

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

Наталія ГРЕГІРЧАК

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНИКОВ

(підпис)

(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична

біотехнологія»

на тему: «Наноемульсійні форми вакцин»

Виконала: здобувач(-ка) II курсу, групи 01

СЛІПЧУК Тетяна Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник БУЦЕНКО Людмила Миколаївна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(ім'я та прізвище)

(підпис)

(ім'я та прізвище)

(підпис)

Рецензент Вікторія СТОЙКО

(ім'я та прізвище)

(підпис)

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

Здобувач(-ка)

(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 08 ” жовтня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СЛІПЧУК Тетяни Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Наноемульсійні форми вакцин

керівник роботи д.б.н., доц. БУЦЕНКО Л.М.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 07 жовтня 2024р. № 875-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2024

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент: *Pichia pastoris*. Продукт: антиген вірусу гепатиту В

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Огляд літератури. Техніко-економічне обґрунтування вакцини проти гепатиту В. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми одержання антигену та ЛЗ. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу. Опис технологічного процесу виробництва вакцини. Контроль виробництва вакцини. Складання патентної заявки

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема: 2 аркуші формату А1. Апаратурна схема: 2 аркуші формату А1

6. Консультанти розділів роботи

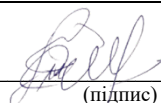
Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	РОЗДІЛ 1. Наноемульсії як перспективні агенти для доставки ліків	07.10.2024-14.10.2024	
2.	РОЗДІЛ 2. Характеристика та особливості отримання вакцин на основі наноемульсій	15.10.2024-20.10.2024	
3.	РОЗДІЛ 3. Сучасні підходи у виробництві вакцин проти гепатиту В	21.10.2024-25.10.2024	
4.	РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування вакцини проти гепатиту В	26.10.2024-01.11.2024	
5.	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми одержання антигену та ЛЗ	01.11.2024-04.11.2024	
6.	РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу	05.11.2024-07.11.2024	
7.	РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва вакцини	08.11.2024-10.11.2024	
8.	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва вакцини	10.11.2024-11.11.2024	
9.	РОЗДІЛ 9. Складання патентної заявки	11.11.2024-12.11.2024	
10.	Графічна частина	12.11.2024-13.11.2024	
11.	Оформлення роботи та списку використаної літератури	13.11.2024-14.11.2024	

Здобувач


(підпис)

Тетяна СЛІПЧУК

(ім'я та прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Людмила БУЦЕНКО

(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The topic of the qualification work is devoted to the design of the technology of biosynthesis of hepatitis B virus antigen after cultivation of the *Pichia pastoris* GS115-SS1S2 strain. Vaccination is a particularly important measure in conditions of the spread of infections, including hepatitis B. This is critical in war conditions, because when providing medical care to a wounded person who may not know about his infection with the hepatitis B virus, the medical worker is also at significant risk of infection. It is proposed to use the hepatitis B vaccine for immunization of medical workers, given the increased risk of their infection. The annual need for hepatitis B vaccine protein for vaccination of medical workers in Ukraine and the Masovian Voivodeship of Poland is 21,375,120 µg. The geometric volume of the fermenter should be 10 l with a filling factor of 0.6. The technological scheme for the isolation and purification of hepatitis B virus antigen after cultivation involves the following stages: separation of the culture fluid, homogenization, precipitation (NH₄)₂SO₄, ultracentrifugation, ion-exchange chromatography, ultrafiltration, gel filtration, stabilization and storage of HBsAg in buffer.

A spray dosage form and an intranasal method of vaccine delivery are proposed. A description of the vaccine according to the AND is developed. A material balance for one batch of nanovaccine is provided. The technological process of vaccine production is described. Vaccine production control includes determination of biomass concentration, carbon source, quantitative determination of HBs protein, establishment of thermal stability, a staged control map is developed. A draft patent application in the field of pharmaceutical biotechnology is developed.

The qualification work contains 9 sections, 2 figures, 17 tables, 117 references and 140 pages. The graphic part is presented by technological (2 sheets of A1 format) and hardware diagrams (2 sheets of A1 format).

Keywords: vaccination, hepatitis B, antigen, *Pichia pastoris* GS115-SS1S2, healthcare workers, fermenter, adjuvant, thermal stability, ELISA.

РЕФЕРАТ

Тема кваліфікаційної роботи присвячена проектуванню технології біосинтезу антигену вірусу гепатиту В після культивування штаму *Pichia pastoris* GS115-SS1S2. Вакцинація є особливо важливим заходом в умовах поширення інфекцій, зокрема й гепатиту В. Це є критичним в умовах війни, адже під час надання медичної допомоги пораненому, який може не знати про своє інфікування вірусом гепатиту В, медпрацівник також знаходиться під значним ризиком зараження. Запропоновано використовувати вакцину проти гепатиту В для імунізації працівників медичних закладів, зважаючи на підвищений ризик їх інфікування. Річна потреба у білку вакцини проти гепатиту В для щеплення медпрацівників в Україні та Мазовецькому воєводстві Польщі становить 21 375 120 мкг. Геометричний об'єм ферментера має становити 10 л з коефіцієнтом заповнення 0,6. Технологічна схема виділення та очищення антигену вірусу гепатиту В після культивування передбачає наступні стадії: сепарування культуральної рідини, гомогенізація, осадження $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ультрацентрифугування, іонообмінна хроматографія, ультрафільтрація, гель-фільтрація, стабілізація та зберігання HBsAg в буфері.

Запропоновано лікарську форму спрею та інтраназальний спосіб доставки вакцини. Розроблено опис вакцини згідно АНД. Наведено матеріальний баланс на одну серію нановакцини. Описано технологічний процес виробництва вакцини. Контроль виробництва вакцини включає визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю, кількісного визначення HBs білка, встановлення термостабільності, розроблено карту постадійного контролю. Розроблено проект патентної заявки в галузі фармацевтичної біотехнології.

Кваліфікаційна робота містить 9 розділів, 2 рисунки, 17 таблиць, 117 посилань та 140 сторінок. Графічна частина представлена технологічними (2 аркуші формату А1) та апаратурними схемами (2 аркуші формату А1).

Ключові слова: вакцинація, гепатит В, антиген, *Pichia pastoris* GS115-SS1S2, медпрацівники, ферментер, ад'ювант, термостабільність, ІФА.

ЗМІСТ

ABSTRACT	4
РЕФЕРАТ	5
ВСТУП.....	9
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	13
РОЗДІЛ 1. НАНОЕМУЛЬСІЇ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ АГЕНТИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛІКІВ.....	13
1.1 Трансдермальний спосіб доставки ЛЗ на основі наноемульсій.....	20
1.2 Парантеральний спосіб доставки ЛЗ на основі наноемульсій	20
1.3 Інтраназальний спосіб доставки ЛЗ на основі наноемульсій.....	21
РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ВАКЦИН НА ОСНОВІ НАНОЕМУЛЬСІЙ.....	23
2.1. Ін'єкційний шлях введення вакцин	24
2.2. Трансдермальний спосіб доставки вакцин.....	28
2.3. Вакцини для інтраназального застосування	31
РОЗДІЛ 3. СУЧАСНІ ПІДХОДИ У ВИРОБНИЦТВІ ВАКЦИН ПРОТИ ГЕПАТИТУ В.....	36
ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	44
РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ ГЕПАТИТУ В.....	44
4.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.....	44
4.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	45
4.3. Розрахунок потреби населення у субстанції для випуску вакцини проти гепатиту В на основі наноемульсій.....	46
4.4. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік	50
РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕНУ ТА ЛЗ.....	53

5.1. Обґрунтування вибору біологічного агенту, поживного середовища для його культивування	53
5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для виробництва вакцини	59
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ	68
6.1. Специфікація обладнання для виділення та очищення антигену вірусу гепатиту В.....	68
6.2. Опис технологічної схеми отримання антигену вірусу гепатиту В	69
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ	72
7.1. Вибір форми випуску лікарського засобу	72
7.2. Опис вакцини згідно АНД (проект АНД)	74
7.3. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва вакцини (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря)	83
7.4. Обґрунтування вибору підготовки вентиляційного повітря.....	89
7.5. Обґрунтування вибору підготовки води	91
7.6. Розрахунок річної потужності виробництва вакцини та кількості серій на рік	94
7.7. Матеріальний баланс на серію виробництва вакцини	96
7.8. Специфікація обладнання ділянки виробництва вакцини.....	98
7.9. Опис технологічного процесу виробництва вакцини	100
7.9.1. Опис допоміжних робіт (підготовки виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря, підготовки води)	100
7.9.1. Опис основних стадій процесу виробництва вакцини.....	105
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ	108
8.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва.....	108
8.2. Контроль ділянки біосинтезу	112

8.3. Контроль ділянки виробництва вакцини (карта постадійного контролю)	115
РОЗДІЛ 9. СКЛАДАННЯ ПАТЕНТНОЇ ЗАЯВКИ.....	119
9.1. Галузь і застосування корисної моделі.....	119
9.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки	119
9.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення.....	121
9.4. Опис запропонованого способу	122
9.5. Формула корисної моделі	123
9.6. Реферат	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	126

ВСТУП

Гепатит типу В, викликаний вірусом гепатиту В (HBV), є серйозним потенційно небезпечним для життя захворюванням, якому можна запобігти за допомогою вакцинації. Більшість людей, які нещодавно інфіковані вірусом гепатиту типу В, залишаються безсимптомними і не знають про свій гепатит протягом багатьох років. Лише деякі особи, щойно інфіковані даним збудником, мають симптоми (гострий гепатит). Симптоми можуть включати сильну втому, біль у животі, нудоту та жовтяницю. Більшість наявних наукових даних свідчать про те, що HBV не є безпосередньо цитопатичним, але пошкодження печінки спричинюється клітинною відповіддю на вірусні білки в інфікованих гепатоцитах [1].

Для багатьох людей гепатит В є короткочасним захворюванням, оскільки клінічні ознаки та симптоми гострого гепатиту В зазвичай зникають протягом 1-3 місяців. Фульмінантна печінкова недостатність виникає приблизно у 0,5%-1,0% дорослих із зареєстрованим гострим гепатитом В. У підгрупі осіб HBV також може спричинити хронічну інфекцію печінки, яка згодом може перерости в цироз (рубцеві зміни печінки) або гепатоцелюлярну карциному. Перебіг хронічної форми HBV-інфекції є динамічним з різними клінічними фазами, кожна з яких потенційно може тривати десятиліттями. Більшість захворювань, пов'язаних з гепатитом В, припадає на людей з хронічним статусом даного захворювання.

Вік зараження гепатитом В є основним визначальним фактором клінічного прояву гострого захворювання та розвитку хронічної інфекції. Менше 10% дітей молодше 5 років, які інфікуються, мають початкові клінічні ознаки або симптоми захворювання (тобто гострого гепатиту В) порівняно з 30% випадків інфікування у дорослих [1].

НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сліпчук Т.О.			Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					9	4
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Ризик розвитку хронічної інфекції HBV змінюється обернено до віку. Так, у 80–90 % немовлят, інфікованих протягом першого року життя, розвиваються хронічні інфекції, на відміну від 30–50 % дітей, інфікованих до 6 років, та 1–5 % дорослих. Неонатальна імунна толерантність до вірусних антигенів, очевидно, відіграє важливу роль у персистенції вірусу у немовлят, інфікованих при народженні. Оскільки випадки зараження гепатитом В, що виникають перинатально, у дитинстві або в ранньому дитинстві, найімовірніше стають хронічними, вакцинація новонароджених дітей і немовлят сьогодні є ключовим засобом профілактики вірусу гепатиту В.

Імунізація проти гепатиту В є дуже важливою, оскільки інфекція HBV все ще є основною причиною раку печінки та спричиняє значну захворюваність і смертність у всьому світі. У 2015 році приблизно 887 220 осіб померли в результаті інфекції HBV у всьому світі (87 076 через гострий гепатит, 462 690 через цироз печінки та 337 454 через гепатоцелюлярну карциному). Крім того, за оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), у 2015 році 257 мільйонів людей жили з хронічною інфекцією гепатиту В, частота та запусненість якої різняться залежно від регіону та субпопуляції. Станом на 2016 рік 27 мільйонів людей знали про свою інфекцію, тоді як лише 4,5 мільйона (16,7%) людей з даним діагнозом проходили лікування. Однак завдяки успішним програмам вакцинації епідеміологія гепатиту В зазнала змін протягом останніх років [1].

HBV не може ефективно реплікуватися в клітинних культурах, що вказує на те, що неможливо розробити вакцину проти гепатиту В на основі системи культивування *in vitro*. Доктор Кругман і його колеги провели новаторську роботу з розробки вакцини проти гепатиту В. Вони показали, що кип'ятіння знищує інфекційність плазми носіїв гепатиту В. Активна імунізація людей кип'яченою плазмою індукувала антитіла проти HBsAg (анти-HBs), таким чином імунізовані особи були частково захищені від зараження гепатитом В. Імуноглобулін проти гепатиту В (HBIG) показав ефективність для запобігання інфекції HBV у людини. Ці дослідження продемонстрували можливість

природного утворення вірусних антигенів у носіях вірусу гепатиту В при розробці вакцини проти цього захворювання [2].

Хоча плазмова вакцина проти гепатиту В є безпечною та ефективною, відносно висока вартість такої вакцини обмежує її широке використання. Теоретичні проблеми безпеки, пов'язані з плазмою носіїв HBV, які можуть бути коінфіковані ВІЛ та іншими патогенами, також перешкождали використанню цієї вакцини. Крім того, джерело плазми людини, інфікованої HBV, обмежено, особливо якщо поширеність HBsAg знизилася після вакцинації проти гепатиту В. Ці фактори спонукали до пошуку альтернативних вакцин.

Успішне клонування гена HBV S в бактеріях показало можливість використання рекомбінантного поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) як вакцини проти гепатиту В. HBsAg, синтезований дріжджами *Saccharomyces cerevisiae*, здатний збиратися в частинки, подібні до частинок розміром 22 нм, які утворюються в організмі людини. У 1986 році Управлінням з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США було схвалено рекомбінантну вакцину проти гепатиту В. Відтоді рекомбінантна вакцина проти гепатиту В поступово замінила плазмову вакцину проти гепатиту В. У материковому Китаї виробництво плазмової вакцини проти гепатиту В було припинено в 2000 році. З 2001 року всі вакцини проти гепатиту В, які використовуються в Китаї, складаються з рекомбінантного HBsAg. Зараз плазмова вакцина проти гепатиту В більше не використовується в усьому світі, і всі вакцини проти цієї хвороби містять рекомбінантний HBsAg.

Однак у 2018 році нова вакцина проти гепатиту В під назвою HEPLISAV-B® була ліцензована для дорослих віком ≥ 18 років. Для даної вакцини характерно введення лише двох дози з інтервалом в 1 місяць, замість трьох доз протягом 6 місяців [2].

Однак наявні вакцини, незважаючи на те, що вони загалом ефективні, є менш корисними для груп високого ризику із захворюваннями нирок або іншими імунологічними відхиленнями. В останні роки з'являється інформація

про розробки ад'юванту на основі наноемульсії для підвищення імуногенності та доставки вакцинних антигенів. Наноемульсійні ад'юванти — це емульсії «масло у воді», отримані шляхом високошвидкісної гомогенізації з використанням нешкідливих поверхнево-активних речовин і розчинників як стабілізаторів із середнім розміром крапель 200-600 нм. На тваринних моделях було показано, що ці ад'юванти підсилюють націлювання антигенів вакцини на імунну систему, водночас безпечно викликаючи потужні гуморальні та клітинні імунні відповіді типу Th1, не викликаючи запалення [3].

Тому дослідження у напрямку отримання вакцини проти гепатиту В на основі наноемульсій є актуальним в розрізі сучасного стану захворювань по всьому світу.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД


РОЗДІЛ 1. НАНОЕМУЛЬСІЇ ЯК ПЕРСПЕКТИВНІ АГЕНТИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛІКІВ

Наномедицина та один із її напрямків – нанофармакологія, що є відносно молодою наукою, що в останні десятиліття знаходить все більше практичного застосування у медичній практиці для профілактики, діагностики і лікування захворювань з контролем біологічної активності, фармакологічної та токсикологічної дії отриманих продуктів чи медикаментів. Практичні розробки з нанотехнологій реалізувалися у такі наноматеріали: нанопрепарати, фулерени, ліпосоми, дендримери, наносфери, наностержні, наноплівки, нанотрубки, нанокompозити, нанокристали, нанодротинки, нанопорошки, нанороботи, нанокапсули, нанобіосенсиори, нанопристрої, нанобіоматеріали, наноструктурні рідини (колоїди, міцели, гелі, полімери). Наночастинки різних металів розміром від 5 до 60 нм проявляють властивості, що кардинально відрізняються від частинок більшого розміру [4, 5, 10, 13].

Зокрема, класичним прикладом може слугувати дія іонів срібла, що проявляють протизапальну, протигнійну та антиінфекційну дії. Дослідження [5] описує модель ЛЗ на основі молекул інсуліну (І) та комбінації наночасточок золота (З), інкапсульованих у молекули декстрану (З+Д), що підвищує у тричі активність інсуліну в порівнянні із активністю інсуліну у вільній формі, що свою чергу теоретично (в подальших дослідженнях *in vivo*) дає змогу отримати довшу тривалість терапевтичного ефекту та знизити частоту доволі болісних ін'єкцій.

Суттєвими перевагами нанотехнологічних лікарських засобів (ЛЗ) над вже традиційними формами ЛЗ є можливість впливу на уражені органи, тканини, фізіологічні рідини без негативної дії на інші мішені (органи і системи органів), що значно підвищує ефективність терапії.

НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сліпчук Т.О.			РОЗДІЛ 1. Наноемульсії як перспективні агенти для доставки ліків	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					13	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Наноемульсії або як ще вони відомі у західній науковій літературі, емульсії нанометричного розміру, є тонкими дисперсіями вода-в-маслі (в/м) і масло-у-воді (м/в) двох незмішуваних рідин. Наноемульсії представляють собою краплі розмірами 20–200 нм, що стабілізуються шляхом додавання відповідних амфіфільних емульгаторів. Завдяки кінетичній стабільності наноемульсії (НЕ) стійкі на гетерогенних системах, на відміну від мікроемульсій (МЕ). Наноемульсії також відомі як мініемульсії, дрібнодисперсні емульсії, субмікронні емульсії тощо. Вони можуть бути представлені у вигляді емульсій О/В (олія у воді), В/О (вода в олії) або бі-неперервні наноемульсії, в яких мікродомени олії та води дисперговані всередині системи. Кількість олії в наноемульсіях О/В може змінюватися, але зазвичай становить 5–20 % мас. [4, 6]. Розмір крапель емульсії залежить від складу масляної фази, міжфазних властивостей та вязкості як неперервної, так і дисперсної фаз, типу емульгатора / поверхнево-активної речовини, швидкості змішення під час емульгування, а також розчинності масляної фази у воді. Основними складовими є 3 компоненти: масло/ліпіди, емульгатор та соемульгатор/сорозчинник.

В о/в наноемульсіях концентрація глобул *ліпідної / масляної* фракцій складає близько 5-20 %, хоча в окремих випадках досягає 70 %. На сьогоднішній день у виробництві наноемульсій використовуються кокосова, кунжутна, соняшникова, соєва, бавовняна, оливкова, кукурудзяна олії, що характеризуються як коротколанцюгові, середньоланцюгові або довголанцюгові ланцюгові тригліцериди, що використовуються як окремо, так і в комбінації. Для наноемульсій, що входять до складу ЛЗ для місцевого, парентерального та перорального застосування також використовують олеїнову кислоту та етилолеат. Вибір олії в основному залежить від здатності розчиняти у собі молекули АФІ. Синтетичні ліпіди, такі як Caproyl 90, LabraflMM44, Maisine 35-1, Miglyol 812, Captex 200, Captex 355 та Captex 800 також досить широко поширені при розробці складу для наноемульсій [4, 9].

У ролі *емульгатору* часто використовується лецитин (фосфатидилхолін). Основна функція емульгатора – зменшення міжфазного натягу у наноемульсіях, стабілізація і перешкоджання агрегації крапель. На межі олія/вода емульгатори швидко адсорбуються та створюють стеричний ефект, електростатичну або подвійну електростеричну стабільність. Найбільш відомими комерційно використовуваними емульгаторами є поліоксил 35, рицинова олія (Cremophor EL), солютол HS-15 (поліоксіетилен-660-гідроксистеарат), Твін 20/40/60/80, Спанс 20/40/60/80. При виборі емульгатора також варто враховувати такий показник, як гідрофільно-ліпофільний баланс (ГЛБ), оскільки емульгатори із високим показником ГЛБ (8-18) доцільніше використовувати у о/в наноемульсіях, в той час як для наноемульсій в/о краще використовувати емульгатори із індексом ГЛБ (3-6).

Соемульгатор/сорозчинник. Для створення наноемульсій коемульгатори необхідно вводити в дуже малих кількостях. Більшість коемульгаторів складається з (C3–C8) коротко- та середньоланцюгових спиртів. Вони допомагають зменшити сили міжфазного натягу та підвищують плавність межі розділу в наноемульсії. За рахунок підвищення рухливості вуглеводних «хвостів», покращується дифузія олії. Бутанол, етанол, пропіленгліколь та ізопропіловий спирт є одними з коемульгаторів, які найчастіше використовуються [4, 9].

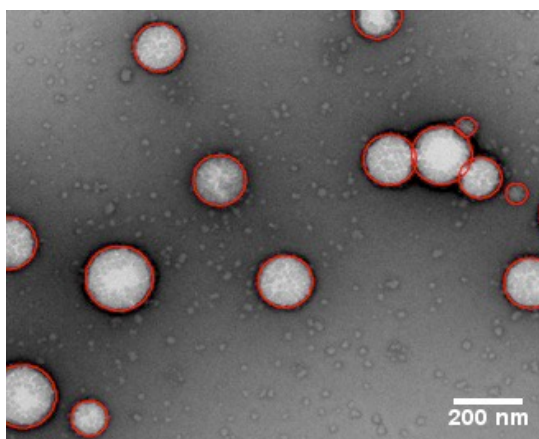


Рис. 1.1. Негативне TEM-зображення стабілізованої силікатними частинками наноемульсії олії у воді

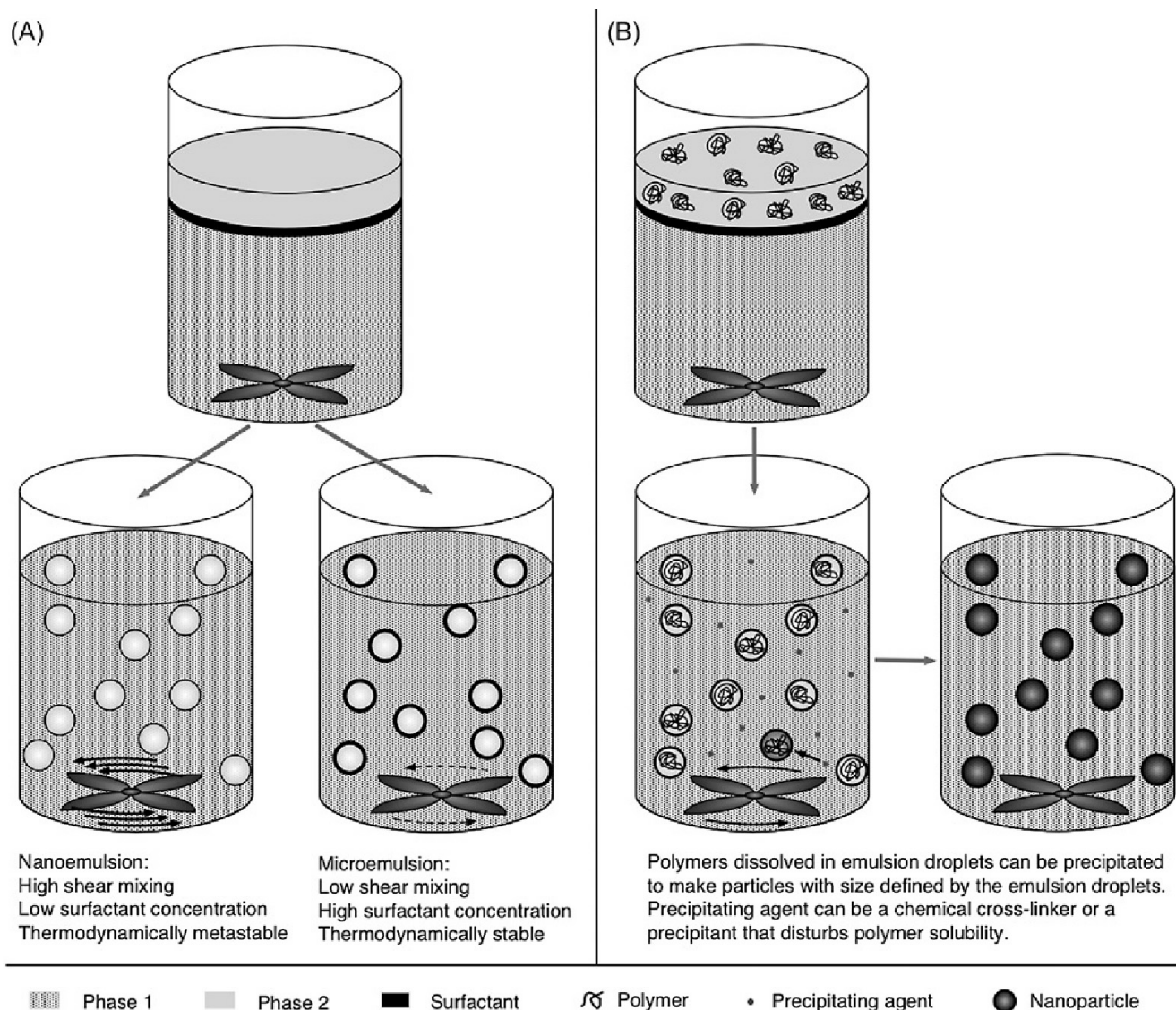


Рис. 1.2. Утворення та використання наноемульсій як матриць для формування частинок нанод'ювантів

На частині А *рис. 1.2* показано спосіб утворення та характеристики наноемульсій у порівнянні з мікроемульсіями. Частина В *рис. 1.2* показує використання мікроемульсії як матриці для формування твердих частинок нанод'юванту [4].

Основними перевагами наноемульсій є:

- під час виробництва використовується нижча концентрація емульгатора (3-10 %), ніж при виробництві МЕ, що потребують вищих концентрацій (20 %) емульгатора;

- наноемульсія сприяє ефективному транспортуванню діючих речовин через напівпроникні мембрани, а завдяки більшій площі поверхні, проникнення збільшується в емульсійну систему;
- відмінні антифлокуляційні властивості крапель нанорозміру. Крім того, це дає змогу зменшити дію сил гравітації та броунівського руху у розчині, що в свою чергу запобігає випаданню в осад;
- простота виготовлення наноемульсій;
- покращують відтворюваність профілю плазми та біодоступність;
- наноемульсії є суперрозчинниками і тому їх можна включати до складу як гідрофільних, так і ліпофільних препаратів;
- активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) інкапсульований у наноемульсію захищений від рН та окиснення.
- наноемульсії можуть бути трансформовані у вигляді гелів, кремів, пінок, аерозолів і спреїв. Крім того, їх можна вводити перорально, місцево, внутрішньовенно, внутрішньолегенево, інтраназально та внутрішньом'язово. Порівняно з міцелярною дисперсією, наноемульсії мають більш високу здатність до розчинення, вони більш термодинамічно стабільні.
- маскують неприємного присмаку ЛЗ, що можуть викликати блювоту;
- є альтернативою ліпосомам та везикулам (що є малостабільними) [4, 11, 13].

Загалом використання наноемульсій у фармацевтиці є перспективним напрямом, оскільки суттєво покращує терапевтичні властивості ЛЗ, зокрема виступають у якості носіїв, покращують фізико-хімічні властивості і дозволяють проявляти гнучкість у виборі способу введення ЛЗ до організму. Ще одним перспективним напрямом застосування ЛЗ із основою із наноемульсій є діагностика та терапія ракових захворювань. Наприклад у ЕС у терапії плоскоклітинної карциноми голови та шиї використовується ЛЗ Фоскан®

[11, 12], що застосовується у пацієнтів, для яких не підходить променева терапія, хірургічне втручання чи системна хіміотерапія.

Принцип дії ЛЗ базується на введенні до клітин пухлини фотосенсибілізатора та наступного впливу на пухлину світлом із довжиною хвилі 600-800 нм. При цьому фотосенсибілізуюча речовина переходить із пасивного у збуджений стан, що в свою чергу провокує утворення рідикалів активного кисню, який незворотно знищує клітини пухлини. Фоскан[®] виступає фотосенсибілізуючим агентом, що складається із магнітної наноемульсії, синтезованої шляхом емульгування поверхнево-активних речовин у водному середовищі та соєвих фосфоліпідів в органічній фазі. Магнітною наночастинкою є покритий фосфатом маггеміт ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), стабілізований при біологічному рН у вигляді водного колоїду.

У табл. 1.1 нижче приведено приклади ЛЗ, що містять у своєму складі наноемульсії [13].

Таблиця 1.1

Наноемульсії, що входять до складу ЛЗ для парантерального, орального та місцевого використання

Назва ЛЗ (МНН)	Наноемульсія		Функція наноемульсії у складі ЛЗ
	Дисперсна фаза	Назва сурфактанту	
Доцетаксел	Олеїнова кислота, стеарил амін	Яечний лецитин	Покращення розчинності, гідролітичної нестійкості та побічних ефектів, спричинених ЛЗ
Талідомід	Касторова олія, оливкова олія, соєва олія, МСТ	Твін 80	Покращення поганої розчинності
Інсулін	Самоутворюваний білковий комплекс	Полівініловий спирт	Захист від ферментної деградації
Пакітаксел	Олія кедрового горіха	Ліпоїд-80	Покращення поглинання клітинами
Прімахін	Миглилол 812	Плюронік F68	Зменшення дози, покращення біодоступності, зниження токсичності
Клотримазол	Соєва олія	Плюронік F68, кремофор, Твін 20, Твін 80	Покращення біодоступності
Аспірин	Пропіленгліколь монолаурат	Кремофор	Мінімізація побічних реакцій
Колхіцин	Ізопропілміристат	Твін 80	покращення розчинності у воді, покращення проникності і зниження метаболізму
Пірохікам	Соєва/кокосова олії	Твін 80	Покращення розчинності, адсорбції та терапевтичної ефективності
Дапсол	Ізопропілміристат	Твін 80, Спан 80	Підвищення швидкості розчинення
Керамід	Сфінголіпід	Ліпоїд	Покращення проникності шкіри
Німесулід	Каприн тригліцерид	Спан 60	Вивільнення АФІ у шкірному шарі
Селегілін	Олія виноградних кісточок	Солутол [®] , Лабразол [®]	Покращення біодоступності під час доставки до мозку
Пароксетин	Кампмул МСМ	Солутол HS	Транспортування до мозку, посилення проникнення АФІ
Оланзапін	Кампмул МСМ	Твін 80	Посилення носової дифузії, мозкової біодоступності
Флуоксетин НСІ	Кампмул МСМ	Лабразол [®]	Посилення носової дифузії

1.1 Трансдермальний спосіб доставки ЛЗ на основі наноемульсій

Доставка ЛЗ через шкіру, а далі через системний кровотік має суттєві переваги, оскільки такий спосіб введення дає змогу безперервного контрольованого розподілу препарату протягом більш тривалого періоду часу, навіть коли самостійне введення пацієнтом може бути неможливим. Крім того, трансдермальний спосіб доставки дозволяє в будь-який момент припинити або відновити прийом ЛЗ. Суттєвим недоліком такого способу введення є необхідність контролювати переперерозподіл ЛЗ під час проходження шкірної кровоносної та лімфатичної систем. Використання нанорозмірних емульсій може пришвидчити проходження АФІ через пори шкіри і дозволяє проникнути в системний кровотік для більш ефективного розподілу [4].

У роботі [10] описано модель ЛЗ із кофеїном у якості діючої речовини для терапії ракових захворювань, оскільки новітні дослідження демонструють перспективність використання цього АФІ у лікуванні деяких форм раку. Зокрема, є докази того, що кофеїн у шкірі може виконувати захисні функції від розвитку раку шкіри, що виникає під дією сонячного УФ опроміння. Модель ЛЗ на основі наноемульсії та кофеїну продемонструвала збільшення проникності кофеїну у покриву шкіри, у порівнянні із моделлю на основі тільки водного розчину кофеїну.

1.2 Парантеральний спосіб доставки ЛЗ на основі наноемульсій

Завдяки здатності розчиняти великі кількості гідрофобних речовин, взаємній сумісності та захисту ЛЗ від ферментативного розкладання та гідролізу у ЖКТ наноемульсії є ідеальними носіями для парантерального введення. Крім того, оскільки наноемульсії забезпечують стабільне та контрольоване вивільнення ЛЗ протягом тривалішого періоду часу, можна зменшити частоту та дозування ін'єкцій протягом курсу медикаментозної терапії. Наприклад, протягом тривалого періоду часу для пацієнтів не існувало загального протисудомного препарату на основі карбамазепіну із парантеральною формою введення, через обмежену розчинність у воді цього АФІ. Робота [14] демонструє модель ЛЗ для внутрішньовенного введення на

основі наноемульсії із хорошою кінетикою вивільнення, а також підвищеним рівнем біодоступності *in vitro*.

1.3 Інтраназальний спосіб доставки ЛЗ на основі наноемульсій

Назальні нановакцини, що вводяться інтраназальним шляхом, є оптимальними для масової вакцинації під час пандемій і зручні для стимуляції слизової та системної імунної відповіді [15]. Протягом останніх десятиліть дослідження інтраназального шляху доставки ліків привернули значний інтерес і визнані перспективним альтернативним шляхом введення ліків. Наночастинки можуть посилити доставку пептидів, білків, ліків і вакцин цим шляхом. Наночастинки та наноконструкції на основі гідрогелевого полімеру для доставки вакцин шляхом інтраназального введення мають велике значення для вакцинології [16, 17].

Слизова оболонка носа є терапевтично ефективним способом системного введення ліків, що дозволяє оминати деякі захисні бар'єри організму. Інтраназальний спосіб введення також є безболісним, терпимим і неінвазивним. Завдяки меншій ферментативній активності, більшій кількості імуноактивних ділянок і гарній проникності шару епітелію носова порожнина є одним із найефективніших місць для доставки ліків, оскільки для інших способів введення ЛЗ, що діють на різні мозкові центри, величезною проблемою є проходження гематоенцефалічного бар'єру, який утворений малопроникним ендотелієм, що розділяє системний кровотік. В свою чергу, нюхова зона слизової оболонки носа служить прямим зв'язком між носом і мозком, і такі захворювання, як хвороба Альцгеймера, мігрень, депресія, шизофренія, хворобу Паркінсона та менінгіт лікуються більш ефективно ЛЗ, розробленими на основі наноемульсій [4, 18, 19].

