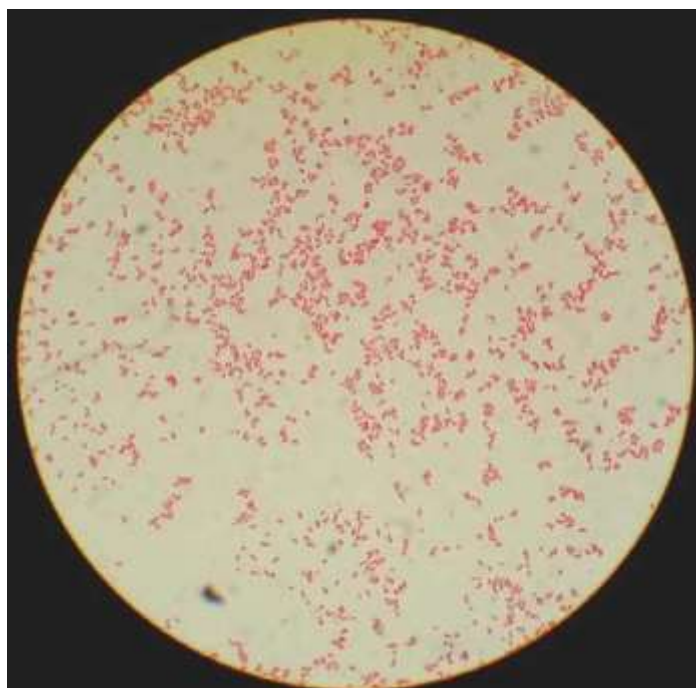


Рис. 7.1 *E.coli* BL 21 [39]

Крім цього, чистоту культур мікроорганізмів обов'язково перевіряють висівом на поживні середовища. Культуральну рідину *E.coli* BL 21 розсівають петлею на чашки Петрі з м'ясо – пептоним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з суслоагаром (СА) або глюкозо-картопляним агаром (ГКА) – для виявлення дріжджів і грибів. Критерієм чистоти є відсутність колоній інших мікроорганізмів. Посіви інкубують декілька діб при температурі 30 – 35 °С [38].

Оцінка біологічної активності білка *in vitro*

Біологічну активність препаратів еритропоетину оцінюють за допомогою тесту на проліферацію *in vitro* з клітинної лінії еритролейкемії людини TF-1 (ATCC CRL-2003).

Техніка визначення: відбирають 10 мл культуральної рідини, біомасу відцентрифугують. Відокремлені від культуральної рідини клітини культивують при 37 ° С в атмосфері 5% CO₂ у середовищі RPMI 1640 доповненому 10% фетальної сироваткою великої рогатої худоби, гентаміцином до концентрації 10 мкг / мл та гранулоцитарним макрофаговим фактором, що стимулює колонію (GM-CSF) при кінцевій концентрації 2 нг / мл . До тесту на

визначення специфічної активності клітини піддають так звану "стадію голодування": інкубацію протягом 22-26 год у середовищі з мінімальним вмістом сироватки (0,5%) без додавання GM-CSF та інших факторів росту при 37 ° C і 5% CO₂. Після голодування поетапні клітини гранулюють з культурального середовища центрифугуванням при 800 об / хв, відкидаючи супернатант і ресуспендуючи клітини в холодному середовищі RPMI 1640. Процедуру повторюють три рази. Після третього центрифугування клітини ресуспендують в обсязі досліджуваної середовища (RPMI 1640, доповнений 5% сироваткою великої рогатої худоби та 10 мкг / мл гентаміцину, без GM-CSF) для регулювання концентрації клітин до 600-800 тис. клітин на мл . Зразки білка (варіанти EPO) стерилізують на фільтрі через 0,2-мкм фільтрувальну установку та розводять у досліджуваному середовищі. Зразки з різними розведеннями в досліджуваному середовищі готують в 96-лункових планшетах (об'єм в кожній лунці 50 мкл, дворазове розведення від 1000 до 4 нг / мл і від 10 до 0,04 нг / мл). Засіб без EPO використовують як негативний контроль, і рекомбінантний EPO з клітин ссавців - Epostim – використовують в якості еталонного зразка. Аліквоти (50 мкл, 30-40 тис. клітин) підготовлених клітин вводять в лунки, що містять проби. Планшети інкубують 68-72 год при 37 ° C у 5% CO₂ . По завершенні інкубації в кожен лунку додають 10 мкл суміші субстрату WST-1. Потім планшет інкубують при 37 ° C у 5% CO₂ протягом 5-6 годин з візуальним контролем розвитку кольору. Оптичну густину в лунках фіксують на довжині хвилі 450 нм за допомогою зчитувача пластин Tecan Infinite M 200 Pro. Питому активність обчислюють за допомогою регресійної моделі за допомогою програми PLA 3.0 [24].

Визначення концентрації джерела вуглецю

В середовищі для культивування *E.coli* BL 21 (DE3) джерелом вуглецю виступає триптон. Визначити концентрацію триптону ми можемо за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Техніка визначення: для приготування досліджувального зразка відбирають 10 мл культуральної рідини, фільтрують через фільтр (діаметр пор 0,45 мкм). У відфільтрованому зразку визначають концентрацію триптону за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі – Shimadzu Prominence LC-20AT Токуо, Япон. В даному хроматографі наявні колонка НРХ-87Н (Bio-Rad Philadelphia, PA, USA) та детектор показника заломлення (Shimadzu RID-10A Токуо, Япон). В якості рухомої фази використовують 0,005 н сірчану кислоту, швидкість потоку якої становить 0,6 мл/хв. Температура колонки становить 600°C. Зразок для дослідження у хроматограф вноситься в об'ємі 20 мкл, а як зразки порівняння використовують триптон аналітичної чистоти різних концентрацій. Концентрація триптону визначається як відношення площ піків досліджувального зразка до стандартних розчинів різної концентрації [40].

Таблиця 7.1

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1. Підготовка аераційного повітря				
Кт 1.2. Очищення повітря у фільтрі грубої очистки	Повітря на виході з фільтра грубої очистки, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3. Компресування повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,4 МПа, t = 120-250 °C
Кт 1.4. Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	E = 99,92 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.5. Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,999 %, тиск згідно паспорту

ДР 2. Підготовка та стерилізація поживного середовища				
ДР 2.1. Підготовка та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці				
Кт, Км 2.1.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20\text{ хв}$, $P = 0,05\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,15\text{ МПа}$ відсутність мікробіоти
ДР 2.2. Приготування та стерилізація поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л				
Кт, Км 2.2.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 20\text{ хв}$, $P = 0,05\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти

Кт, Км 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти
ДР 2.3. Приготування та стерилізація поживного середовища для ферментеру об'ємом 60 л				
Кт, Км 2.3.1. Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 112 °С, τ = 20 хв, Р = 0,05 МПа, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск, стерильність	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	t = 131 °С, τ = 40 хв, Р = 0,15 МПа відсутність мікробіоти

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

Кт, Км 3.1. Підтримка колекційної культури <i>E.coli</i> BL 21	Колекційна культура <i>E.coli</i> BL 21 , температура	Термометр технічний, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час зберігання	t = 4 °С
Кт, Км 3.2. Одержання та вирощування робочої на агаризованих середовищах	Робоча <i>E.coli</i> BL 21 , тривалість одержання, температура, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається під час одержання, мікробіологічний контроль після культивування	t = 37 °С, τ = 9 год, відсутність сторонньої мікробіоти

Кт, Км 3.3 Вирощування інокуляту в колбах на качалках	Посівний матеріал, тривалість вирощування, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота культури, концентрація біомаси	Термометр технічний, годинник, тахометр, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Після вирощування культури в колбах на качалках	t = 37 °С, τ = 9 год, n = 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 3.4. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 10 л	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість культивування, рН, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури	Термометр технічний, датчик рН, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в кінці процесу	t = 37 °С, τ = 9 год, n = 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти
Кт, Км, Кх 3.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі	Посівний матеріал, швидкість перемішування, тривалість	Термометр технічний, датчик рН, годинник, фотоелектроколориметр, мікробіологічний контроль	Під час вирощування посівного матеріалу в інокуляторі і в	t = 37 °С, τ = 9 год, n = 180 об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

об'ємом 60 л	культивування, рН, температура, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури		кінці процесу	
		ТП 4. Виробничий біосинтез		
Кт, Км, Кх 4.1. Виробниче культивування в ферментері об'ємом 630 л	Культуральна рідина, тривалість культивування, рН, температура, швидкість перемішування, мікробіологічна чистота, біологічна активність білка	Годинник, рН-метр термометр технічний, тахометр, годинник, мікробіологічний контроль, флуорориметр	рН визначається перед культивуванням та під час культивування, температура визначається безперервно під час культивування, мікробіологічний контроль та визначення біологічної активності білка здійснюється під час культивування через кожні 8 годин	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 18$ год, $n = 180$ об/хв, відсутність сторонньої мікробіоти

Визначення вмісту білка

Випробування проводять методом спектрофотометрії (ДФУ, 2.2.25).

Випробовуваний розчин. Субстанція еритропоєтину.

Буферний розчин. Розчин 4 г/л амонію гідрокарбонату Р у воді Р.

До 1 мл субстанції додають 4 мл буферного розчину.

Вимірюють оптичну густина випробовуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвиль 280 нм та 320 нм у кювету з товщиною оптичного шляху 10 мм, використовуючи як компенсуючий буферний розчин.

Концентрацію білка (C_6) в мг/мл обчислюють за формулою:

$$C_6 = 1,33 \times (D_{280} - D_{320}) \times 5, \text{ де:}$$

D_{280} і D_{320} - оптична густина розчину за довжини хвиль 280 нм і 320 нм, відповідно;

5 - розведення препарату;

1,33 - коефіцієнт екстинкції еритропоєтину за довжини хвилі 280 нм.

Концентрація білка в препараті повинна складати не менше 0,5 мг/мл [46].

Кількісне визначення білка

Питома активність не менше 100 000 МО/мг білка.

А. Питома активність *in vivo*.

Визначення біологічної активності *in vivo* базується на визначенні рівня стимуляції утворення ретикулоцитів кровотворною системою нормоцитемічних мишей у порівнянні з С3 Erythropoietin BRP (EP CRS) (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000) або РС3 ВАТ “Київмедпрепарат”.

Випробовуваний розчин (а). Розчин субстанції розводять фосфатно-альбуміновим забуференим фізіологічним розчином рН 7.2 Р1 у 1250 разів. В дві з трьох пронумерованих поліпропіленових мікропробірки об'ємом 1,5 мл вносять по 900 мкл, в третю – 800 мкл фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1. В першу мікропробірку (№1) додають 100 мкл розчину субстанції, ресуспендують та переносять 100 мкл розчину в мікропробірку (№2). Аналогічну процедуру повторюють, переносячи 200 мкл

розчину з мікропробірки №2 в №3. Вміст останньої мікропробірки додають до 24 мл фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1 [46].

Випробовуваний розчин (б). До 9 мл випробуваного розчину (а) додають рівний об'єм фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1.