Дані дослідження свідчать, що використання наноемульсійної технології в системах інтраназальної доставки ліків дасть значні результати в лікуванні розладів центральної нервової системи шляхом ефективного націлювання ЛЗ на мозок. Прикладом може служити ЛЗ Риспердал, що є схваленим антипсихотичним препаратом, що належить до похідних бензізоксазолу і

доступний у формі 2-х таблетованих торгових марок Risperdal® та Risperdal® М-ТАВ. Проте такі лікарські форми демонструють низьку біодоступність, через інтенсивний метаболізм першого проходження, а нецільова доставка призводить до численних побічних ефектів. Розробка інтраназального ЛЗ на основі наноемульсії (суміш сармол МСМ, Твіну 80, транскутолу, пропіленгліколю) та Риспердалу і тестування на щурах показало можливість не лише покращити біодоступність, шляхом запобігання метаболізму першого проходження, але також забезпечує націлювання на сайт рецептора та обходить гематоенцефалічний бар'єр, щоб досягти бажаного ефекту [20].

Отже, можна зробити висновок, що одним із потенційних методів доставки є використання наноносіїв (наноемульсій), які демонструють значну перевагу в захисті біомолекул, сприянні взаємодії наноносіїв зі слизовою оболонкою та спрямуванні антигенів до лімфоїдних тканин.


РОЗДІЛ 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ВАКЦИН НА ОСНОВІ НАНОЕМУЛЬСІЙ

Вакцинація є одним із найбільш перевірених засобів запобігання інфекції, а також дозволяє обмежити клінічний перебіг захворювання. На сьогоднішній день для планової вакцинації використовуються багато вірусно-орієнтованих вакцин, що досягає значного прогресу в профілактиці та лікуванні вірусних захворювань. Крім того в останні роки вчені працюють у напрямі розробки вакцин проти ракових захворювань. Як вже зазначалось у попередніх розділах, наноемульсії завдяки своїм фізико-хімічним властивостям є відмінним інструментом для покращення характеристик ЛЗ, в тому числі і вакцин. Зокрема, для такого виду вакцин, як мРНК-вмісні характерними проблемами є нестабільність, надмірна імуногенність та відсутність ефективної системи доставки мРНК [21].

Дослідження [22, 23] показали можливість стабілізації мРНК вакцин для боротьби з вірусом венесуельського енцефаліту коней і вірусом Зіка, катіонними наноемульсіями (КНЕ), що є ефективною системою доставки (носієм) та вступають у взаємодію з компонентом вакцини – самоампліфікуючою РНК та індуюють надійну захисну імуногенність. Головним компонентом КНЕ є катіонний ліпід 1,2-діолеоїл-sn-глицеро-3-фосфохолін.

Вибір ліпиду обумовлений позитивними зарядами емульгації компоненту емульсійного ад'юванта MF59 (запатентований компанією Novartis, що вже давно використовується як ад'ювант вакцини, має встановлений клінічний профіль безпеки та добре переноситься дітьми, дорослими та людьми похилого віку), який необхідний для посилення імуногенності, підвищення титру антитіл, зміни типів антитіл і посилення уповільненої гіперчутливості.

НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сліпчук Т.О.			РОЗДІЛ 2. Характеристика та особливості отримання вакцин на основі наноемульсій	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					23	9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Результати продемонстрували хорошу ефективність вакцини+КНЕ, індукцію імунної відповіді ад'ювантною субодиноцею та низькою дозою комплексу КНЕ. На основі наведених вище доклінічних досліджень є підстави вважати, що комбінація вакцини + КНЕ є перспективною для подальшого тестування у клінічних дослідженнях.

2.1. Ін'єкційний шлях введення вакцин

Ін'єкційний спосіб введення вакцин є найбільш відомими і поширеним у медичній практиці. Оскільки люди і тварини є представниками схожих видів, то і хвороби якими вони хворіють, а також методи боротьби із ними є подібним. Одним із прикладів може служити таке захворювання тварин, як Ящур. Ящур – це висококонтагіозна хвороба, спричинена вірусом ящуру, який інфікує парнокопитних тварин. Спалах ящуру загрожує тваринництву, сільському господарству та національній економіці. Спалах хвороби в країні миттєво викличе заборону експорту тварин та тваринницької продукції до всіх країн, вільних від ящуру.

Хвороба має здатність швидко поширюватись на значній території, серед молодняку викликає високий падіж та поодинокі летальні випадки серед дорослих тварин. Можлива пряма передача інфекції людині повітряно-краплинним шляхом при контакті з хворою твариною. Люди здатні виділяти вірус у респіраторному тракті протягом 24-48 годин. Інкубаційний період може тривати від декількох днів до двох тижнів. Вакцина, що вводиться інекційно, виготовлена з інактивованого вірусу ящуру (іЯ), у складі якого є ад'юванти, є найефективнішим способом запобігання ящуру. Капсид іЯ має сферичну форму з діаметром близько 28 нм. На жаль, капсид іЯ надзвичайно нестабільний і легко дисоціює на неактивні пентамери навіть при нейтральному рН і температурі 4 °С [24].

Збереження структурної цілісності та підвищення стабільності антигену іЯ в ад'ювантах має вирішальне значення для забезпечення ефективності вакцини. Для підвищення стабільності іЯ було запропоновано молекулярні модифікації або додавання стабілізаторів. Більшість цих стратегій зосереджено

на стабілізації іЯ у водних розчинах. Однак стабільність іЯ в ад'юванті також має вирішальне значення, оскільки іЯ, що зберігається в остаточній вакцині проти ящуру, об'єднаний з ад'ювантом. Ад'ювант Montanide ISA 206 на основі емульсії зараз найбільш широко використовується у вакцині проти ящуру. На жаль, композиція з ад'ювантами ще більше прискорює дисоціацію іЯ, оскільки іЯ надзвичайно чутливий до поверхні розділу масло–вода емульсії. Взаємодія між іЯ і поверхнею олія/вода ще більше знизить стабільність іЯ. Наприклад, іЯ повністю дисоціював протягом трьох місяців зберігання при 4 °С в масляно-емульсійному ад'юванті, що призвело до втрати імунної активності [24].

Було кілька спроб стабілізувати іЯ в ад'ювантах шляхом додавання стабілізаторів. Дослідження показали, що 20% сахарози або 10 % гліцерину можуть підвищити термостабільність іЯ у трьох різних типах ад'ювантів, включаючи фосфат алюмінію, Montanide ISA 50 V та AddaVax, який є твердою частинкою, в /о емульсія та о/в ад'ювант емульсії відповідно. Подібним чином, довготривала стабільність іЯ в ад'юванті Montanide ISA 206 була збільшена шляхом синергічного додавання сахарози та бичачого сироваткового альбуміну. Хоча ці стратегії ефективно стабілізують іFMDV в ад'ювантах, вони все ще мають деякі обмеження.

Висока концентрація стабілізаторів може порушити стабільність емульсійних ад'ювантних систем, що полегшує деемульгацію ад'юванта. Крім того, стабілізатори на основі цукру підвищують ризик мікробіологічного забруднення. Додавання консервантів може запобігти цим забрудненням. Але дослідження показали, що консерванти, такі як тіомерсал, також прискорюють дисоціацію іFMDV. Була розроблена модель доставки антигену, заснована на координаційній взаємодії між Zn^{2+} хелатними наночастинками хітозану та іЯ. іЯ, завантажений на наночастинковий ад'ювант, продемонстрував підвищену термостабільність завдяки координації між Zn^{2+} та іЯ. На жаль, стабільність цієї дисперсної вакцини при тривалому зберіганні не досліджувалася. Дослідження ад'ювантної системи, яка може посилити імунні відповіді без послаблення або

навіть покращення стабільності іЯ, є необхідним і критичним для індустрії вакцин проти ящуру [24].

Робота [24] демонструє перспективність стабілізації антигену за допомогою наноемульсії, яка запобігає кислотній та термоіндукованій дисоціації іЯ. Рідкий наноемульсійний ад'ювант складається із холіну і ніацину (олійно-іонна рідина), а також сквалену та Твіну 80, із розмірами монодисперсного діаметру $135,8 \pm 40,4$ нм. Іонні рідини (ІР) – це розплавлені солі з температурою плавлення нижче 100 °С, які використовуються як стабілізатори або системи доставки ліків у біофармацевтичних препаратах. Останнім часом ІЛ, особливо ІЛ на основі холіну, продемонстрували великий потенціал у складі вакцин.

Наприклад, використання холіну та молочної кислоти як ін'єкційного ад'юванта овальбуміну (OVA) викликало сильніші імунні реакції, ніж найбільш широко використовуваний галуновий ад'ювант, посилюючи імунну інфільтрацію в місці ін'єкції. Холін і геранат показали чудову здатність підвищувати проникність в дерму та через неї. Холін-жирні кислоти використовувалися для покращення розчинення водорозчинного пептиду антигену в масляному підсилювачі проникнення через шкіру. Потік трансдермальної доставки пептиду збільшився в 28 разів за допомогою холін жирних кислот порівняно з доставкою за допомогою водного носія. Було показано, що холін-Cl або холін-SO₄ як стабілізатори можуть покращити термо- та довготривалу стабільність іЯ у буферному розчині. А імунізація іЯ, складеною з ад'ювантом Montanide ISA 206, доповненим цими двома ІР, може індукувати вищі титри антитіл у мишей.

Термостабільність і довготривала стабільність іЯ були значно покращені в наноемульсії о/ІР порівняно з емульсією о/В без ІР і в комерційному ад'юванті Montanide ISA 206. Наноемульсія о/ІР проявила свій допоміжний ефект шляхом покращення гуморальних імунних відповідей. Імунізація іЯ з наноемульсією о/ІР у якості ад'юванту, індукувала специфічні титри IgG, подібні до титрів ад'юванту Montanide ISA 206 і приблизно в 4 рази вищі, ніж

іЯ без ад'юванту, також сприяла активації В-лімфоцитів і секреції інтерлейкіну-4 у мишей. Як видно із отриманих результатів, наноемульсія о/ІР на основі холіну та ніацину може слугувати перспективною ад'ювантною платформою для вакцини проти ящуру.

Як допоміжний засіб для вакцини проти ящуру була розроблена стабільна та біосумісна наноемульсія типу вода в олії (W/O) з ізопропілмірикатом як масляною фазою, полігліцерину полірицинолеатом і Твін-80 як поверхнево-активними речовинами [25]. Розчинення Твін-80 у водній фазі зменшувало розмір крапель і покращувало стабільність емульсії за рахунок звуження розподілу за розміром, підвищення в'язкості та зменшення міжфазного натягу між маслом і водою. Потім наноемульсію було з'єднано з інактивованим вірусом ящуру та овальбуміном, щоб дослідити її потенційне застосування в якості ад'юванту шляхом внутрішньом'язової ін'єкції мишам. Порівняно з комерційним ад'ювантом ISA-206, така W/O наноемульсія здатна індукувати як гуморальну, так і клітинну імунну відповідь [25].

Група вчених також проводили роботи в напрямку отримання вакцини проти вірусу ящуру на основі наноемульсії [26]. Новий наноемульсійний ад'ювант розроблений на основі сквалану. Результати імунізації мишей показали, що вакцина SNA-VLPs значно підвищила рівень специфічних антитіл у мишей протягом 4 тижнів, включаючи більш високі рівні IgG1 та IgG2a. Отже, такий новий ад'ювант наноемульсії сквалану є ефективним для одержання нової VLPs-вакцини проти ящуру.

У роботі [27] наведено дослідження катіонної наноемульсії для доставки РНК-вакцин нового покоління. Досліджена мРНК самоампліфікується. Показано, що невірусна доставка мРНК розміром 9 kb викликає потужну імунну відповідь у мишей, щурів, кроликів і приматів (75 мкг). Доставлена за допомогою наноемульсії самоампліфікуюча мРНК покращує місцеве імунне середовище шляхом залучення імунних клітин, подібних до субдиничної вакцини MF59. Зазначено, що місце експресії білка в м'язі та величина експресії білка подібні до вірусного вектора.

Інші робота [28] описує доставку ДНК-вакцини за допомогою наноемульсії. Три катіонні композиції наночастинок були оцінені щодо їх потенціалу як носіїв для ДНК-вакцини та мураміддипептиду (МДП) як імуностимулюючого агента для індукції та підвищення імуногенності плазмідної ДНК (пДНК), що кодує антиген *Mycobacterium tuberculosis*. Композиції включали наночастишки триметилхітозану (ТМС), наноемульсію сквалену у воді та наноемульсію мінерального масла у воді. Усі три носії демонструють сильний ад'ювантний ефект, однак лише наночастишки ТМС були здатні зміщувати імунні відповіді до Th1 клітин. Було розроблено нові склади наночастинок, навантажених pDNA-Ag85A, які індукують антигенспецифічні імунні відповіді у мишей, використовуючи переваги синергічних комбінацій агоністів Toll-подібного рецептора (TLR) та NOD-подібного рецептора (NLR) для підвищення ад'ювантності використовуваних носіїв.

2.2. Трансдермальний спосіб доставки вакцин

В останні роки трансдермальний імунізація все більше зацікавлює розробників вакцин, оскільки такий тип введення володіє багатьма властивостями «ідеальної вакцини», зокрема визначеною антигенною специфічністю, націленністю на конкретну антигенпрезентуючу групу клітин та чітко виражені ад'юванти. Це обумовлено тим, що імунологічно шкіра є привабливою мішенню для формування імунних реакцій шляхом активації шкіро-асоційованої лімфоїдної тканини та вузлів, що було підтверджено групою вчених близько 20 років тому у ході досліджень механізму виклику синтезу антитіл через шкіру, специфічних для холерного токсину. До того ж, дозу вакцини можна легко регулювати шляхом вибору ділянок шкіри або ділянок тіла. Крім того, за такого типу ведення, не потрібні болючі ін'єкції, а також персонал, що їх буде виконувати [29, 30].

Робота [31] демонструє технологію вдосконалення за допомогою наноемульсії вакцини на основі везикул зовнішньої мембрани (20-100 нм) *Salmonella enterica* serovar (мікроорганізм збудник черевного тифу), що

вводиться місцево через шкіру. Ефективність дермального шляху в цілях імунізації в основному базується на захисному механізмі, що запускається клітинами Лангергансу і дендритними клітинами, які в основному локалізовані в дермі, у відповідь на потрапляння патогенних організмів.

Проблемою введення будь-якої вакцини через шкіру є необхідність проходження зовнішнього шару шкіри (роговий шар епідермісу), що є потужним бар'єром, який серйозно обмежує можливість місцево введених антигенів досягти імунних клітин. Бар'єр рогового шару являє собою кілька шарів без'ядерних корнеоцитів, вбудованих у позаклітинний матрикс, збагачений ліпідними сполуками, такими як кераміди, холестерин і вільні жирні кислоти. Однак антигенні сполуки (зазвичай біомакромолекули з високою молекулярною масою) мають дуже низьку здатність перетинати роговий шар, щоб досягти базального епідермісу та дерми, в яких розташовані імунні клітини. Це означає, що використання трансдермального типу введення має включати систему або пристрій, здатний пройти скрізь роговий шар.

Отже, для досягнення терапевтичного ефекту, компоненти вакцини мають володіти зданістю до проникнення через роговий шар та «вміти» підсилити поглинання антигену клітинами, щоб спровокувати потужну імунну відповідь. З цією метою, під час експерименту, як один із компонентів вакцини була використана НЕ наступного складу: рідкий парафін (16 %) у якості масляної фази, а також Labrasol® (45.7%) та Plurol® oleique (37.5%), як ПАР. Роль цих речовин полягає у мацерації шкіри та як наслідок підвищення проникності шару шкіри компонентами вакцини. У якості контрольного зразка використовували антиген включений до мазі на основі поліетиленгліколя. Результати експерименту показали, що комбінація вільного антигену везикул та НЕ викликає підвищену секрецію специфічних антитіл IgG і підвищує рівень прозапальних цитокінів. Крім того, імуногістохімічний аналіз підтвердив, що бактеріальні везикули були здатні проникати через шкіру, досягаючи дерми, лише коли антигени вводилися у формі наноемульсії [31].

Вакцина, яка використовується для посилення імунної відповіді, зазвичай вводиться парентеральним шляхом, однак дане дослідження було спрямоване на розробку неінвазивного засобу для введення імуногенного білка та ад'юванта лектину трансдермальним шляхом [32]. Бичачий сироватковий альбумін (BSA) використовували як білкову модель, а артин-М, виділений із насіння цемпедаку (*Artocarpus integrifolia*), як ад'ювантну модель. Наноемульсія мала форму масло у воді та була виготовлена методом самонаноемульгування.

Рецептура складалася з первинної кокосової олії (VCO), Твін-80 і поліетиленгліколю (ПЕГ) 400 як масляної фази, поверхнево-активних речовин. Випробування на стабільність проводили шляхом заморожування та розморожування – чергування зберігання при кімнатній температурі та 4 °С до 6 циклів. Додавання ПЕГ 20000 у твердій дисперсії у співвідношенні 1:1 до BSA помітно підвищило ефективність захоплення BSA в масляній фазі до $98,6 \pm 0,15\%$. Артин-М, введений за тим же методом, також зберігав свою активність, з огляду на результати гемаглютинації. Випробування заморожуванням та розморожуванням показало стабільність наноемульсії, що зберігалася в холодильнику, без агрегації. Діаметр глобули підтримувався на рівні $42,7 \pm 0,9$ нм з індексом полідисперсності $0,321 \pm 0,01$ [32].

Однак клінічні випадки алергічних реакцій, спричинених допоміжними речовинами, що містять поліетиленгліколь (ПЕГ), гідрофільну молекулу, яка зазвичай використовується в препаратах/вакцинах, привернули велику увагу в останні роки. Тому у праці [33] дослідили можливість використання натуральних інгредієнтів, таких як гіалуронова кислота у формі кон'югату гіалуронова кислота-гліцин-холестерин як допоміжної речовини для виготовлення вакцини SQ@НАСН. Результати імуногенності з використанням мишачої моделі з овальбуміном (OVA) як антигеном показали, що SQ@НАСН значно посилює антиген-специфічні імунні відповіді, включаючи поляризацію антитіл IgG, секрецію цитокінів Т-клітинами та посилення цитотоксичної активації Т-лімфоцитів.