Випробовуваний розчин (в). До 9 мл випробовуваного розчину (б) додають рівний об'єм фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1.

Розчин порівняння (а). С3 Erythropoietin BRP (EP CRS) (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000) розчиняють фосфатно-альбуміновим забуференим фізіологічним розчином рН 7.2 Р1 в 441 раз до кінцевої активності 80 МО/мл. Вміст флакону С3 Erythropoietin BRP (EP CRS) розчиняють в 1 мл води Р. В мікропробірку вносять 900 мкл фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1 додають 100 мкл розчину стандартного зразку, ретельно перемішують. До 0,57 мл одержаного розчину вносять 24,4 мл фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1 та ретельно перемішують [46].

Розчин порівняння (б). До 9 мл розчину порівняння (а) додають рівний об'єм фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1.

Розчин порівняння (в). До 9 мл розчину порівняння (б) додають рівний об'єм фосфатно-альбумінового забуференого фізіологічного розчину рН 7.2 Р1.

Розчин антикоагулянту. 1 мл розчину 0,5 М динатрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти Р доводять водою Р до об'ємом 100 мл.

Розчин зберігають протягом 6 міс в герметичному скляному посуді [46].

Для визначення використовують білих мишей віком біля 8 тижнів та масою (20 ± 1) г, які утримувались за стандартних умов віварія протягом щонайменше 10 днів. Тварин розділяють на шість груп, кожна з яких повинна складатися з щонайменше з 8 піддослідних. Групи нумерують. Семи тваринам кожної групи проводять внутрішньочеревно ін'єкцію по 0,5 мл випробуваного розчину або

розчину порівняння в наступному порядку: група №1 – випробовуваним розчином (а), №2 – випробовуваним розчином (б), №3 – випробовуваним розчином (в), №4 – розчином порівняння (а), №5 – розчином порівняння (б), №6 – розчином порівняння (в). Одна з восьми тварин не отримує ін'єкцію жодним розчином. Після обробки тварин повторно розділяють по групам так, що б в кожній групі містилось по шість тварин, які отримали ін'єкцію однаковими розчинами, по одній тварині – одним з п'яти інших розчинів та по одній необробленій тварині (контрольний тест). Продовжують утримання в стандартних умовах віварію протягом чотирьох діб та роблять забір крові з хвостової вени. Для цього хвіст тварини занурюють у воду Р та роблять надріз, з якого за допомогою скляної або одноразової пластикової піпетки відбирають кров і вносять для її стабілізації до рівного об'єму розчину антикоагулянту. До 100 мкл стабілізованої крові вносять 300 мкл розчину бриліантового креазолового (Fluka, кат. № 16035 або аналогічної якості), ретельно перемішують та інкубують при кімнатній температурі протягом 40 хв. По завершенню інкубації готують мазки для мікроскопії. Для цього суміш крові та розчину бриліантового креазолового повторно перемішують, 20 мкл наносять на підготовлену поверхню предметного скельця, яку відразу ж розмазують предметним скельцем та висушують на повітрі. Визначають співвідношення ретикулоцитів до еритроцитів, використовуючи для цього мікроскоп та відеосистеми на базі фотокамери. Для підрахунку кількості клітин роблять захват видимого в об'єктиві зображення. Підраховують кількість ретикулоцитів (клітини синього кольору з крапками-включеннями) на 1 тис. еритроцитів (клітини блакитного кольору). Визначають коефіцієнт підвищення кількості ретикулоцитів (КПКР) для кожного з випробовуваних розчинів та розчинів порівняння за співвідношенням кількостей ретикулоцитів (на 1 тис. еритроцитів) для кожної з піддослідних тварин по відношенню кількостей кількості у контрольних тварин (тварини, що не отримали ін'єкцію жодним з розчином). Розраховують залежність КПКР від логарифма активності

еритропоетину у розчині порівняння (а), (б) та (в). За розрахованим КПКР для випробовуваного розчину (а), (б) та (в) визначають істинне значення активності для кожного з них. Отримані значення активності множать на відповідний коефіцієнт розведення препарату. Для випробовуваного розчину (а) коефіцієнт розведення становить 1250, для випробовуваного розчину (б) – 2500, для випробовуваного розчину (в) – 5000. Знаходять середнє арифметичне отриманих значень активності. Питому активність визначають за формулою:

$$A_{\text{п}} = \frac{A}{C}, \text{ де}$$

$A_{\text{п}}$ – питома активність субстанції;

A – активність субстанції в 1 мл;

C – концентрація білка (мг/мл).

Питома активність субстанції повинна бути не менше 100 000 МО/мг білка [46].

В. Питома активність методом ІФА.

Вміст рекомбінантного еритропоетину людини в субстанції визначений методом ІФА повинен становити не менше 100 000 МО/мг білка.

Випробовуваний розчин. Розчин субстанції з активністю що відповідає вимогам чутливості набору ProConEPO2. Готують не менше трьох розведень. Розчинник буфер для розведення зразків із набору.

Розчин порівняння. Розчин С3 Erythropoietin BRP (EP CRS) (Erythropoietin BRP, batch 3, кат. № E1515000) або РСЗ з активністю що відповідає активності випробовуваного розчину. Готують не менше трьох. Розчинник буфер для розведення зразків із набору.

Визначають активність випробовуваних розчину та розчинів порівняння відносно внутрішнього стандарту набору ProConEPO2 (ТОВ “Протеїновий контур”, Росія, кат. № K041 або аналогічної якості), згідно інструкції фірми виробника. За 100 % приймають значення розчинів порівняння. Активність розведень субстанції відносно стандартного зразка повинна знаходитись в

межах від 85 до 125 %. Довірчий інтервал (R) визначають за рівнянням, що описує залежність десятичного логарифма активності від оптичної густини зразка в імуноферментній реакції. Враховуючи коефіцієнт розведення кожного з розчинів, розраховують активність стандартного зразка та субстанції (МО/мл) [46].

Питому активність визначають за формулою:

$$A_{п} = \frac{A}{C}, \text{ де}$$

$A_{п}$ – питома активність субстанції;

A – активність субстанції в 1 мл;

C – концентрація білка (мг/мл) [46].

Контроль води для ін'єкцій

Вода для ін'єкцій стерильна має витримувати вимоги випробувань «Сульфати», «Хлориди», «Кальцій і магній», «Амонію солі», розділу «Випробування на чистоту» для води очищеної в контейнерах, описані у статті «Вода очищена», а також випробування, наведені нижче [47].

Кислотність або лужність

До 20 мл субстанції додають 0,05 мл розчину фенолового червоного Р, якщо розчин забарвлюється в жовтий колір, забарвлення розчину має перейти в червоне при додаванні не більше 0,1 мл 0,01 М розчину натрію гідроксиду. Якщо розчин спочатку забарвлюється в червоний колір, забарвлення розчину має перейти в жовте при додаванні не більше 0,15 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої.

Питома електропровідність (ДФУ 2.2.38).

Не більше 25 мкСм-см для контейнерів із номінальним об'ємом 10 мл або менше, або не більше 5 мкСм-см для контейнерів із номінальним об'ємом більше 10 мл.

Речовини що окиснюються.

До 100 мл субстанції додають 10 мл кислоти сірчаної розведеної Р, доводять до кипіння, додають 0,2 мл 0,02 М розчину калію перманганату і кип'ятять протягом 5 хв, розчин після цього має залишатися слабо-рожевим.

Хлориди (ДФУ 2.4.4.).

Не більше 0.00005 % (0.5 ррт) для субстанції в контейнерах із номінальним об'ємом 100 мл або менше. 15 мл субстанції мають витримувати випробування на хлориди. Еталон готують із використанням суміші 1,5 мл еталонного розчину хлориду Р і 13 мл води Р. Опалесценцію одержаних розчинів порівнюють за вертикальною віссю пробірок.

Сухий залишок

100 мл субстанції упарюють насухо на водяній бані і сушать при температурі 100 °С до 105 °С. Маса сухого залишку не має перевищувати 4 мг (0,004 %) для контейнерів із номінальним об'ємом 10 мл або менше і 3 мг (0,003%) для контейнерів із номінальним об'ємом більше 10 мл.

Механічні включення: невидимі часики (ДФУ 2.9.19)

Субстанція має витримувати випробування на механічні включення: невидимі частки.

Стерильність (ДФУ 2.6.1)

Субстанція має витримувати випробування на стерильність;

Бактеріальні ендотоксини (ДФУ 2.6.14)

Менше 0,025 МО/мл [47].

ТП 5. Відділення біомаси				
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Кт 5.1. Центрифуга	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед під час процесу	$\tau = 60$ хв, $n = 8000$ об/хв
ТП 6. Руйнування бактеріальної клітини				
Кт 6.1. Ультразвукова Дезінтеграція	Час	Годинник	Під час дезінтеграції	$\tau = 20-30$ хв
ТП 7. Ультрафільтрація				
Кт 7.1. Ультрафільтрація	Тиск, діаметр пор	Барометр	Тиск контролюється безпосередньо під час проходження процесу	$P=0,1$ МПа, $\varnothing = 20$ нм, $V_1=230$ літрів, $V_2=200$ літрів
ТП 8. Рідинна хроматографія				
Кт 8.1. Іонообмінна хроматографія	Тиск, швидкість потоку, час	Датчик контролю	Під час процесу	$\tau = 60$ хв і вище, $P=$ до 2 атм $V= 5-50$ мм/хв ⁻¹
ТП 9. Гідроліз				
Кт 9.1. Афінна хроматографія	Тиск, швидкість потоку, час	Датчик контролю	Під час процесу	$\tau =$ до 60 хв, $P=$ до 2 атм $V= 600$ мм/хв ⁻¹

1	2	3	4	5
ТП 11. Фасування еритропоетину у флакони				
Кт 11.1. Фасування еритропоетину у флакони	Кількість флаконів, об'єм,	Датчик контролю кількості флаконів. датчик витрати рідини	Кількість флаконів та витрата рідини контролюється під час проходження процесу	Кількісне
ТП 12. Закупорювання флаконів				
КТ 13.1. Закупорювання флаконів	Правильність проведеної операції	Датчик контролю правильності закупорювання, візуальний контроль	Контроль закупорювання флаконів відбувається автоматично за допомогою датчиків контролю на самому апараті, а також контролюється візуально	Кількісне
ПМВ 13. Пакування та маркування готового продукту				
Кт 14.1. Маркування та етикетування	Якість маркування, якість прикріплення етикетки, цілісність етикетки	Візуальний	Під час проведення операції	Якісне прикріплення етикетки. Цілісність етикетки. Правильність та чіткість номеру серії та терміну придатності.

ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Report of WHO/UNICEF/UNU consultation on indicators and strategies for iron deficiency and anemia programmes. In: WHO/UNICEF/UNU consultation. Geneva, Switzerland: WHO; 1994.
2. Lee GR, Foerster J, Lukens J. Wintrobe's clinical hematology. 10th ed. Baltimore, MD: Lippincott, Williams & Wilkins; 1999.
3. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, et al. Williams hematology. 6th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2000.
4. Brown RG. Anemia. In: Taylor RB, ed. Family medicine: principles and practice. 4th ed. New York, NY: Springer-Verlag; 1994:997-1005.
5. Thein M, Ershler WB, Artz AS, et al. Diminished quality of life and physical function in community-dwelling elderly with anemia. *Medicine (Baltimore)*. 2009;88:107-14.
6. Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Lyaschuk, A. M., Poponova, M. S., Galushkina, Z. M., Soboleva, L. A., Karyagina, A. S. Recombinant human erythropoietin with additional processable protein domains: Purification of protein synthesized in *Escherichia coli* heterologous expression system. *Biochemistry*. 2017; 82(11): 1285–1294. doi:10.1134/s0006297917110062
7. Clark SF. Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009; 25(1): 122 - 134.
8. National Institutes of Health (NIH). Dietary supplement fact sheet: iron. Bethesda (MD): Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/iron/>.
9. Schoener B, Borger J. Erythropoietin. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536997/> PubMed PMID: 30725682.
10. Павлов А. Д. Эритропоэз, эритропоэтин, железо. Молекулярные и клинические аспекты. *ГЭОТАР-Медиа*. 2015; 35(2): 304 - 310.
11. Arie H. Cerebral sinovenous thrombosis in a toddler with iron deficiency anemia. *Pediatric Emergency Care*. 2010; 26(3): 848 – 851.

- 12.S. Bosch, B. Sturm, W. Nachbauer. Ataxia and Erythropoietin .*The open drug discovery*. 2010; 2(1): 18 – 24.
- 13.Desai P., Shrivastava N., Padh H. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnol. Adv.* 2010; 28(5): 427–435.
- 14.Penney C., Thomas D., Deen S., Walmsley A. Plant-made vaccines in support of the Millenium Development Goals. *Plant Cell Reports*. 2011; 30(3): 789–798.
- 15.Jeong TH, Son YJ, Ryu HB, Koo BK, Jeong SM, Hoang P, Do BH, Song JA, Chong SH, Robinson RC, Choe H. Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from *E. coli*. *Protein Expr Purif.* 2014; 95(211):15-38. doi: 10.1016/j.pep.2014.01.001.
- 16.M. Alejandro Carballo-Amador, Edward A. McKenzie, Alan J. Dickson and Jim Warwicker. Surface patches on recombinant erythropoietin predict protein solubility: engineering proteins to minimise aggregation. *BMC Biotechnol.* 2019; 19: 39 - 26. doi: 10.1186/s12896-019-0520-z.
- 17.Karyagina AS, Grunina TM. Recombinant Human Erythropoietin Proteins Synthesized in Escherichia coli Cells: Effects of Additional Domains on the in vitro and in vivo Activities. *Biochemistry.* 2019; 84(1):20-32. doi: 10.1134/S0006297919010036.
- 18.Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Lyaschuk, A. M., Poponova, M. S., Galushkina, Z. M., Soboleva, L. A., Karyagina, A. S. Recombinant human erythropoietin with additional processable protein domains: Purification of protein synthesized in *Escherichia coli* heterologous expression system. *Biochemistry.*2017; 82(11): 1285–1294. doi:10.1134/s0006297917110062
- 19.Ser Huy Teh, Mun Yik Fong, and Zulqarnain Mohamed. Expression and analysis of the glycosylation properties of recombinant human erythropoietin expressed in *Pichia pastoris*. *Genet Mol Biol.* 2011; 34(3): 464 – 470. doi: 10.1590/S1415-47572011005000022.
- 20.Pınar Çalık. Production of recombinant human erythropoietin from *Pichia pastoris* and its structural analysis. *Microbiologe.* 2007; 103(6): 2084-2094.

- 21.Способ получения субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека и нанокапсулированная форма рекомбинантного эритропоэтина человека с использованием субстанции, полученной указанным способом// Патент России №2015163783А1. 2014 / Нечаева Е. А., Вараксин Н. А., Сереброва В. С.
- 22.Синтетическая ДНК, кодирующая эритропоэтин человека, содержащий её вектор, способ получения штамма-продуцента эритропоэтина, штамм-продуцент эритропоэтина// Патент России № 2548806С1. 2014 / Ищенко А. М.
- 23.Nikolas Varas, Frank Camacho, Oliberto Sánchez Ramos. Recombinant Human Erythropoietin. The problem of glycosylation. *Pharmacol Rev.* 2018; 24(3): 459-508. doi: 10.21931/RB/2018.03.03.10.
- 24.Способ получения рекомбинантного эритропоэтина человека и полученный эритропоэтин, фармацевтическая композиция // Патент России №2215748.2004/ Матаморос Фернандес Лобви
- 25.Jukić S, Bubenik D, Pavlović N, Tušek AJ, Srček VG. Adaptation of CHO cells in serum-free conditions for erythropoietin production: Application of EVOP technique for process optimization. *Biotechnol Appl Biochem.* 2016; 63(5): 633 - 641. doi: 10.1002/bab.1468.
- 26.Yin B, Wang Q, Chung CY, Ren X, Bhattacharya R, Yarema KJ, Betenbaugh MJ. Butyrate ManNAc analog improves protein expression in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng.* 2018 ;115(6):1531-1541. doi: 10.1002/bit.26560.
- 27.Wang Q, Chung CY, Yang W, Yang G, Chough S, Chen Y, Yin B, Bhattacharya R, Hu Y, Saeui CT, Yarema KJ, Betenbaugh MJ, Zhang H. Combining Butyrate ManNAc with Glycoengineered CHO Cells Improves EPO Glycan Quality and Production. *Biotechnol J.* 2019; 14(4):e1800186. doi: 10.1002/biot.201800186.
- 28.Mehri Mortazavi, Mohammad Ali Shokrgozar, Soroush Sardari, Kayhan Azadmanesh, Reza Mahdian, Hooman Kaghazian, Seyed Nezamedin Hosseini & Mohammad Hossein Hedayati (2019): Using chemical chaperones to increase recombinant human erythropoietin secretion in CHO cell line, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, doi: 10.1080/10826068.2018.1479865.