Експерименти в області комбінування трансдермальної імунізації із модифікованою наноемульсією вакциною дає всі підстави вважати, що майбутні десятиліття розробка таких вакцин вийде на етап доклінічних /клінічних досліджень.

2.3. Вакцини для інтраназального застосування

Інтраназальний спосіб введення вакцин стає все більш популярним напрямом розробки ЛЗ, оскільки дозволяє уникнути майже всіх недоліків вакцин традиційно способу введення (ін'єкційно). Класичним прикладом може слугувати класична інактивована вакцина проти грипу з розщепленими віріонами, яку вводять шляхом внутрішньом'язової ін'єкції і яка викликає сильну реакцію антитіл до штаму грипу в сироватці крові з домінуванням IgG.

Нездатність генерувати високоякісний імунний захист слизової оболонки та опосередкованими клітинами є загальновідомою слабкістю інактивованих вакцин проти грипу. Як наслідок, інактивована вакцина, що вводиться внутрішньом'язово, є менш ефективною для груп пацієнтів із ризиком розвитку важкої грипозної інфекції, таких як діти, люди похилого віку та особи з хронічними виснажливими захворюваннями. Навпаки, інтраназально доставлена доза живої вакцини проти грипу, більше нагадує природний шлях інфікування та генерує як слизові, так і системні антитіла та CD8⁺ Т-клітинну відповідь. Розширена імунна відповідь, викликана живою вакциною, дозволяє підвищити захист дітей у порівнянні з внутрішньом'язово введеними інактивованими вакцинами [13, 19, 34, 35].

Вакцини проти грипу, що орієнтовані на слизову оболонку (мішень), містять інактивовані вірусні компоненти та доставляються з ад'ювантом, є перспективним напрямом розробки, оскільки можуть викликати сильні слизові та системні захисні імунні відповіді і їх можна безпечно вводити групам пацієнтів з ослабленим імунітетом. Микозні вакцини можуть ефективно індукувати секреторний IgA на поверхнях слизових оболонок, тим самим запобігаючи або обмежуючи розповсюдження інфекції в місці проникнення

вірусу грипу. Таким чином, індукцію IgA на слизовій оболонці слід розглядати як критичний компонент ад'ювантних вакцин проти

Ефективна індукція захисного імунітету після імунізації слизової, потребує одночасного введення ад'юванта. У якості ад'юванта використовують холерний токсин або термолабільний токсин *Escherichia coli*, які мають ряд недоліків, такі як токсичність та небажані побічні реакції. Дослідження [32] демонструє приклад інактивованої мукозної вакцини, що використовувалась для вакцинації під час пандемії H1N1 A/Wisconsin/WSLN 34939/09 із використанням у якості ад'юванта наноемульсії W805EC. Наноемульсія W805EC містить загальноновизнані як безпечні матеріали, які також включені до списку неактивних інгредієнтів FDA у затверджених фармацевтичних продуктах, але не містять токсинів або біологічних імунних активаторів. Експеримент проводився на мишах [35].

Результати дослідження показали, що інтраназальна вакцина, що містить W805EC, викликала вищі титри антитіл, що інгібують сироваткову гемаглютинацію, і титри специфічних для грипу IgG та IgA у порівнянні із вакциною, що не містила у своєму складі наноемульсію у якості ад'юванта. Подібним чином, вакцина, що містить W805EC, призвели до вищих специфічних для грипу рівнів IgA в рідині бронхоальвеолярного лаважу і промивних рідинах з носа мишей порівняно з вакцинами, без наноемульсії.

Миші, імунізовані вакциною, що містить W805EC продемонстрували зниження втрати маси тіла після зараження, порівняно з мишами, імунізованим еквівалентними вакцинами, отриманими без W805EC. Загалом результати показують, що W805EC істотно покращує величину синтезу антитіл, специфічних для грипу, і є багатообіцяючим ад'ювантом для слизової оболонки для вакцин проти грипу та вакцин проти інших збудників для введення через слизову оболонку. W805EC NE є перспективним ад'ювантом для інтраназальних інактивованих вакцин проти грипу, оскільки тести не виявили здатності викликати запальні реакції та продемонстрували прийнятний профіль безпеки [35].

Інтраназальний шлях дозволяє вводити як рідкі, так і сухі вакцини. Доклінічні дослідження показали, що інтраназальні сухі порошкові вакцини (DPV) є зручним способом ініціації імунологічного захисту, і характеризуються більшою стабільністю, порівняно з рідкими вакцинами [36].

Незважаючи на те, що внутрішньом'язові вакцини високоефективні проти захворювання COVID-19, їхня ефективність проти інфекції верхніх дихальних шляхів та передачі вірусу SARS-CoV-2 у кращому випадку є тимчасовою. Тому роботі [37] присвячена використанню наноемульсійного ад'юванту (NE01) для інтраназальної доставки стабілізованого спайкового білка (S-2P) для індукції імуногенності на моделях мишей і хом'яків. Спостерігалася значна індукція імунної відповіді слизової оболонки, як продемонстрували В-клітини пам'яті, що продукують IgA та IgG у легенях тварин, які отримали інтраназальну імунізацію, порівняно з внутрішньом'язовим введенням. Результати показують, що інтраназальна вакцина з ад'ювантом NE01 сприяє захисному імунітету проти інфекції та захворювання SARS-CoV-2 шляхом активації трьох гілок імунної системи: гуморальної, клітинної та слизової.

Інфекція *Helicobacter pylori* залишається глобальною проблемою охорони здоров'я, особливо в Азії. Через появу стійких до антибіотиків штамів і складність інфекції *H. pylori* звичайна вакцинація є найкращим способом контролю захворювання. Авторами праці [38] була розроблена та виготовлена система доставки інтраназальної наноемульсії, що забезпечує високу ефективність вакцини без очевидної цитотоксичності. Виявили, що ця високостабільна система значно подовжує ефект інтраназальної вакцини проти *H. pylori* та посилює поглинання клітинами пептиду епітопу, що значно підсилює специфічні Th1-відповіді вакцини NE-P22, зменшуючи колонізацію бактерій без ад'юванту CpG.

Farazuddin зі співавторами розробили ад'ювант наноемульсії «масло у воді» (NE), який забезпечує імунітет слизової оболонки та ефективний захист від патогенних мікроорганізмів при введенні в складі інтраназальної вакцини. Продемонстровано, що інтраназальна імунізація NE опосередковано активує

активність ретинальдегіддегідрогенази (RALDH) у дендритних клітинах через активність епітеліальних клітин, а також потужні клітинні відповіді та експресію рецепторів самонаведення кишечника $\alpha 4\beta 7$ і CCR9 на Т-клітинах. При вивченні механізмів, що лежать в основі цієї активації, NE активував RALDH через MyD88-залежні шляхи в дендритних клітинах, але не активував безпосередньо рецептор ретиноївої кислоти [39].

Автори роботи [40] приділили увагу розробці ефективної вакцини проти *Staphylococcus aureus*. Було виділено рекомбінантні білки стафілококового ентеротоксину В (rSEB) і білок транспорту марганцю С (rMntC) як компоненти вакцини 2C-Staph. На основі оптимізованої технології формування наноемульсії (NE) ми створили нову ад'ювантну вакцину NE, 2C-Staph/NE. Частинки 2C-Staph/NE мали відповідний діаметр ($24,9 \pm 0,14$ нм), цілісність структури та високу термодинамічну стабільність. 2C-Staph, створений з ад'ювантом NE, викликав вищі показники виживання, ніж вакцина 2C-Staph/MF59 у моделях сепсису та пневмонії. Інтраназальна вакцинація 2C-Staph/NE спричинила сильну реакцію слизової оболонки з високим рівнем IgA та IL-17A. Загалом, інтраназальне введення 2C-Staph у складі ад'юванта NE забезпечило високий захист у моделі мишачої пневмонії *S. aureus*.

Субодиничні вакцини з підвищеною ефективністю є життєво важливими для покращення імунної відповіді проти слабких антигенів, а також сприяють збереженню дози ад'юванту та антигенів, які можуть спричинити небажані побічні ефекти. Олеїнова кислота, потенційний біоматеріал з точки зору проникнення, може бути компонентом наноемульсії для назальної вакцинації. У дослідженні [41] вивчається вплив наноемульсії олеїнової кислоти на поглинання антигену та роль в активації дендритних клітин. Умови приготування були оптимізовані для отримання стабільної наноемульсії при найнижчій концентрації ПАР – 2%. Посилення проникнення наноемульсії олеїнової кислоти було оцінено за допомогою дослідження поглинання клітинами OVA, кон'югованого флуоресцеїном ізотіоціанатом, на клітинній лінії A549. Флоуцитометричний аналіз показав підвищену експресію


активованих дендритних клітин на 45-й день порівняно з розчинним антигеном. Ці дані свідчать про те, що препарат олеїнової кислоти покращує проникнення, підтримує вивільнення антигену та стимулює як клітинну, так і гуморальну імунну відповідь.

РОЗДІЛ 3. СУЧАСНІ ПІДХОДИ У ВИРОБНИЦТВІ ВАКЦИН ПРОТИ ГЕПАТИТУ В

Гепатит В спричиняється вірусом гепатиту В (ВГВ), який вражає печінку та призводить до хронічного захворювання печінки, включаючи цироз та гепатоцелюлярну карциному. Доступні, безпечні та ефективні вакцини проти гепатиту В є найкращими інструментами, які допомагають контролювати та попереджувати розвиток гепатиту В. На 2019 рік охоплення трьома вакцинами проти гепатиту В досягло 85% у всьому світі порівняно з приблизно 30% у 2000 році [1]. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), вірусом було інфіковано більше 2 мільярдів людей. Сучасні профілактичні вакцини вимагають дотримання схеми з трьох внутрішньом'язових (внутрішньом'язових) ін'єкцій, мають 10%-15% випадків невідповіді та неефективні для обмеження реплікації ВГВ у хронічних носіїв [1].

Широкомасштабні програми вакцинації також обмежені в популяціях, що розвиваються, через проблеми з дотриманням вторинного плану вакцинації трьома дозами, вимоги до холодного зберігання та наявності стерильних голків. Це обмежує використання вакцини проти гепатиту В у цих групах, і призвело до того, що 8-10 % населення районів із Африки, Азії та Південної Америки хронічно заражені ВГВ. Пошук нової стратегії щодо вакцинації проти гепатиту В для країн, що розвиваються є пріоритетним завданням для цивілізованого світу аби зупинити розповсюдження хвороби.

Поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) є основним структурним білок ВГВ і є захисним імуногеном в експеримент тварин і людини . Гепатит В (HBs) залежні білки синтезуються як великі, середні і малі субодиниці, які самозбираються у вірусоподібні ліпідні частинки (розміром близько 22 нм).

					НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Сучасні підходи у виробництві вакцин проти гепатиту В	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Сліпчук Т.О.					36	8
Перевір.		Буценко Л.М.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Більшість комерційно доступних рекомбінантних вакцин проти HBsAg-Alu(включаючи Recombivax HB; Merck і Engerix-B; GSK) складаються з дріжджових частинок антигену HBs-S, адсорбованих на солі алюмінієвих галунів (Alu). Хоча алюмінієві галуни, як правило, добре переносяться і вважається безпечним, періодично зустрічаються повідомлення про побічні реакції.

Крім того, було показано, що галун викликає переважно поляризацію Th2 імунної відповіді, яка пов'язана з клітинним імунітетом, який є неефективним у створенні відповіді CD8 на вірусно інфіковані клітини. Оскільки клітинний імунітет має важливе значення для ефективної відповіді проти деяких інфекцій і знищення деяких вірусних патогенів, бажано розробити противірусну вакцину (вакцини), здатну індукувати клітинно-опосередкований імунітет, на додаток до надійної та тривалої відповідь антитіл. Доступні на даний момент вакцини проти гепатиту В мають схожі профілі термостабільності, які вимагають постійного підтримання стабільного холодового ланцюга (від 2°C до 8°C), щоб зберегти ефективність вакцини. Як наслідок підвищення витрат, пов'язаних з підтриманням встановленого холодового ланцюгу, від точки виробництва до точки використання, також впливає на зменшення доступності цих вакцин. Таким чином, існує гостра необхідність у розробці вакцини і протоколу вакцинації, що потребують більш широких меж температурного режиму зберігання та зменшення кількості ін'єкцій [1, 42].

У 1996 році Кузнецов та Вашев представили патент на спосіб прогнозування перебігу вірусного гепатиту В у дітей. Запропонований спосіб заключається в тому, що для визначення функціональної активності лімфоцитів оцінюють молекулярну упаковку Тх цитоплазматичної мембрани, вимірюють концентрацію метионіну у внутрішньоклітинних білках лімфоцитів I, внутрішньоклітинний вміст метионіну, не включеного в склад білків, з послідовним визначенням значення відношення вмісту метионіну в білках лімфоцитів до вмісту його в клітинах за формулою, що надає можливість

підвищити точність прогнозування протікання вірусного гепатиту В у дітей [43].

Метод консервативного лікування хронічних гепатитів представлено у патенті [44]. Цей спосіб включає базову терапію, а саме призначення дієти № 5, вітамінів, гепатопротекторів тощо. До призначення базової терапії проводять дезінтоксикаційну терапію ентеросорбентом Білосорб (Карболайн) по 5 таб. 2 рази на день після їжі; у базову терапію додатково включають комплексні антигомотоксичні препарати, які призначають поетапно при загальному курсі лікування 1 місяць.

Спосіб, наведений у патенті [45], присвячений розробці лікування вірусного гепатиту В на тлі наркоманії та може бути використаний в наркології. Дана методика включає лікування гострого вірусного гепатиту, що включає введення лікарських засобів, і черезшкірне опромінення печінки інфрачервоними променями. Черезшкірне опромінення печінки здійснюється в безперервному режимі генерації протягом 2,9-3,1 хв, послідовно з чотирьох полів, одночасно з опроміненням крові протягом 29-31 хв, за умови, що при опроміненні печінки довжина інфрачервоних променів відповідає 0,82-0,84 мкм, а густина потужності 14-18 кВт/см²; при опроміненні крові довжина променів становить 0,61-0,64 мкм, густина потужності 6-9 мВт/см². Так, шляхом поєднаного зовнішнього інфрачервоного опромінення печінки і внутрішньовенного опромінення крові, в сукупності з оптимізацією режимів виконання прийомів, досягаються результати терапії гострого вірусного гепатиту В на тлі наркоманії, а саме, зниження впливу вірусу на імунну систему.

Інші українські дослідники присвятили свою роботу розробці схеми лікування гломерулонефриту з нефротичним синдромом та реплікативною фазою вірусного гепатиту В у дітей [46]. Одним з факторів, обтяжуючих прогноз захворювання, є наявність супутнього інфікування хворого вірусом гепатиту В (HBV), вірогідність якого при гломерулонефриті зростає втричі в порівнянні з середньо популяційним рівнем. Печінкова патологія у випадку

поєднання гломерулонефриту з HBV інфекцією, як правило, має прихований перебіг, але суттєво впливає на плин та прогноз ниркової патології. Розроблений спосіб включає застосування противірусного препарату – Біциклोल перорально в дозі 50 мг на добу протягом 6 місяців, додатково одночасно продовжують лікування гломерулонефриту з нефротичним синдромом глюкокортикоїдами.

Інші вітчизняні науковці представили свою працю, що стосується методу лікування гострого вірусного гепатиту В жовтяничної форми [47]. Сутність даної розробки полягає у призначенні дієти, дезінтоксикаційної терапії, вітамінів, ентеросорбентів і холекінетиків, з додатковим застосуванням препарату Стимол перорально курсом 7-10 днів. Препарат дозволений до застосування - реєстраційне посвідчення МОЗ України №014154/01. Застосування запропонованого способу дозволяє зменшити об'єм інфузійної терапії, скоротити тривалість застосування глюкокортикостероїдів та інших препаратів.

Однак у вітчизняній літературі наведено й відомості щодо розробки та досліджень у напрямку одержання вакцини проти гепатиту, зокрема й гепатиту В. Варто відмітити, що такі дані дуже небагаточисельні, дослідження стосуються як дослідження вакцин для тварин [48, 49], так і для людей [50].

Отриманню вакцини «Овісан» присвячений патент українських вчених [48]. Вакцина "Овісан" асоційована інактивована концентрована призначена проти брадзоту, злякисного набряку, некротичного гепатиту, дизентерії ягнят і анаеробної ентеротоксемії овець. Вакцина "Овісан" характеризується високою специфічною ефективністю і не має обмежень для застосування, забезпечує одночасно формування імунітету проти вищезазначених захворювань тварин, в тому числі і гепатиту.

Вакцинний штам VNb-1 *Clostridium novyi* (тип В) було використано для виготовлення полівалентної концентрованої гідроксид-алюмінієвої формолвакцини проти брадзоту, інфекційної ентеротоксемії, некротичного гепатиту, злякисного набряку овець і дизентерії ягнят [49]. Штам має високу

антигенність. Імуногенні властивості: забезпечує захист щеплених лабораторних тварин проти зараження летальними дозами контрольного штаму. Стабільність імуногенних та антигенних властивостей штаму і типових для *Clostridium novyi* (тип В) морфологічних ознак і тинкторіальних, культуральних, біохімічних та антигенних властивостей дозволяє використовувати його для виробництва зазначеної полівалентної концентрованої гідроксид-алюмінієвої формолвакцини.

Також у базі патентів України налічується патент [50], в якому описано спосіб одержання комплексної вакцини. Даний винахід представляє комбінований склад вакцини, що включає поверхневий антиген гепатиту В, адсорбований на фосфаті алюмінію, та антигени, адсорбовані на фосфаті алюмінію або гідроксиду алюмінію та вибрані з числа антигенів, що забезпечують імунітет проти одного або більше наступних вірусів, а саме: дифтерії, правця та кашлюку, а також убитої полівакцини, епідемічного грипу "б", гепатиту А та В. Автори зазначили, що таким чином були зроблені перші кроки до одержання стабільної та ефективною мультивалентної вакцини, що включає поверхневий антиген гепатиту В.

Мікозальна імунізація є привабливою альтернативою, оскільки вона може створити як системний імунітет, так і імунітет слизової оболонки та відпадає потреба у суворому дотриманні протоколу послідовності та частоти ін'єкцій. Однак розробка мукозальних вакцин обмежена низькою кількістю ефективних мукозальних ад'ювантів. Під час оцінки науковці обрали кілька потенційних ад'ювантів слизової оболонки для вакцин проти гепатиту В, включаючи рекомбінантний холерний токсин (ХТ), ліпідні мікрочастинки, СrG олігонуклеотиди, катіонні частинки, мікросфери PLG чи hepatitis B core antigen (HBcAg) – проте жоден не зміг показати хорошу ефективність та безпечність, а використання ХТ на людях обмежено через те, що він може викликати запалення ЦНС.

На жаль, ін'єкційну вакцину проти гепатиту В з СrG олігонуклеотидами нещодавно було призупинено через запальні проблеми у пацієнта, що ще

більше поставило під сумнів безпеку прозапальних ад'ювантів. Жоден інший ад'ювант, за винятком HBsAg, навіть не був протестований у клінічних дослідженнях. Це підкреслює потребу в пошуку нових нетоксичних ад'ювантах для слизової оболонки [35, 36]. На наступному етапі, було вирішено протестувати у якості ад'юванту наноемульсію W805EC (HE), що була виготовлена емульгуванням цетилпіридинію хлориду (1 %), Tween 80 (5%) та етанолу (8%) у воді із соєвою олією (64%) з середнім розміром краплі близько 400 нм у діаметрі. Наноемульсія стабільна протягом 3 роки при 25°C. Гуморальна та клітинно-опосередкована імунна відповідь на оптимізовану вакцину HBsAg-NE характеризували *in vivo* на мишах [42].

Інтраназальна вакцинація HBsAg-NE або в/м. ін'єкція HBsAg-Alu призвела до порівнянно однакових високих рівнів сироваткових антитіл IgG до HBsAg, що досягають титрів від 10⁵ до 10⁶ протягом 8 тижнів після первинної вакцинації. Обидві вакцини HBsAg-NE і HBsAg-Alu викликали еквівалентну стійку імунну відповідь із сироватковими кінцевими титрами антиHBsAg IgG від 10⁴ до 10⁵, які зберігалися до 6 місяців після вакцинації.

Аналіз сироваткової авідності IgG проти HBsAg через 23 тижні вказав на значно вищу авідність антитіл у тварин, імунізованих HBsAg-NE, порівняно з IgG мишей, вакцинованих HBsAg-Alu. Хоча загальні титри були еквівалентними, аналіз підкласу IgG сироватки показав, що вакцинація HBsAg-NE виробляла анти-HBsAg IgG з перевагою IgG2b (і IgG2a) над антитілами підкласу IgG1, тоді як вакцина HBsAg-Alu продукувала переважно антитіла підкласу IgG1. Це свідчить про відповідь Th1 на вакцину на основі HE проти традиційної відповіді Th2, пов'язаної з алюмінієвим галуном [42].

Як показали результати дослідження, імунітет до HBsAg в обох вакцинах ідентичний, що свідчить про взаємозамінність цих вакцин. Перевагою назальної вакцини на основі наноемульсії є простота введення в організм, відсутність ад'юванту запалення. Ще одна перевага HBsAg-NE - стабільність. Екзотермічна реакція при змішуванні асоціації антиген-ліпід свідчить про те, що суміш більш стабільна, ніж білок у водному розчині, враховуючи негативну

зміну теплоємності (C_p) і тому, що частинки HBsAg містять 20% ліпідів. Аналіз розміру часточок за допомогою лазерної дифракції та вимірювання зета-потенціалу показало, що краплі катіонної ліпідної фази HE зв'язуються із HBsAg та залишаються однорідними за розміром та стабільними у широкому діапазоні концентрацій та температурних умов. Це вказує на те, що фізична асоціація HBsAg з ліпідною фазою HE забезпечує стабільність антигену, а також сприяє ад'ювантній здатності HE [42].

Крім вищезазначеного, у доступних джерелах наявний патент, що описує винахід, який забезпечує імуногенні композиції та способи їх використання для індукції імунних відповідей (наприклад, захисного імунітету) проти вірусу гепатиту В (HBV). Композиції та способи цього винаходу знаходять застосування у клінічній (терапевтична та профілактична медицина – вакцинація) та дослідницькій галузі. Композиція містить наноемульсію та антиген вірусу гепатиту В (HBV), причому наноемульсія містить водну фазу, масляну фазу (соєва олія) та розчинник [51].

У дослідженні [52] наноемульсії твердого жиру, навантажені рекомбінантним поверхневим антигеном гепатиту В у якості система-носія і монофосфорилліпід А в якості системи ад'ювант-носії, були підготовлені та оцінені як мультиад'ювантна система для глибокої легеневої вакцинації. Гуморальна (sIgA та IgG) та клітинна (IL-2 та IF- γ) імунні відповіді виявилися значними у порівнянні з розчином контрольного антигену (рекомбінантного поверхневого антигену без допоміжної речовини). Дані вказують на те, що глибока легенева імунізація забезпечує сильнішу імунну відповідь із збалансованою гуморальною, слизовою та клітинною імунізацією, що потребує додаткової перевірки на вищих тваринах [52].

Отже, узагальнюючи всю зазначену інформацію, можна підсумувати, що розробка та проектування нанотехнологій для емульсійних систем стали критичним параметром для регулювання та/або покращення терапевтичної біодоступності ліків. Наноемульсії набувають популярності в ролі носіїв лікарських засобів для покращення доставки активних фармацевтичних

інгредієнтів, оскільки вони забезпечують ряд переваг для фармацевтичної доставки. Оскільки профілактичні міри є більш ефективним підходом у боротьбі з рядом захворювань, у порівнянні з лікуванням, наноемульсії є багатообіцяючим методом доставки вакцин. Вакцини на основі наноемульсій сприяють запобіганню передачі вірусу та розвитку важких ускладнень.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

ВАКЦИНИ ПРОТИ ГЕПАТИТУ В

4.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Склад вакцини проти гепатиту В на основі наноемульсії: діюча речовина – HBsAg; доза вакцини 1,0 мл містить 20 мкг HBsAg; доза вакцини 0,5 мл містить 10 мкг HBsAg.


Допоміжні речовини – наноемульсія (цетилпіридиній хлорид – 10 г/л, полісорбат (Твін-80) – 50 г/л, етанол – 80 г/л, соєва олія – 640 г/л, вода очищена, натрій-фосфатний буфер) [53].

Лікарська форма: суспензія для інтраназального введення.

Упаковка: по 1 мл в скляний флакон з розпилювачем.

Фармакологічні властивості вакцини проти гепатиту В та галузь її використання розглянемо на прикладі вакцини для профілактики вірусного гепатиту В, Енджерікс-В, оскільки мукозальна вакцина на основі наноемульсії знаходиться поки що на стадії розробки.

Енджерікс-В представляє собою стерильну суспензію, що містить очищений основний поверхневий антиген вірусу, одержаний за допомогою технології рекомбінантної ДНК та адсорбований на гідроксиді алюмінію. Антиген виділяють із культури дріжджових клітин, у яких є ген, що кодує основний поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg). Цей поверхневий антиген дріжджових клітин ретельно очищають за допомогою декількох фізико-хімічних методів, що застосовуються послідовно [54].

					НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сліпчук Т.О.			РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування вакцини проти гепатиту В	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					44	9
Реценз.						Кафедра БТМ 4		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Механізм дії: потрапляючи в кров, антиген гепатиту В викликає утворення антитіл до даного вірусу. При цьому виникає специфічний імунітет до даної інфекції. У здорових немовлят, яких прищеплюють при народженні, в місяць і в півроку, стійкий імунітет до гепатиту В визначається в семимісячному віці [54].

4.2. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

На світовому ринку вакцин протягом тривалого часу домінують великі біофармацевтичні компанії Sanofi (Франція), Merck (США), Sanofi Pasteur (спільне підприємство Sanofi і Merck), GlaxoSmithKline (Великобританія), Pfizer (США), Novartis (Швейцарія), які отримують значний прибуток від продажів вакцин. Лідуючі позиції займають Merck & Co – 5,77 млрд дол., Sanofi – 5,52 млрд дол., GlaxoSmithKline – 5,35 млрд дол. На їх частку припадає майже 2/3 світових продажів вакцин. Нижче Pfizer – 3,97 млрд дол., Novartis – 1,42 млрд дол. [55].

На території України доступні до застосування кілька вакцин, серед яких є препарати як вітчизняного виробництва (наприклад, Ваксиген НВ), так і зарубіжного (наприклад, Енджерікс В, Еувакс В, Твінрікс) [56].

Таблиця 4.1

Вакцини проти гепатиту В, що представлені на ринку України

Назва лікарського засобу	Тип вакцини	Виробник
Еувакс В	Рекомбінантний HBV, HBsAg 2-го покоління	ЕлДжі Лайф Сайенсіс Лтд., Корея
Енджерікс В	Рекомбінантний HBV, HBsAg 2-го покоління	ГлаксоСмітКляйн, Бельгія
Ваксиген НВ	Рекомбінантний HBV, HBsAg 2-го покоління	ПАТ «Фармак», Україна ЕлДжі Лайф Сайенсіс Лтд., Корея
Твінрікс	Гепатит А і В – комбінована вакцина	ГлаксоСмітКляйн, Бельгія

Окрім профілактичних вакцин, що представлені на території України, для лікування хронічної форми вірусу гепатиту В використовують препарати інтерферону- α або аналоги нуклеозидів та нуклеотидів. В даний час для

лікування хронічної форми вірусного гепатиту В зареєстровано 3 аналога нуклеозидів (ламівудин, телбівудин і ентекавір) і 2 аналога нуклеотидів (адефовір і тенофовір). В Україні можна придбати такі препарати для лікування гепатиту В (див. табл. 4.2) [57].

Таблиця 4.2.

Препарати для лікування гепатиту В, що представлені на ринку України

Назва лікарського засобу	Діюча речовина/ Лікарська форма	Виробник
Пегінтрон	Пегінтерферон альфа-2b/ Порошок ліофілізований для ін'єкцій	Шерінг-Плау Лабо Н.В., Бельгія
Альфаферон	Інтерферон альфа людини/ Розчин для ін'єкцій	Альфа Вассерманн С.п.А., Італія
Роферон-А	Інтерферон альфа-2a/ Розчин для ін'єкцій	Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцарія
Зеффікс	Ламівудин/ Розчин оральний	ГлаксоСмітКляйн Інк., Канада
Бараклюд	Ентекавір/ Таблетки, вкриті плівковою оболонкою	Брістол-Майерс Сквибб Компані, США
Себіво	Телбівудин/ Таблетки, вкриті плівковою оболонкою	Новартіс Фарма Штейн АГ, Швейцарія

Незважаючи на досягнення в області противірусної терапії, первинна профілактика шляхом вакцинації відіграє все таки ключову роль в збереженні здоров'я населення і є більш економічна. Завдяки успішним програмам вакцинації епідеміологія хвороби вірусу гепатиту В змінюється [58].

4.3. Розрахунок потреби населення у субстанції для випуску вакцини проти гепатиту В на основі наноемульсії

Гепатит — це захворювання печінки запального характеру, як правило, вірусного походження [59].

Гепатит В і С — два основних типи з п'яти різних інфекцій гепатиту — є причиною 96% всіх випадків смерті від гепатиту. Близько 325 млн людей у світі живуть з хронічною інфекцією, спричиненою вірусом гепатиту В або вірусом гепатиту С.

Шляхи передавання гепатиту В:

- від матері до дитини під час народження;
- незахищені статеві контакти;
- небезпечні медичні та інші маніпуляції, пов'язані з контактом з кров'ю (татування, пірсинг тощо);
- використання нестерильного ін'єкційного інструментарію при вживанні наркотиків.

Гепатит В є небезпечним і для працівників охорони здоров'я, які можуть мати травми від уколів голками при догляді за пацієнтами, інфікованими ВГВ.

Найкращий та найбільш ефективний спосіб попередження інфікування ВГВ — це вакцинація [59].

Вакцинація груп ризику

1) Цільові групи (базуються на фінських національних рекомендаціях; додаткові цільові групи розглядаються) [60]

- Новонароджені, чиї батьки є HBsAg позитивними. Якщо мати є носієм, до першої вакцинації дитині також слід ввести дозу імуноглобуліну проти гепатиту В (125 МО).
- Особи, які живуть з носіями HBsAg або з пацієнтами з гострим гепатитом В
- Сексуальні партнери носіїв HBsAg та сексуальні партнери пацієнтів з гострим гепатитом В
- Люди з порушенням гемостазу, які потребують постійного лікування препаратами крові
- Особи, які зловживають внутрішньовенними наркотиками, їхні сексуальні партнери та інші люди, які проживають в спільному помешканні. Особливо важливо вакцинувати новонароджених дітей, матері яких вводять наркотики внутрішньовенно.
- Особи, які займаються проституцією.

- Після пошкоджень від уколу голкою та контакту з кров'ю, коли згідно з оцінкою ризику, необхідне проведення профілактики, і цей випадок не можна віднести до професійних хвороб.
- Працівники охорони здоров'я, які планують працювати в ендемічних зонах.

2) Вакцинація проти гепатиту В також може розглядатися в окремих випадках для осіб, які через свою роботу мають підвищений ризик контакту з кров'ю. Вакцинація може також розглядатися для тих, хто доглядає за такою особою. Наприклад [60]:

- Акушерки, хірурги-стоматологи та певний персонал лабораторій.
- Персонал, який працює у відділенні діалізу та лікує пацієнта, який є носієм HBsAg. Інші пацієнти в цьому відділенні.
- Персонал центру догляду за дітьми, який опікується дитиною, яка є носієм HBsAg. Інші діти в цьому центрі.
- Будь-хто залучений у догляд за наркозалежними, які вводять наркотики внутрішньовенно.

3) Введення вакцини

- Вакцина проти гепатиту В 1,0 мл в/м. (0,5 мл для дітей).
- Дозу повторюють через 1 і 6 місяців. Після успішної первинної вакцинації ревакцинація зазвичай не потрібна.
- Приблизно в 10% вакцинованих не розвивається достатній імунітет. Якщо ризик контакту з вірусом є високим та тривалим, наявність імунітету слід підтверджувати серологічно приблизно через 2 місяці після третьої ін'єкції. Якщо немає відповіді з боку антитіл, дають три додаткові дози з інтервалом у два місяці, а наявність імунітету підтверджується серологічно приблизно через 2 місяці після третьої ін'єкції. Якщо все ще немає відповіді антитіл, ризик контакту слід знизити, наприклад, змінивши місце роботи [60].

Отже, вакцинація від гепатиту В – надійний захист від інфекції. Вона дозволяє створити стійкий імунітет, який захистить медичних працівників у разі потрапляння у контакт з інфікованим матеріалом. Це особливо важливо в умовах поширення інфекцій, коли важко передбачити можливість контакту з хворими на гепатит В.

Безпека пацієнтів також залежить від вакцинації медичних працівників. Інфікований медичний персонал може стати джерелом передачі вірусу іншим пацієнтам, що призводить до поширення хвороби в медичній установі. Тому вакцинація є не лише заходом особистої безпеки, але й відповідальністю перед пацієнтами та колегами [61].

Таким чином, запропоновано використовувати вакцину проти гепатиту В для імунізації працівників медичних закладів, зважаючи на підвищений ризик їх інфікування.

Так, кількість медпрацівників (лікарів, середнього та молодшого персоналу (без фармацевтів)) в Електронній системі охорони здоров'я (ЕСОЗ) станом на 1 січня 2023 року зросла до 325 578 осіб [62].

Отже, 325 578 осіб буде цільовою групою забезпечення вакциною, отриманою з використання мпродучента білка *Pichia pastoris* GS115-SS1S2 як основи вакцини проти гепатиту В. Це особливо важливо в умовах війни, адже під час надання медичної допомоги пораненому, який може не знати про своє інфікування вірусом гепатиту В, медпрацівник також знаходиться під значним ризиком зараження.

Відповідно до історичних передумов, люди народжені до 2000 року в Україні не отримували щеплення проти гепатиту В за Національним календарем профілактичних щеплень. Схема вакцинації для дорослих складає 3-ох дозовий курс. Першу дозу вводять у вибраний день, другу - через місяць, а третю - через 6 місяців після першої дози [63].

Доза вакцини Енджерікс-В суспензія д/ін. складає 1,0 мл і містить 20 мкг HbsAg [64].

Якщо 1 людині на рік вводять 3 мл вакцини, то для вакцинації 325 578 осіб загальна кількість вакцини становитиме:

$$325\,578 \times 3 = 976\,734 \text{ мл}$$

Якщо в складі 1 мл міститься 20 мкг антигену (поверхневого білку), то у складі 976 734 мл вакцини сумарно знаходиться така кількість білка-антигена:

$$\frac{976\,734 \times 20}{1} = 19\,534\,680 \text{ мкг}$$

Приймаємо, що вакцину власного виробництва будемо постачати за кордон.

На даний момент у Польщі практикує 178 373 лікарів, з них 37 885 – це дантисти та 447 – лікарі, що мають статус лікаря та лікаря-дантиста. Найбільше лікарів трудиться в Мазовецькому воєводстві – 30 674 лікарі [65].