29. Pires AS, Rosa S, Castanheira S, Fevereiro P, Abranches R. Expression of a recombinant human erythropoietin in suspension cell cultures of *Arabidopsis*, tobacco and *Medicago*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2012; 110: 171–181. doi: 10.1007/s11240-012-0141-x.
30. Conley AJ, Jevnikar AM, Menassa R, Brandle JE. Temporal and spatial distribution of erythropoietin in transgenic tobacco plants. *Transgenic Res*. 2010; 19: 291–298. doi: 10.1007/s11248-009-9306-8.
31. Kittur FS, Bah M, Archer-Hartmann S, Hung CY, Azadi P, Ishihara M, Sane DC, Xie J. Cytoprotective effect of recombinant human erythropoietin produced in transgenic tobacco plants. *PLoS One*. 2013; 8(10):e76468.
32. Karyagina AS, Grunina TM, Lyaschuk AM, Voronina EV, Marigin RA, Cherepushkin SA, Trusova IN, Grishin AV, Poponova MS, Orlova PA, Manskikh VN, Strukova NV, Generalova MS, Nikitin KE, Soboleva LA, Boksha IS, Gromov AV. Recombinant Human Erythropoietin Proteins Synthesized in *Escherichia coli* Cells: Effects of Additional Domains on the in vitro and in vivo Activities. *Biochemistry*. 2019; 84(1): 20-32. doi: 10.1134/S0006297919010036.
33. Sun H., Jung Y., Shiozawa Y., Taichman R.S., Krebsbach P.H. Erythropoietin modulates the structure of bone morphogenetic protein 2-engineered cranial bone. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(19-20):2095-2105
34. J.H., Bendtsen M., Jensen J., Stiehler M., Foldager C.B., Hellfritsch M.B., Erythropoietin augments bone formation in a rabbit posterolateral spinal fusion model. *J. Orthop. Res*. 2012; 30(7):1083-1088.
35. Patel J.J., Modes J.E., Flanagan C.L., Krebsbach P.H., Edwards S.P, Hollister S.J. Dual delivery of EPO and BMP2 from a Novel Modular Poly-ε-Caprolactone Construct to Increase the Bone Formation in Prefabricated Bone Flaps. *Tissue Eng. Part C Methods*. 2015; 21(9): 889-897.
36. Ducheyne P., Healy K., Hutmacher D.E., Grainger D.W., Kirkpatrick C.J. Comprehensive Biomaterials. *Elsevier 1-st Ed*. 2011; 1: 269.

37. Martino M.M., Briquenza P.S., Rangaa A., Lutolfa M.P., and Hubbell J.A. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2013; 110: 4563-4568.
38. Wang YJ, Liu YD, Chen J, Hao SJ, Hu T, Ma GH, Su ZG. Efficient preparation and PEGylation of recombinant human non-glycosylated erythropoietin expressed as inclusion body in *E. coli*. *Int J Pharm.* 2010 ;386(1-2):156-64. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.11.016.
39. Daniell H., Chebolu S., Kumar S., Singleton M., Falconer R. Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine.* 2005;23:1779-1783. doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.004.
40. Kaldis A., Ahmad A., Reid A., McGarvey B., Brandle J., Ma Sh., Jevnikar A., Kohalmi S.E., Menassa R. Highlevel production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures. *Plant Biotechnol. J.* 2013; 11:535-545. doi:10.1111/pbi.12041.
41. Sytkowski AJ, Lunn ED, Risinger MA, Davis KL. An erythropoietin fusion protein comprised of identical repeating domains exhibits enhanced biological properties. *J Biol Chem.* 2013; 274: 24773–24778.
42. Sytkowski AJ, Lunn ED, Davis KL, Feldman L, Siekman S. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 95: 1184–1188.
43. Kochendoerfer GG, Chen SY, Mao F, et al. Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science.* 2013; 299: 884–887.
44. Jolling K, Ruixo JJ, Hemeryck A, Piotrovskij V, Greway T. Population pharmacokinetic analysis of pegylated human erythropoietin in rats. *J Pharm Sci.* 2014; 93: 3027–3038.
45. Macdougall IC. CERA (continuous erythropoietin receptor activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr Hematol Rep.* 2015; 4: 436–440.