Для забезпечення 30 674 лікарів загальна кількість вакцини становитиме:

$$30\,674 \times 3 = 92\,022 \text{ мл}$$

Тоді у складі 92 022 мл вакцини сумарно знаходиться така кількість білка-антигена:

$$\frac{92\,022 \times 20}{1} = 1\,840\,440 \text{ мкг}$$

Підсумуємо розрахункові значення білка:

$$19\,534\,680 + 1\,840\,440 = 21\,375\,120 \text{ мкг}$$

Таким чином, річна потреба у білку вакцини проти гепатиту В для щеплення медпрацівників в Україні та Мазовецькому воєводстві Польщі становить 21 375 120 мкг або 21,375 г антигену. Оскільки відсутній опис та склад вакцини проти гепатиту В, розрахунок балансу виділення слід вести по абсолютно сухому антигену.

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

Відповідно до ТЕО 1 людині на рік вводять 3 дози вакцини, то для вакцинації 325 578 осіб загальна кількість вакцини становитиме:

$$325\,578 \times 3 \text{ дози} = 976\,734 \text{ доз}$$

Назальна нановакцина проти гепатиту В складається із поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в ад'юванті наноемульсії і є ефективною при меншій кількості введення. Наноемульсія виготовлена з поверхнево-активних речовин, води очищеної, соєвої олії та етанолу в якості розчинника [53].

Річна потреба в антигені, згідно ТЕО складає, $G_{ар} = 21$ г/рік. Відповідно до АНД одна доза нановакцини включає $G_{ар1} = 20$ мкг HBsAg в ад'юванті наноемульсії, склад якої представлено в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Склад нановакцини проти гепатиту В на основі наноемульсії

Компоненти нановакцини	Вміст компонентів, %	Кількість компонентів в 1 дозі (8 мкл), мкл
Цетилпіридиній хлорид	1	0,08
Полісорбат (Твін-80)	5	0,40
Етанол	8	0,64
Соєва олія	64	5,12
Вода очищена	12	0,96
Наноемульсія	90	7,20
HBsAg, мкг АСР (АСБ)	0,25	0,02
Натрій-фосфатний буфер	9,75	0,78
Нановакцина	100	8,00

Загальна кількість доз

$$N_{\text{доз}} = \frac{G_{ар} \cdot 1000}{G_{ар1}} = \frac{21 \cdot 1000}{0,02} = 1\,050\,000 \text{ доз}$$

Кількість доз у серії, при кількості серій $n_c = 12$

$$N_{\text{дозс}} = \frac{N_{\text{доз}}}{n_c} = \frac{1\,500\,000}{12} = 67\,500 \text{ доз}$$

Кількість вакцини на 1 серію $V_{\text{вк}} = 67500 \times 0,008 \text{ мл} = 540 \text{ мл}$

Враховуючи втрати нановакцини при її приготуванні $E_{\text{ем}} = 1\%$ та розливі у спрей-флакони $E_p = 1\%$ кількість компонентів нановакцини на 1 серію складе 551 мл.

Кількість компонентів нановакцини на серію


Компоненти наноемульсії	%	Кількість компонентів в 1 дозі (8 мкл), мкл	Кількість компонентів на серію з врахуванням втрат, мл
Цетилпіридиній хлорид	1	0,08	5,5
Полісорбат (Твін-80)	5	0,40	27,6
Етанол	8	0,64	44,1
Соева олія	64	5,12	352,6
Вода очищена	12	0,96	66,1
Наноемульсія	90	7,20	495,9
HBsAg, г АСР (АСБ)	0,25	0,02	1,38
Натрій-фосфатний буфер	9,75	0,78	53,72
Антиген	10	0,80	55,10
Вакцина	100	8,00	551,0

**РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
БІОСИНТЕЗУ СУБСТАНЦІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
ОДЕРЖАННЯ АНТИГЕНУ ТА ЛЗ**

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

Зараження вірусом гепатиту В залишається важливою глобальною проблемою сьогодення та завданням служб охорони здоров'я, незважаючи на наявність багатьох профілактичних вакцин. За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), вірусом інфіковано більше 2 мільярдів людей. Широкомасштабні програми вакцинації також обмежені в країнах, що розвиваються, через проблеми з дотриманням вторинного плану вакцинації шляхом введення трьох доз вакцини, вимоги до низьких температур зберігання та наявності стерильних матеріалів. Це обмежує використання вакцини проти гепатиту В у цих країнах і є частковою причиною того, що 8-10% населення в регіонах Африки, Азії та Південної Америки є хронічно інфікованими вірусом гепатиту В. Хронічна інфекція підвищує ризик розвитку цирозу печінки, гепатоцелюлярної карциноми та інших супутніх ускладнень, що призводить до збільшення смертності. Тому ефективна вакцинація є вирішенням даної проблеми [53].

Поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) є основним структурним білком і є захисним імуногеном. Поверхневі білки гепатиту В синтезуються у вигляді великих (L), середніх (M) і малих (S) субодиниць оболонки, які самостійно збираються у вірусоподібні ліпідні закріплені частинки (розміром близько 22 нм). Більшість комерційно доступних рекомбінантних вакцин проти HBsAg (включаючи Recombivax HB; Merck і Engerix-B; GSK) складаються з дріжджових частинок антигену, адсорбованих на ад'юванті солі алюмінію (алюмокалієвий галун) [53].

					НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Сліпчук Т.О.				РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми одержання антигену та ЛЗ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Буценко Л.М.						53	15
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Так, автори праці [66] використовуючи нещодавно розроблену систему на основі *Pichia pastoris* FHL1, продемонстрували виробництво модельного антигену гепатиту В. Маніпуляції з бактеріальною рекомбінантною ДНК проводили у штамі *Escherichia coli* NEB 5- α . Штами *P. pastoris* FHL1 культивували в дріжджовому пептон-декстрозному середовищі – 2% казеїнового пептону, 1% дріжджового екстракту та 2% декстрази.

Японські вчені дослідили технологію отримання рекомбінантної вакцини з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [67]. Послідовність ДНК, що кодує поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg), була поміщена під контроль репресованого промотора кислоти фосфатази дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у плазміді, здатній до автономної реплікації як у дріжджах, так і в *Escherichia coli*. Мінімальне середовище Беркхолдера, збагачене гістидином (20 мг/літр), використовували для приготування цільового поживного середовища з високим рівнем фосфору (1,5 г KH_2PO_4 на літр) [67, 68].

Підготовка та імуногенність нової вакцини проти гепатиту В, що містить епітопи preS1, preS2 і S, описано в дослідженні [69]. Штам *Pichia pastoris* GS115-SS1S2, що містить дві генні конструкції білка гепатиту В SS1 і SS2, культивували у мінеральному середовищі з гліцерином. Рівня експресії білка 600 мг/л було досягнуто шляхом індукції метанолом протягом 72 годин.

Але оскільки дослідники використовували різні поживні середовища, що прямо впливає на економічність виробництва, необхідно також здійснити аналіз їх вартості (таблиця 5.2), а також врахувати співвідношення основних показників синтезу до економічних факторів виробництва білка для одержання вакцини проти гепатиту В – таблиця 5.3.

Таблиця 5.1

Порівняння синтезувальної здатності продуцентів білка як основи вакцини проти гепатиту В

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація білка, мкг/мл (мг/л)	Умови культивування	Література
<i>Pichia pastoris</i> FHL1	Казеїновий пептон - 20, дріжджовий екстракт – 10, декстроза – 20.	68	Час - 12 год, температура 30 °С, швидкість обертів 200 об/хв	Spice, A. J., Aw, R., Bracewell, D. G., & Polizzi, K. M. (2020). Synthesis and Assembly of Hepatitis B Virus-Like Particles in a <i>Pichia pastoris</i> Cell-Free System. <i>Frontiers in bioengineering and biotechnology</i> , 8, 72. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00072
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH22pho8O	Глюкоза – 40, поліпептон – 10, дріжджовий екстракт – 5, КН ₂ РО ₄ – 1,5, MgSO ₄ x 7H ₂ O – 2, аспарагін – 2, гістидин - 0,02.	3,4	Час - 72 год, температура 30 °С, за наявності аерації	Miyano-hara, A., Toh-e, A., Nozaki, C., Hamada, F., Ohtomo, N., & Matsubara, K. (1983). Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> , 80(1), 1–5. https://doi.org/10.1073/pnas.80.1.1 .
<i>Pichia pastoris</i> GS115-SS1S2	Гліцерин – 40, фосфорна кислота (85%) - 26,7 мл, СаSO ₄ x 2H ₂ O - 0,93 , K ₂ SO ₄ - 18,2, MgSO ₄ x 7H ₂ O – 14,9, KOH – 4,13, CuSO ₄ x5H ₂ O – 6,	600	Час - 72 год, температура 30 °С, в умовах аерації	TAN, C., YUAN, J., JIN, O., JIANG, L., & HU, B. (2007). Preparation and Immunogenicity of a <i>Pichia pastoris</i> -derived Hepatitis B Vaccine Containing PreS1, PreS2, and S Epitopes. <i>Chinese</i>

	<p>NaI – 0,08, MnSO₄ x H₂O – 0,08, Na₂MoO₄·2H₂O – 0,2, H₃BO₃ – 0,02, CoCl₂ – 0,5, ZnCl₂ – 20, FeSO₄ x 7H₂O – 65, біотин - 0,2, сірчана кислота - 5,0 мл.</p>			<p><i>Journal of Biotechnology</i>, 23(4), 700–703. doi:10.1016/s1872- 2075(07)60046-6</p>
--	---	--	--	--

Таблиця 5.2.

Аналіз вартості поживних середовищ для отримання вакцини проти гепатиту В

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації*
<i>Pichia pastoris</i> FHL1	Казеїновий пептон - 20	1 143,9	22,87	1
	дріжджовий екстракт – 10	1800	18	2
	декстроза – 20	10	0,22	3
	Вартість 1 л середовища = 41,07 грн			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> АН22pho8O	Глюкоза – 50	10	0,5	3
	поліпептон – 10	953,25	9,53	4
	дріжджовий екстракт – 5	1800	9	2
	КН ₂ РО ₄ – 1,5	52	0,07	5
	МgSO ₄ x 7H ₂ O – 2	19,5	0,04	6
	аспарагін – 2	690	1,38	7
	гістидин - 0,02	495,69	0,001	8
Вартість 1 л середовища = 20,52 грн				
<i>Pichia pastoris</i> GS115-SS1S2	Гліцерин – 40	37,5	1,5	9
	фосфорна кислота (85%) - 26,7 мл	85	2,2	10
	CaSO ₄ x 2H ₂ O - 0,93	14,4	0,01	11
	K ₂ SO ₄ - 18,2	48,6	0,88	12
	MgSO ₄ x 7H ₂ O – 14,9	19,5	0,29	6
	КОН – 4,13	67	0,27	13
	CuSO ₄ x5H ₂ O – 6	73	0,43	14
	NaI – 0,08	76,26	0,006	15
	MnSO ₄ x H ₂ O – 0,08	39	0,003	16
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O – 0,2	475	0,09	17
	H ₃ BO ₃ – 0,02	70,8	0,001	18
	CoCl ₂ – 0,5	570	0,28	19
	ZnCl ₂ – 20	54	1,08	20
	FeSO ₄ x 7H ₂ O – 65	26	1,69	21
	біотин - 0,2	580	0,116	22
	сірчана кислота - 5,0 мл	30	0,15	23
	Вартість 1 л середовища = 8,99 грн			

Примітка *(ціни наведено станом на січень 2024 р. при курсі долара 38,13 грн):

- 1 - https://www.alibaba.com/product-detail/High-Quality-Casein-Peptide-Powder-Best_1600978278034.html?spm=a2700.pc_countrysearch.main07.62.295f56677u4Sxl ,
- 2 - <https://kreon-d.com.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>
- 3 - <https://uhtrade.com.ua/ru/dekstroza-monohidrat-optom/>
- 4 - <https://b2bmap.com/products/polypeptone>
- 5 – <https://kreon-d.com.ua/ua/p1069040022-monokalijfosfat.html>

- 6 - <https://himfarminvest.com.ua/magniya-sulfat>
- 7 - <https://flagma.ua/asparagin-o14303989.html>
- 8 - https://www.alibaba.com/product-detail/Hot-Selling-L-histidine-Hcl-Amino_1600983036481.html?s=p
- 9 - <https://www.glicerin.com.ua/product/hlitseryn-dystylovanyj-tekhnichnyj-nalyv/>
- 10 - <https://ukrhim.com.ua/ua/p592740465-ortofosfornaya-kislota-pischevaya.html>
- 11 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-kaltsij-sirchanokyslyj-kaltsiyu-sulfat-2-vodnyj>
- 12 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-kalij-sirchanokyslyj>
- 13 - <https://kreon-d.com.ua/ua/p667850115-kalij-gidrookis.html>
- 14 - <https://megachem.com.ua/ua/sulfat-medi-kormovaya.html>
- 15 - https://www.alibaba.com/product-detail/Sodium-Iodide-Cas-7681-82-5_1601009738202.html?s=p
- 16 - <https://megachem.com.ua/sulfat-marganca.html>
- 17 - <https://soda.kiev.ua/ua/p504995405-molibdat-natriya.html>
- 18 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-borna-kyslota>
- 19 - <https://soda.kiev.ua/ua/p25769782-kobalta-hlorid-och.html>
- 20 - <https://selitra.biz/uk/p221231412-cink-hloristij.html>
- 21 - <https://prom-pg.com.ua/ua/p513547725-zheleznyj-kuporos-sulfat.html>
- 22 - <https://selitra.biz/p616276564-vitamin-biotin.html>
- 23 - <https://akvorovno.all.biz/uk/sirchana-kyslota-gg1078224>

За результатами розрахунків з таблиці 5.2, найдорожчим є середовище культивування *P. pastoris* FHL1, удвічі меншу вартість має середовище вирощування *S. cerevisiae* АН22rho8O. Але набагато дешевшим поміж представлених виявилось поживне середовище для штаму *P. pastoris* GS115-SS1S2.

На заключній стадії порівняємо економічні фактори з показниками синтезу білків для одержання вакцини. Дані представлено у таблиці 5.3.

**Порівняння співвідношення основних показників для отримання
вакцини проти гепатиту В**

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація білка, мкг/мл (мг/л)	Умовна вартість 1 мкг білка, грн/мкг	Час, год	Кількість синтезованого білка за годину, мкг/год
<i>Pichia pastoris</i> FHL1	41,07	68	0,6	12	5,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH22pho8O	20,52	3,4	6,03	72	0,04
<i>Pichia pastoris</i> GS115-SS1S2	8,99	600	0,015	72	8,3

Так, дивлячись на дані таблиці 5.3, можна підсумувати, що для біологічного агента *P. pastoris* GS115-SS1S2 показник умовної вартості 1 мкг білка виявився найнижчим, а кількість синтезованого білка за годину – найвищою, на відміну від значень цих ключових факторів для інших продуцентів.

Тому найкращим продуцентом білка як основи вакцини проти гепатиту В є штам *P. pastoris* GS115-SS1S2.

**5.2. Обґрунтування стадій виділення і очищення субстанції для
виробництва вакцини**

Виділення та очищення поверхневого антигену вірусу гепатиту В включає такі етапи:

- Відділення дріжджових клітин від культуральної рідини
- Руйнування клітин та отримання екстракту, що містить HBsAg
- Освітлення екстракту та отримання супернатанту
- Очищення супернатанту та розділення на фракції HBsAg
- Концентрування фракцій HBsAg та отримання концентрованого розчину
- Остаточне очищення розчину та об'єднання фракцій, що містять цільовий білок

Вибір способу відділення дріжджових клітин від культуральної рідини

Першою стадією є відділення клітини продуцента від культуральної рідини.

Основними методами відділення клітин є:

- фільтрування
- центрифугування
- сепарування.

Фільтрування – це процес розділення неоднорідних систем за допомогою пористих перегородок, які здатні пропускати рідину і затримувати завислі в них частинки [70].

Фільтрування менш енергоємний і одночасно менш ефективний процес порівняно з центрифугуванням. Суттєвим недоліком методу фільтрування є низька якість очистки, через здатність до засмічення пор фільтрувального матеріалу. Процес фільтрування можна прискорити, якщо культуральну рідину піддати попередній тепловій обробці, додати флокулянти (хлорид кальцію, глинозем). Якщо біомаса клітин чинить опір фільтруванню, то використовують фільтрувальний шар на підкладці. Осад мікробних клітин здатний до ущільнення, тому з часом швидкість фільтрування знижується. Для уникнення перепадів у швидкості фільтрування шар клітинної маси зрізують ножом [71].

Наступним методом відділення клітин від культуральної рідини є центрифугування – примусове осадження часток за рахунок збільшення швидкості відцентрових сил. Рушійною силою є сила осадження у відцентровому полі. Переваги даного методу над фільтруванням та іншими методами [71]:

- немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів;
- матеріал обробляється з найменшими втратами активної речовини;
- можливість використовувати апарати малих габаритів;
- процес легше піддається автоматизації.

Ще одним методом відділення дріжджових клітин є сепарування. За своєю суттю сепаратори є відстійними центрифугами, але внаслідок високого фактора розділення конструкції їх більш складні.

Залежно від рідин, що переробляються, сепаратори поділяють на [71]:

- сепаратори для розділення стійких емульсій (розділові сепаратори);
- сепаратори для відділення твердої фази від рідкої (освітлювальні сепаратори).

Сепарування має ряд переваг перед фільтрацією та іншими способами, а саме [72]:

- 1) немає необхідності в застосуванні фільтруючих добавок;
- 2) сепарація є більш надійним, безперервним процесом, який дає можливість обробити матеріал з найменшими втратами активної речовини;
- 3) процес легше піддається автоматизації, легше здійснити мийку обладнання.

Розділові сепаратори є апаратами безперервної дії, тобто в них одночасно вводять вихідну емульсію і одночасно виводять дві рідини, які різняться густиною [73]. Вивантаження дисперсної фази з освітлювальних сепараторів може відбуватись, в міру її накопичення, вручну або автоматично, або безперервно і одночасно з надходженням в апарат суспензії.