46. Paoli P, Sbrana F, Tiribilli B, Caselli A, Pantera B, Cirri P, De Donatis A, Formigli L, Nosi D, Manao G. Protein N - homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid - like protofibrils. *J Mol Biol.* 2010; 400: 889– 907.
47. Wetzler DE, Castano EM & de Prat - Gay G. A quasi - spontaneous amyloid route in a DNA binding gene regulatory domain: the papillomavirus HPV16 E2 protein. *Protein Sci.* 2017; 16: 744– 754.
48. Chen YR & Glabe CG. Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid - beta peptide Abeta40 and Abeta42: stable trimer or tetramer formation by Abeta42. *J Biol Chem.* 2016; 34: 24414– 24422.
49. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB & Teplow DB. Amyloid beta - protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 100: 330– 335.
50. Kumar T, Sharma GS & Singh LR. Homocysteinuria: therapeutic approach. *Clin Chim Acta.* 2016; 458: 55– 62.
51. Huang C, Chien MS, Hu CM, Chen CW, Hsieh PC. Secreted expression of the classical swine fever virus glyco-protein E^{rns} in yeast and application to a sandwich blocking ELISA. *J Virol Meth.* 2016; 132: 40–47.
52. Jacob K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fitch EF, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature.* 2010; 313: 806–810.
53. Kang HA, Sohn JH, Choi ES, Chung BH, Yu MH, Rhee SK. Glycosylation of human α_1 -antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeasts. *Yeast.* 2011; 14: 371–381.
54. Kim YK, Shin HS, Tomiya N, Lee YC, Betenbaugh MJ, Cha HJ. Production and N-glycan analysis of secreted human erythropoietin glycoprotein in stably transfected *Drosophila* S2 cells. *Biotechnol Bioeng.* 2015; 92: 452–461.
55. Bill, R.M., Winter, P.C., McHale, C.M., Hoddges, Y.M., Elder, G.H., Caley, J., Flitsch, S.L., Bicknell, R. Expression and mutagenesis of recombinant human and

- murine erythropoietins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1261: 35–43.
56. Cereghino, G.P.L. and Cregg, J.M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotech*. 2010; 10: 422–427.
57. Cereghino, G.P.L. and Cregg, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 24: 45–66.
58. П.Г.Березин, В.В.Милованов, А.А.Иванников Роль эритропоэтинов в лечении анемии у онкологических больных // Наук. Журнал. 2017; Т.4, №2. С. 37 – 42.
59. Смирнова Л.А. Анемии: дифференциально-диагностические аспекты // Наук. Журнал. 2013; Т 3, №2. С. 15 – 19.
60. Beale AL, Penney MD, Allison MC. The prevalence of iron deficiency among patients presenting with colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2005 ;7(4): 398 – 402.
61. Yin B, Gao Y, Chung CY, Yang S, Blake E, Stuczynski MC, Tang J, Kildegaard HF, Andersen MR, Zhang H, Betenbaugh MJ. Glycoengineering of Chinese hamster ovary cells for enhanced erythropoietin N-glycan branching and sialylation. *Biotechnol Bioeng*. 2015; 112(11): 2343 – 51. doi: 10.1002/bit.25650.
62. Goh JS, Liu Y, Liu H, Chan KF, Wan C, Teo G, Zhou X, Xie F, Zhang P, Zhang Y, Song Z. Highly sialylated recombinant human erythropoietin production in large-scale perfusion bioreactor utilizing CHO-gmt4 (JW152) with restored GnT I function. *Biotechnol J*. 2014; 9(1):100 – 9. doi: 10.1002/biot.201300301
63. Grunina TM, Demidenko AV, Lyaschuk AM, Poponova MS, Galushkina ZM, Soboleva LA, Cherepushkin SA, Polyakov NB, Grumov DA, Solovyev AI, Zhukhovitsky VG, Boksha IS, Subbotina ME, Gromov AV, Lunin VG, Karyagina AS. Recombinant Human Erythropoietin with Additional Processable Protein Domains: Purification of Protein Synthesized in *Escherichia coli* Heterologous Expression System. *Biochemistry*. 2017; 82(11): 1285 – 1294. doi: 10.1134/S0006297917110062.

64. Домбровський Ю.А. , Іванова М. Д. Альфа-еритропоетинові препарати в лікуванні та профілактиці анемії у хворих на хронічну хворобу нирок // Журнал Нирки. 2014; 7 (1): 65-68.
65. Бетмен Ю.А., Головка О.К., Стрюковська Е.А., Єгорова У.А., Павлюченко В.В. Досвід застосування рекомбінантного еритропоетину "епобіокрин" для профілактики та лікування ранньої анемії // журнал Медичні та соціальні проблеми сім'ї. 2011; 16 (1): 38-43.
66. Мізгіна Т.І., Щербан О.А., Горячевська Т.М. Вікторіан рекомендованого рекомбінантного еритропоетину з методом оптимізації анемії та профілактичної допомоги дітям // журнал Неонатологічна медицина. 2014; 4 (3): 159-162.
67. Способ получения субстанции рекомбинантного эритропоэтина человека и нанокапсулированная форма рекомбинантного эритропоэтина человека с использованием субстанции, полученной указанным способом// Патент России №2015163783А1. 2014 / Нечаева Е. А., Вараксин Н. А., Сереброва В. С.
68. Синтетическая ДНК, кодирующая эритропоэтин человека, содержащий её вектор, способ получения штамма-продуцента эритропоэтина, штамм-продуцент эритропоэтина// Патент России № 2548806С1. 2014 / Ищенко А. М.
69. Карягіна А.С., Груніна Т.М., Попонова М.С. Синтез кишкової палички та характеристика рекомбінантного еритропоетину людини з додатковим гепариновим зв'язуючим доменом // журнал Біохімія. 2018; 83 (10): 1504-1522.
70. Способ очистки рекомбинантного эритропоэтина человека/// Патент России № 2145610 .2000 / Беляков Н.В., Коробицин Л.П. , Пивоваров А.М.
71. Jeong TH, Son YJ, Ryu HB, Koo BK, Jeong SM, Hoang P, Do BH, Song JA, Chong SH, Robinson RC, Choe H. Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from E. coli. Protein Expr Purif. 2014; 95: 211 - 8. doi: 10.1016/j.pep.2014.01.001.