Отже, фільтрування, осадження та центрифугування не є прийнятними для дріжджів, тому більш ефективним у технології виробництва поверхневого антигену вірусу гепатиту В є метод сепарування. Для відділення дріжджових клітин від культуральної рідини доцільно використовувати освітлювальні сепаратори з фактором розділення 4000, протягом 30 хв та при температурі 4°C.

Вибір способу проведення руйнування дріжджових клітин

Дезінтеграція клітинної маси являє собою один з найважливіших елементів біотехнологічного процесу [73]. Існує декілька методів дезінтеграції:

- Фізичний метод. Полягає в механічному руйнуванні клітин.
- Хімічний метод полягає в руйнування оболонки клітин кислотами або лугами.

- Ферментативний метод полягає в руйнуванні клітин за допомогою ферментних препаратів.

Одним із способів механічної дезінтеграції клітин є екструзія. Сутність цього методу полягає в тому, що суспензію клітинної маси під високим тиском продавлюють через вузький отвір в камеру з нормальним тиском. При цьому із-за великого перепаду тиску вода, яка потрапила в клітини, швидко виходить з них і при цьому руйнує клітинну стінку. Крім цього відбувається розігрів і також необхідне охолодження, щоб уникнути втрат продукту із-за термоінактивації. Ступінь руйнування клітин при такому способі складає до 90 % [74].

Також у промисловості застосовують балістичні методи дезінтеграції, в основі яких лежить принцип руйнування клітин подрібнювальними тілами, як у кулькових млинах. Сутність цієї групи методів полягає в тому, що біомасу піддають впливу удару або стирання. У першому випадку біомасу поміщають в циліндричний барабан, що обертається навколо осі [73, 74].

При обертанні барабана кульки перекочуються і вдаряють по агломератам біомаси, причому удари відбуваються досить часто і в різних напрямках. Це призводить до руйнування клітинних стінок і отриманню однорідного в'язкого розчину. Ступінь дезінтеграції (частка зруйнованих клітин) за один цикл складає 52 – 85 %.

У даному випадку доцільним є використання методу екструзії під високим тиском, оскільки даний метод дозволяє мінімізувати втрати, а також досягається високий вихід продукту, ніж при інших методах руйнування.

Основними параметрами, які контролюються в даному методі дезінтергації біомаси є тиск, температура та кількість циклів. Під час руйнування біомаси тиск в гомогенізаторі має становити від 1000 до 2000 бар. Гомогенізатор високого тиску переважно охолоджують, так що на виході продукту спостерігається низька температура, наприклад, 2 – 15 ° С. Клітини у гомогенізаторі зазвичай руйнуються в кілька циклів [74]. Було виявлено, що для оптимального виходу продукту досить від 3 до 8 циклів.

Отже, для руйнування клітин рекомбінантного білка HBsAg, використовують гомогенізатор високого тиску з такими параметрами: 1500 бар, 4 °С, 4 цикли.

Вибір способу освітлення екстракту та отримання супернатанту

Отриманий екстракт HBsAg освітлюють за допомогою таких способів: мікрофільтрація, осадження сульфат амонієм або поліетиленгліколем, ультрацентрифугування.

Мікрофільтрація – процес мембранного поділу з використанням мембран з розміром пор приблизно від 0,02 мкм до 10 мкм. Мікрофільтрацію проводять при дуже малих робочих тисках (близько десятих і навіть сотих часток МПа). У цих процесах можуть відокремлюватись як дрібні частинки механічних домішок, так і окремі клітинні організми й частини клітин.

Мікрофільтрацію проводили за допомогою мембранних фільтрів зроблених з ефірів целюлози MF-Millipore MCE з розміром пор фільтра 0,45 мм.

Екстракт HBsAg оброблюють з метою осадження баластних білків зруйнованих клітин, таким чином, щоб в надосадковій рідині містився неочищений розчин HBsAg [75].

Осадження – це процес розділення, при якому завислі в рідині або газі тверді або рідинні частинки дисперсної фази відділяються від дисперсійного середовища під дією сили тяжіння, відцентрової або електростатичної сили. Осадження сульфат амонієм проводили 14 %-им амоній сульфатом протягом 4 год. Осадження поліетиленгліколем проводили 12 %-им ПЕГ10000 при 4 °С, протягом 4 годин [70].

В даному випадку доцільно обрати осадження сульфат амонієм з подальшим ультрацентрифугуванням, оскільки центрифугування є найбільш ефективним методом очищення. Воно проводиться в оптимальних умовах, з фактором розділення 9000, при 4 °С протягом 30 хв., при цьому ступінь відновлення білку варіюється від 85 до 95 %, в той час як відновлення HBsAg більше ніж 95 % [75].

Вибір способу очищення розчину HBsAg

Після ультрацентрифугування нативний розчин, що містить HBsAg додатково очищують. Існує кілька способів очищення розчину, що містить поверхневий антиген вірусу гепатиту В від баластних речовин: іонна хроматографія або гель-фільтрація.

Іонна хроматографія – це метод високоефективної рідинної іонообмінної хроматографії, в якому використовують хроматографи, що дають змогу проводити високоефективні розділення іонів на мікроколонках, заповнених щільно упакованим сорбентом з малим діаметром зерен [73].

Переваги іонообмінної хроматографії [76]:

- висока продуктивність;
- висока роздільна здатність;
- відносно низька вартість;
- універсальність, можливість застосування у різних галузях.

Гель-фільтраційна хроматографія використовується для поділу молекул з різним молекулярним розміром. Ця хроматографія в основному використовується для визначення молекулярної маси білків і для зменшення концентрації солей білкових розчинів. Декстран, агароза, поліакриламід використовуються в якості матеріалів для колонки [77, 78].

Основні переваги гелеутворюючої хроматографії [77]:

- дають можливість значно скоротити час підготовки колонки, оскільки не потрібно витратити час на їх набухання;
- кульки не злипаються між собою, тому розчинник можна пропускати з великою швидкістю;
- розмір пор скляних кульок не залежить від розчинника і рН, тому можна використовувати будь-які розчинники;
- скляні кульки легко промивати і стерилізувати.

Недоліки:

- через великі розміри гель-фільтраційної колони, необхідно витратити великі обсяги елюенту, що часто призводять до надмірних експлуатаційних витрат;
- гель-фільтрація має низький вихід в порівнянні з іншими хроматографічними методами, оскільки жодна з молекул не утримується колонкою, а неелементний потік відбувається навколо гранул.

Для очищення HBsAg використовують іонообмінну хроматографію. В якості іонообмінних гелів виступає: DEAE Sepharose fast flow (диетиламіноетил-сефароза), Q Sepharose fast flow, CM Sepharose fast flow, SP Sepharose fast flow та QMA SPHEROSIL LS. На вибір геля впливає рН (3 – 9) та іонна сила буферу (0 – 1 М NaCl) [68].

Велика частина HBsAg були непов'язані з катіонними адсорбентами, такими як CM Sepharose FF і SP Sepharose FF, коли значення рН супернатанту було вище або нижче рН HBsAg, це вказує на те, що ці два катіонні адсорбенти не підходять для очищення HBsAg. Було відмічено, що велика частина завантаженого HBsAg була прив'язана до іонних адсорбентів, таких як QMA SPHEROSIL LS, Q Sepharose FF і DEAE Sepharose FF, в діапазоні рН 5 – 9. Результати показали, що ці три іонні адсорбенти можуть бути потенційними адсорбентами для очищення HBsAg [68].

Кількість HBsAg зменшувалася з приростом концентрації NaCl з використанням QMA SPHEROSIL LS. Даний гель є адсорбентом іонообмінної хроматографії, що складається з кремнеземних гранул, щеплених полімером, який забезпечує як іонну, так і слабо гідрофобну взаємодію. Тому HBsAg зв'язувався з адсорбентом QMA як через електростатичну взаємодію при низькій концентрації NaCl, так і при гідрофобній взаємодії при високій концентрації NaCl. Однак, кількість HBsAg в супернатанті збільшувалася з підвищенням концентрації NaCl з використанням Q Sepharose FF і DEAE Sepharose FF, що вказує на те, що HBsAg може завантажуватись на ці два іонні адсорбенти при низькій концентрації NaCl з подальшим елююванням з більш високою концентрацією NaCl. Коефіцієнт очищення на DEAE адсорбенті (від

3,0 до 3,7) явно вищий, ніж у адсорбента Q (менше 2,0). Тому для очищення HBsAg використовувався гель DEAE Sepharose FF з високою продуктивністю. Освітлений супернатант після ультрацентрифугування завантажували на колонку DEAE Sepharose FF і елюювали NaCl різної концентрації (0 – 1 М). Велика кількість небажаних білків проходила через колонку. Решту білків, включаючи HBsAg, розділяли на три фракції (фракції А, В і С) шляхом елюювання [68].

Отже, доцільним методом очищення розчину білка є метод іонообмінної хроматографії, оскільки цей метод дозволяє отримати білок HBsAg з коефіцієнт очищення – 3,0 та зі ступенем відновлення близько 43 %.

Вибір способу концентрування фракцій HBsAg та отримання концентрованого розчину

Після іонообмінної хроматографії отримані фракції HBsAg розділяли шляхом елюювання хлоридом натрію та концентрували. Існує кілька способів концентрування HBsAg: ультрафільтрація та зворотній осмос.

Процес зворотного осмосу полягає у фільтруванні розчинів під тиском, який перевищує осмотичний, через напівпроникні мембрани, які пропускають розчинник і повністю затримують молекули або іони розчинених речовин. При зворотному осмосі через мембрану проходять частинки розчинника, а затримуються частини низько- та високомолекулярних речовин із розмірами, меншими за 0,01 мкм. Тиск при зворотному осмосі становить 1 – 10 МПа [70].

Ультрафільтрація – це процес мембранного поділу, при якому з розчину відокремлюються молекули і частинки розміром від 10 до 200 А. Молекулярна маса таких частинок лежить в межах від 1000 до 1000000 Да.

Процеси ультрафільтрації виконують на мембранах із середнім діаметром пор 0,01 – 0,1 мкм. При ультрафільтрації розділяють розчини, які містять великі молекули (наприклад, молекули білків), а молекулярна маса розчинених компонентів більша від молекулярної маси розчинника. Ультрафільтрацію проводять при порівняно невеликих тисках (0,2 – 1 МПа) [70].

Молекулярна маса поверхневого антигену вірусу гепатиту В отриманого з дріжджів *H. polymorpha* становить 3010 кДа або 3010000 Да. Білки (фракції А та С) з меншою молекулярною масою проникають через мембрану, тоді як білок HBsAg (фракція В) залишається на поверхні [68].

Використання цього методу має ряд переваг: виключена денатурація білка, так як процес йде без фазових перетворень при будь-якій температурі; можливе одночасне концентрування та очищення від низькомолекулярних органічних речовин; незначні витрати [79].

В даному випадку доцільним є використання ультрафільтрації в тангенціальному потоці, оскільки в результаті цього не відбувається скупчення частинок або засмічення пор, що значно збільшує тривалість використання фільтраційної системи.

При заданій молекулярній масі антигену HBsAg 3010 кДа розмір молекули становить $D_m = 0,098 \cdot M^{0,38} = 0,098 \cdot (3,01 \cdot 10^9)^{0,38} = 392$ нм. Коефіцієнт селективності мембрани ϕ визначаємо в залежності від співвідношення $K_c = D_m/D_{\text{пор}}$, яке має бути більше 0,5 та менше 2.

Для цього використовуємо ацетатцелюлозну мембрану УАМ-1000П ЗАО «Владіпор» з розмірами пор 500 нм, тоді $K_c = 392/500 = 0,784$. Для нашого випадку K_c лежить в заданих межах, отже ультрафільтраційна мембрана УАМ-1000П підходить для концентрування антигену HBsAg.

З попередньо наведеної інформації, після ультрафільтрації ми отримуємо концентрований розчин HBsAg, який додатково ще очищуємо за допомогою гель-фільтраційної хроматографії, оскільки вона дозволяє швидше і ефективніше здійснити знесолення препаратів, необхідне після ультрафільтрації, і видаляє залишки низькомолекулярних білків. В якості гелю виступає сефароза 4 Fast Flow. Чистота розчину після гель-фільтрації значно збільшується приблизно з 60 % до 99 % [68].

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ


6.1. Специфікація обладнання для виділення та очищення антигену вірусу гепатиту В

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання для виділення та очищення антигену

Зб-6	Збірник для приготування $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	Збірник оснащений перемішуючим пристроєм.
Зб-11	Збірник для приготування NaOH	1	Збірник оснащений стерилізуючим пристроєм.
Зб-2, 7, 12	Збірники, в які зливаються дріжджові клітини, гомогенізатор, фракції HBsAg	3	Збірники оснащені перемішуючим пристроєм. Збірники об'ємом 30, 35, 40 л.
Зб-15	Збірник для приготування елюенту NaCl	1	Збірник оснащений перемішуючим пристроєм.
Зб-21	Збірник для приготування буферу	1	Збірник оснащений перемішуючим пристроєм.
Зб-23	Збірник, що містить білок HBsAg	1	Збірник оснащений перемішуючим пристроєм.
С-1	Сепаратор	1	Сепаратор фірми Альфа Лаваль, модель МВРХ 404S. Продуктивністю від 100 до 150 л/год [80].
Г-4	Гомогенізатор	1	Гомогенізатор високого тиску фірми ІКА, модель НРН 2000/5-SH8 або НРН 2000/5-DH8. Продуктивністю від 20 до 40 л/год. Максимальний робочий тиск 2000 бар [81].

НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Сліпчук Т.О.		
Перевір.		Буценко Л.М.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		

РОЗДІЛ 6. Опис
технологічного процесу
виробничого біосинтезу

Літ.	Арк.	Аркушів
	68	4

Кафедра БТМ

УЦ-9	Ультрацентрифуга	1	Центрифуга UNIVERSAL 320 фірми Andreas Hettich GmbH (Німеччина) з фактором розділення 9000 та частотою обертання 9509 об/хв [82]
ІХ-16	Іонообмінний хроматограф	1	Іонний хроматограф моделі Dionex ICS-900. Швидкість потоку елюенту від 0,1 до 5 мл/хв. Носій – сефароза, елюент – NaCl [83].
УФ-18	Ультрафільтраційна установка	1	Для ультрафільтраційної установки використовують мембрану типу УАМ-1000П фірми ПАТ «Владіпор» розміром пор 500 нм. Продуктивність по фільтрату 0,8 м ³ /год [84].
ГФ-19	Гель-фільтрація	1	Гель-фільтрація, об'ємом 6 мл. Швидкість потоку елюенту від 0,5 до 2 мл/хв. [85]. Носій – сефароза, елюент – NaCl.
МФ-22	Мікрофільтраційна установка	1	Для мікрофільтраційної установки використовують мембрану виготовлену полісульфонамідом фірми ПАТ «Владіпор» розміром пор 220 нм. Проникність по чистій воді 0,3 м ³ /год [84].

6.2. Опис технологічної схеми отримання антигену вірусу гепатиту В

ТП 1. Відділення біомаси

ТП 1.1. Сепарування культуральної рідини

Культуральну рідину після біосинтезу сепарують в сепараторі (С-1) протягом 30 хв., з фактором розділення 4000 g. Потім дріжджові клітини, що відділилися йдуть до ТП 2.1, а надосадкова рідина – на знешкодження відходів до ЗВ 9.1.

ТП 2. Руйнування дріжджових клітин

ТП 2.1. Гомогенізація під високим тиском

Після сепарування дріжджові клітини передають у збірник (ЗБ-2), звідки вони за допомогою насосу (Н-3) перекачуються в гомогенізатор (Г-4). Дріжджові клітини руйнують гомогенізатором під високим тиском у 4 цикли, при тиску 1500 бар. Далі отриманий гомогеніза́т передають до ТП 3.1.

ТП 3. Освітлення екстракту та отримання супернатанту

ТП 3.1. Осадження $(NH_4)_2SO_4$

Гомогеніза́т від ТП 2.1 передають у збірник (ЗБ-7), в якому міститься розчин сульфат амонію, який використовують для освітлення. Осадження проводять 14-им % розчином $(NH_4)_2SO_4$ протягом 4 год за кімнатної температури. Далі супернатант передають на ультрацентрифугування до ТП 3.2.

ТП 3.2. Ультрацентрифугування

Супернатант від ТП 3.1 за допомогою насосу перекачуються в ультрацентрифугу (УЦ-9). Гомогеніза́т центрифугують протягом 30 хв., при 4 °С, фактор розділення 9000 g. Потім розчин, що містить HBsAg, йде до ТП 4.1, а клітинний дебрис – на знешкодження.

ТП 4. Очищення розчину HBsAg

ТП 4.1. Іонообмінна хроматографія

Після ультрацентрифугування розчин, що містить HBsAg передають у збірник (ЗБ-12), в який подають NaOH зі збірника (ЗБ-11), для того, щоб довести супернатант до рН 7. Далі зі збірника супернатант за допомогою насосу (Н-13) перекачують у колонку (ІХ-16), яка попередньо урівноважена натрій-фосфатним буфером зі збірника (ЗБ-21). В якості елюенту використовують NaCl зі збірника (ЗБ-15). Швидкість потоку 2 мл/хв., довжина хвилі 260 або 280 нм. Потім розчин, що містить HBsAg в елюенті NaCl передають на стадію ТП 11.1, а баластні речовини – на знешкодження відходів до ЗВ 9.1.

ТП 5. Концентрування

ТП 5.1. Ультрафільтрація

Після іонообмінної хроматографії (ІХ-16) фракції HBsAg перекачують за допомогою насосу (Н-17) в збірник ультрафільтраційної установки. У розчин

HBsAg додають поліетиленгліколь та далі концентрують шляхом ультрафільтрації (УФ-18). Розчин HBsAg концентрують при тиску 1 МПа та при швидкості потоку 60 мл/хв. Далі концентрований розчин HBsAg передають до ТП 6.1.