72. Nikolas Varas, Frank Camacho, Oliberto Sánchez Ramos. Recombinant Human Erythropoietin. The problem of glycosylation. *Pharmacol Rev.* 2018; 24(3): 459-508. doi: 10.21931/RB/2018.03.03.10.
73. Способ получения рекомбинантного эритропоэтина человека и полученный эритропоэтин, фармацевтическая композиция // Патент России №2215748.2004/ Матаморос Фернандес Лобви
74. [M. Alejandro Carballo-Amador](#), [Edward A. McKenzie](#), [Alan J. Dickson](#) and [Jim Warwicker](#). Surface patches on recombinant erythropoietin predict protein solubility: engineering proteins to minimise aggregation. *BMC Biotechnol.* 2019; 19: 39 - 26. doi: 10.1186/s12896-019-0520-z.
75. Ankur Mittal, Vandana Singh, Sheemona Chowdhary and Amal Moideen. The Effect of Recombinant Human Erythropoietin on Bacterial Growth: A Dual-Edged Sword. *Kidney Dis.* 2019; 5(2): 81 - 90. doi: [10.1159/000493684](#)
76. Jukić S, Bubenik D, Pavlović N, Tušek AJ, Srček VG. [Adaptation of CHO cells in serum-free conditions for erythropoietin production: Application of EVOP technique for process optimization.](#) *Biotechnol Appl Biochem.* 2016; 63(5): 633 - 641. doi: 10.1002/bab.1468.
77. Ser Huy Teh, Mun Yik Fong, and Zulqarnain Mohamed. Expression and analysis of the glycosylation properties of recombinant human erythropoietin expressed in *Pichia pastoris*. *Genet Mol Biol.* 2011; 34(3): 464 –470. doi: 10.1590/S1415-47572011005000022.
78. Chandrasekhar Gurramkonda ,Aniruddha Rao ,Shayan Borhani ,Manohar Pilli. Improving the recombinant human erythropoietin glycosylation using microsome supplementation in CHO cell - free system. *Journal of biotechnology and bioengineering.* 2018; 115(5): 1253 - 1264. doi: 10.1002/bit.26554.
79. Mortazavi M, Shokrgozar MA, Sardari S, Azadmanesh K, Mahdian R, Kaghazian H, Hosseini SN, Hedayati MH. Using chemical chaperones to increase recombinant human erythropoietin secretion in CHO cell line. *Prep Biochem Biotechnol.* 2019; 49(6): 535 - 544. doi: 10.1080/10826068.2018.1479865.

80. Sota Kato, Nagahiro Ochiai, Hiroki Takano, Fusayo Io, Noriko Takayama, Hiroko Koretsune, Ei-ichi Kunioka, Saeko Uchida and Koji Yamamoto TP0463518, a novel prolyl hydroxylase inhibitor, specifically induces erythropoietin production in the liver. *Journal of Nephrology*. 2018; 48(3):157-164. doi: 10.1124/jpet.119.258731
81. Ghezlou M, Mokhtari F, Kalbasi A, Riazi G, Kaghazian H, Emadi R, Aref AR. Aggregate Forms of Recombinant Human Erythropoietin with different charge profile substantially impact biological activities. *J Pharm Sci*. 2019; 22(5): 49 - 19. doi: 10.1016/j.xphs.2019.05.036
82. Feng HL, Chen YH, Jeng SS. *Int J . Effect of Zinc Supplementation on Renal Anemia in 5/6-Nephrectomized Rats and a Comparison with Treatment with Recombinant Human Erythropoietin*. *Mol Sci*. 2019; 20(10): 35 - 5. doi: 10.3390/ijms20204985
83. Zhang C, Xie H, Yang Q, Yang Y, Li W, Tian H, Lu L, Wang F, Xu JY, Gao F, Wang J, Jin C, Xu G, Xu GT, Zhang J. Erythropoietin protects outer blood-retinal barrier in experimental diabetic retinopathy by up-regulating ZO-1 and occludin. *Clin Exp Ophthalmol*. 2019; 13(5): 15 - 4. doi: 10.1111/ceo.13619.
84. Компендиум 2005 – лекарственные препараты / Под. ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К.: Морион, 2005. – 1920с.
85. Бертрам Г. Катцунг. Базисная и клиническая фармакология: [В 2-х т.] / Пер. с англ. – М.: СПб.: Бином – Невский диалект, 1998. – 612с.
86. Державна фармакопея України. /1-ше видання. – Х., 2001. - 564 с.
87. Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. Науковий медичний журнал . – 2002. – Вип. 1. - № 1. – с. 24-25.
88. Технологія ліків промислового вир-тва/ Під. ред. Чуєшова В. І./ - Х: НФаУ,2003. – 720с.
89. Машковский М.Д. Лекарствинные средства: [В 2-х т.]. – 14-е изд. – М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2001. – 320с.
90. Глик Б. Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применения. – М.: «Мир», 2002. – 585с.

91. Каталог технологического оборудования химико-фармацевтической промышленности: Учебн. пособие для студентов/ Чуешов В.И., Сичкарь А.А., Стрельников Л.С. – Х.: Изд-во НФаУ, 2005. – 307с.
92. Иванкин А.Н. Биологически активные вещества из животной ткани и микроорганизмов. Методы получения и структурно-функциональные взаимосвязи: Автореф.дис. ... д-ра химических наук. – М., 1998.
93. С.Д. Варфоломеев, С.В. Калюжный. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов. – М.: Высш. школа, 1990. – 296 с.
94. Определитель бактерий Берги. – 9-е изд. / Пер. под ред. Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. – Т. 1, 2. – 800 с.