ТП 6. Очищення

ТП 6.1. Гель-фільтрація

Концентрат отриманий після ультрафільтрації (УФ-18) перекачують через колонку гель-фільтрації (ГФ-19), яка попередньо урівноважена натрій-фосфатним буфером. В якості елюенту використовують NaCl. Швидкість потоку 1,5 мл/хв. Після цих стадій вдається отримати антиген HBsAg в розчині NaCl зі ступенем чистоти 99 %, який далі передається до ТП 7.

ТП 7. Стерилізація натрій-фосфатного буферу

ТП 7.1. Мікрофільтрація

Натрій-фосфатний буфер зі збірника (ЗБ-21) передають у мікрофільтраційну установку (МФ-22) для стерилізації. Стерилізація проходить шляхом проходження буферу через мембрану з діаметром пор 0,22 мкм. Далі стерильний буфер передають на стадію ТП 8.

ТП 8. Стабілізація HBsAg

ТП 8.1. Стабілізація та зберігання HBsAg в буфері

Після очищення гель-фільтрацією розчин від ТП 7.1 передають у збірник (ЗБ-23) для зберігання, що містить буфер з мікрофільтраційної установки (МФ-22).

ЗВ 9. Знешкодження відходів

ЗВ 9.1. Знешкодження рідких відходів

Виробничі стоки на ділянці виробництва готових лікарських препаратів утворюються на стадії санітарної підготовки та промивки обладнання та разом з загальнозаводськими стоками скидаються в міську каналізацію.

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ

7.1. Вибір форми випуску лікарського засобу

В даний час розроблені технології виготовлення і конструкції різних лікарських форм. Лікарських форм може бути дуже велика кількість, це і таблетовані, і ін'єкційні, і очні, і інгаляційні форми. Однак не всі вони однаково ефективні при доставці ліків до місця ураження [86].

Лікарська форма – форма, яка зручна для застосування і забезпечує необхідний лікарський ефект.

Лікарські форми за агрегатним станом поділяють на [87]:


- ✓ рідкі (розчини, емульсії, настойки);
- ✓ тверді (капсули, таблетки, порошки);
- ✓ м'які (гелі, мазі, креми);
- ✓ газоподібні (аерозолі, спреї).

Розчини – рідка лікарська форма, яка являє собою гомогенну систему, до складу якої входять одна або більше діючих речовин. Розчини складаються з розчиненої речовини (речовин) та розчинника.

Порошки – лікарська форма, що складається з твердих окремих сухих часток різного ступеня подрібненості.

Гелі – м'які лікарські засоби для місцевого застосування, що являють собою одно-, дво- або багатофазові дисперсні системи з рідким дисперсним середовищем, реологічні властивості яких обумовлені присутністю гелеутворювачів у невеликих концентраціях.

Аерозолі – форма діючих та допоміжних речовин, яка складається з балона, клапано-розпилюючої системи та вмісту різної консистенції, здатної за допомогою пропеленту виводитися з балона.

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ			
Розроб.		Сліпчук Т.О.			РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва вакцини	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					72	36
Реценз.					Кафедра БТМ			
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Спреї – лікарська форма, що складається з балона, клапано-розпилюючої системи та вмісту різної консистенції.

Сучасні лікарські форми значно вдосконалилися за останні десятиліття. Якщо раніше використовувалися аерозольні лікарські форми під тиском із застосуванням пропелентів, то сьогодні аерозольні форми використовуються мало, їх значно потіснила така лікарська форма, як спрей [86].

Лікарські форми залежно від шляхів введення поділяють на [88]:

- ✓ ентэральні (перорально, сублінгвально)
- ✓ парентеральні (через шкіру та слизові оболонки, ін'єкційні та інгаляційні лікарські форми)

Система інтраназальної доставки ліків являється найбільш перспективною, з огляду на доступність тканин слизової оболонки. Імунізація через слизову оболонку забезпечує як клітинну, так і гуморальну імунізацію та одночасно індукує слизовий та системний імунітет. Вважається, що клітинні і гуморальні імунні відповіді на антигени вірусу гепатиту В (HBV) відіграють вирішальну роль в ліквідації вірусу. З одного боку, гуморальна імунна відповідь веде до захисту від інфекції. З іншого боку, клітинна імунна відповідь сприяє ліквідації вірусу від інфікованих гепатоцитів [89].

Перевагою вакцинації на поверхні слизової оболонки шляхом інтраназального введення є індукція слизових і системних імунних реакцій, тоді як традиційне парентеральне введення зазвичай призводить лише до системних імунних відповідей. Вакцинна композиція для інтраназальної доставки підтримує антиген в стабільній формі, залишаючись в області носоглотки, досить довго [90].

Отже, лікарська форма спрей та інтраназальний спосіб доставки ліків є одними з найбільш перспективних з нині застосовуваних, оскільки основна перевага повітряно-крапельного способу доставки полягає в можливості безпосереднього та швидкого впливу в зоні запалення.

7.2. Опис вакцини згідно АНД (проект АНД)

Таблиця 7.1

СПЕЦИФІКАЦІЯ НА ВАКЦИНУ ПРОТИ ГЕПАТИТУ В

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Гомогенна суспензія білого з сірим відтінком кольору без видимих сторонніх включень, при відстоюванні розділяється на 2 шари: верхній – безбарвна прозора рідина, нижній – білий осад. При струшуванні суспензія повинна легко ресуспендувати.	Візуально
Ідентифікація	А. Метод ІФА. Вміст HBsAg має бути не менше 80 %. В. Метод електрофорезу в ПААГ. При забарвленні гелю розчином срібла нітрат повинна виявлятися основна смуга мономера з молекулярною масою (24 ± 2) кДа.	За п. 2
рН	Від 6,4 до 7,4	ДФУ, 2.2.3
Розмір частинок	Суспензія вакцини повинна вільно проходити в шприц через голку $0,8 \times 40$	За п. 4
Стійкість	Суспензія вакцини не повинна розшаровуватися протягом 5 хв після струшування.	За п. 5
Антимікробні консерванти	Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці.	ДФУ, с. 232
Стерильність	Має витримувати випробування на стерильність з використанням 10 мл для кожного середовища.	ДФУ, 2.6.1
Пірогени	Має витримувати випробування на пірогени. Кожному кроликові вводять дозу, еквівалентну одній дозі для людини.	ДФУ, 2.6.8
Бактеріальні ендотоксини	Не більше 30 ОЕ/мл	ДФУ, 2.6.14
Аномальна токсичність	Препарат повинен бути нетоксичним.	ДФУ, 2.6.9
Специфічна активність	Вміст HBsAg має бути не менше 80 % по відношенню до препарату порівняння.	За п. 11

Механічні включення <i>невидимі включення</i>	Не більше 6000 розміром ≥ 10 мкм в одному контейнері Не більше 600 розміром ≥ 25 мкм в одному контейнері	ДФУ, 2.9.19
<i>видимі включення</i>	Мають бути практично відсутні	ДФУ, 2.9.20
Імуногенна активність	Відношення дози імуногенної активності референс-препарату вакцини гепатиту В, що викликає вироблення антитіл у 50 % мишей (ЕД ₅₀ референс-препарату) до ЕД ₅₀ використовуваної вакцини має бути не менше 0,5.	За п. 13
Повнота сорбції антигену	Кількість нез'язаного поверхневого антигену вірусу гепатиту В має бути не більше 1 % від номінальної кількості.	За п. 14
Кількісне визначення	Не більше 1,0 мл відповідного розведення	ДФУ, 2.7.15

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. **Опис.** Гомогенна суспензія білого з сірим відтінком кольору без видимих сторонніх включень, при відстоюванні розділяється на 2 шари: верхній – безбарвна прозора рідина, нижній – білий осад. При струшуванні суспензія повинна легко ресуспендувати.

2. **Ідентифікація.** А. Визначення проводять методом ІФА з використанням комерційних тест-систем для виявлення HBsAg з чутливістю не більше 0,1 МО/мл. Принцип методу полягає в реакції специфічної взаємодії антигену з антитілом з утворенням імунного комплексу та подальшої детекції отриманого комплексу за допомогою спектрофотометрії.

У кожен лунку планшета вносять 0,1 – 0,5 мкг антигену і 100 мкл 0,05М карбонат-бікарбонатного буферного розчину (рН 9,6), і далі проводять сорбцію при температурі 4 °С протягом 16 год. Інкубація проводиться при струшуванні на горизонтальному шейкері для планшетів.

Відмивання (дворазова) незв'язаних молекул антигену здійснюється фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 9,0), що містить 0,1 % твін-20 (по 300 мкл на лунку).

Для блокування місць неспецифічного зв'язування антигенів або антитіл лунки планшета заповнюють фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 9,0), і інкубують протягом 10 – 15 хв при кімнатній температурі.

В лунки планшета вносять по 100 мкл розчину специфічних антитіл, кон'югованих з ферментної міткою, оптимальна концентрація кон'югованих антитіл становить 2-4 мкг/мл.

Інкубація з антитілами, що містять ферментну мітку, проводиться протягом 30 хв при кімнатній температурі і струшуванні на горизонтальному шейкері для планшетів.

Відмивання здійснюється фосфатно-сольовим буферним розчином рН 9,0, що містить 0,1 % Твін-20, не менше 3 – 4 разів.

Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках (у двохвильовому режимі 450 – 620 нм).

Б. Електрофорез в поліакриламідному гелі (ПААГ) використовується для розділення білків і нуклеїнових кислот, який заснований на русі заряджених біологічних макромолекул в постійному електричному полі. При забарвленні гелю розчином срібла нітрат повинна виявлятися основна смуга мономера з молекулярною масою (24 ± 2) кДа.

Поліакриламідний гель після проведення електрофорезу поміщають у ванночку з буфером для блоту (25 мМ Тріс, 192 мМ гліцин, 10 % етанол, рН 8,3). Два листа фільтрувального паперу, вирізані по формі касети для блоту і змочені буфером для блоту, поміщають на ту частину касети, яка буде звернена до анода. Потім на фільтрувальний папір поміщають попередньо змочений тим же буфером нітроцелюлозну мембрану, стежачи за тим, щоб між мембраною і папером не було бульбашок повітря. Після цього на мембрану слід обережно

помістити гелю, знову звернувши особливу увагу на відсутність бульбашок повітря між гелем і мембраною. Завершують формування «сендвіча» двома шари змоченого фільтрувального паперу, які поміщаються на поверхню гелю. Отриманий «сендвіч» затискається в касеті і поміщається між електродами так, щоб мембрана була звернена до анода.

Електроперенос білків на нітроцелюлозну мембрану проводять в буфері протягом 30 – 50 хв при постійній напрузі 100 В. Якість електропереносу і розташування білкових смуг оцінюють, фарбуючи нітроцелюлозну мембрану 0,3 % розчином Понсо S в 1 % оцтовій кислоті.

Для блокування місць неспецифічного зв'язування антитіл мембрану інкубують при постійному перемішуванні при кімнатній температурі протягом 30 хв. в PBST (для кращого блокування можна використовувати розчин PBST, що містить 10 % сухе знежирене молоко). Після блокування мембрану інкубували протягом години при кімнатній температурі і постійному перемішуванні в PBST, що містить 1 – 10 мкг/мл специфічних антитіл.

Після блокування мембрани 3-х кратно відмивають буфером і переносять в розчин вторинних антитіл, кон'югованих з лужною фосфатазою. У розчині вторинних антитіл мембрану інкубують 1 годину при постійному перемішуванні.

Після ретельної відмивання PBST мембрану переносять в розчин хромогенного субстрату, що містить 3 мг діамінобензидіну (ДАБ) і 10 мкл 30 % перекису водню в 10 мл 0,1 М трис-НСl, рН 7,6. Інкубацію проводять при перемішуванні 5 – 10 хв.

Мембрану після закінчення інкубації з субстратом слід промити PBST, підсушити, промокнув фільтрувальним папером, і відразу ж зробити електронну копію, скануючи в кольорі. Якщо мембрана повністю висихає, зафарбовані білкові смуги бліднуть, і зображення виходить менш яскравим і контрастним. Даний метод дозволяє проводити якісний та кількісний аналіз отриманих даних в порівнянні зі стандартними білками.

3. **pH**. Від 6,4 до 7,4. Визначення проводять потенціометричним методом. Потенціометричне визначення pH проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню, другий – електрод порівняння (ДФУ, 2.2.3).

4. **Розмір частинок**. Суспензія вакцини повинна вільно проходити в шприц через голку 0,8×40.

5. **Стійкість**. Суспензія вакцини не повинна розшаровуватися протягом 5 хв після струшування.

6. **Антимікробні консерванти**. Визначають кількість антимікробних консервантів підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Вміст антимікробних консервантів має бути не менше мінімально ефективної кількості і не більше 115 % від вмісту, зазначеного на етикетці (ДФУ, с. 232).

7. **Стерильність**. Має витримувати випробування на стерильність з використанням 10 мл для кожного середовища. Субстанція має бути стерильною.

Випробування на стерильність проводять двома методами: методом прямого посіву або методом мембранної фільтрації. Метод мембранної фільтрації використовують у всіх випадках, коли природа препарату, його фізико-хімічні властивості дозволяють фільтрувати його через мембранні фільтри. Метод прямого посіву використовують для випробування на стерильність ЛЗ, котрі не володіють антимікробною дією (ДФУ, 2.6.1).

При перевірці придатності (визначенні антимікробної дії) готують суспензії тест-штамів з кінцевої концентрацією не більше 100 КУО в 1 мл.

Використовують по 4 пробірки для кожного тест-штаму з 10 мл відповідного живильного середовища. У перші дві пробірки з культурою мікроорганізму вносять по 1 мл випробованого зразка, а в дві інші – по 1 мл розчинника (позитивний контроль). У всі чотири пробірки вносять по 1 мл відповідного тест-штаму.

Посіви на тіогліколевому середовищі інкубують при температурі 30 – 35 °С протягом 3 діб. Посіви на рідкому соєво-казеїновому середовищі або рідкому середовищі Сабуро інкубують при температурі 20 – 25 °С протягом 5 діб.

8. **Пірогени.** Випробування на пірогени полягає у вимірюванні підвищення температури тіла, що спричинене внутрішньовенним введенням кролям стерильного розчину випробовуваного лікарського засобу. Кожному кроликові вводять дозу, еквівалентну одній дозі для людини. Тест-доза – 0,5 мл на 1 кг маси кролика (ДФУ, 2.6.8).

9. **Бактеріальні ендотоксини.** Граничний вміст ендотоксинів – не більше 30 ОЕ/мл. Випробування проводять методом гель-тромб тесту (граничний тест, метод А). Спосіб гель-тромбу дозволяє визначати наявність і кількість ендотоксинів, і ґрунтується на згортанні лізату в присутності ендотоксинів (ДФУ, 2.6.14).

Готують стандартні розчини не менше ніж чотирьох концентрацій, еквівалентних 2λ, λ, 0,5λ і 0,25λ, шляхом розведення вихідного стандартного розчину ендотоксину водою для ін'єкцій.

У 4 пробірки додають розчин лізату та антиген, по 0,1 мл кожного. Реакційну суміш інкубують при температурі 37 ° С протягом 60 хв, уникаючи вібрації. Досліджують цілісність гелю: при використанні пробірок кожному з них по черзі витягують з інкубатора і перевертають одним плавним рухом приблизно на 180°. Якщо утворюється міцний гель, що залишається на своєму місці після перевертання, результат записують як позитивний. Результат негативний, якщо неушкодженого гелю не утворюється

Максимально допустиме розведення (МДР) є максимально можливим розведенням зразка, при якому може бути визначений граничний вміст ендотоксинів.

МДР обчислюють за формулою:

$$\text{МДР} = \frac{\text{граничний вміст ендотоксинів} \cdot \text{концентрацію випробовуваного розчину}}{\lambda},$$

де λ – чутливість лізату (ОЕ/мл) у гель-тромб методі або найнижча концентрація на стандартній кривій у турбідиметричному або хромогенному методах.

10. **Механічні включення**. 20 мкг субстанції розфасовують по 1 мл у 20 флаконів і розводять водою, вільною від часток Р або підходящим розчинником, вільним від часток, у кількості достатній для повного розчинення субстанції (ДФУ, 2.9.20).

11. **Аномальна токсичність**. 20 мкг субстанції розфасовують по 1 мл у 20 флаконів і розчиняють в 0,5 мл води для ін'єкцій Р або у стерильному розчині 9 г/л натрію хлориду Р, вводять внутрішньовенно кожній з п'яти здорових мишей масою від 17 г до 24 г. Розчин вводять протягом інтервалу часу від 15 с до 30 с (ДФУ, 2.6.9).

12. **Специфічна активність**. Визначення проводять відповідно до методу імуноферментного аналізу з використанням комерційних тест-систем для виявлення HBsAg з чутливістю не нижче 0,1 ОЕ/мл відповідно до інструкції по застосуванню.

Суть цього методу полягає у виявленні специфічних антитіл за допомогою спеціальних біохімічних реакцій, які допомагають визначити присутність або відсутність антитіл і їх кількість.

У кожен лунку планшета вносять 0,1 – 0,5 мкг антигену і 100 мкл 0,05М карбонат-бікарбонатного буферного розчину (рН 9,6), і далі проводять сорбцію при температурі 4 °С протягом 16 год. Інкубація проводиться при струшуванні на горизонтальному шейкері для планшетів.

Відмивання (дворазова) незв'язаних молекул антигену здійснюється фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 9,0), що містить 0,1 % твін-20 (по 300 мкл на лунку).

Для блокування місць неспецифічного зв'язування антигенів або антитіл лунки планшета заповнюють фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 9,0), і інкубують протягом 10 – 15 хв при кімнатній температурі.

В лунки планшета вносять по 100 мкл розчину специфічних антитіл, кон'югованих з ферментної міткою, оптимальна концентрація кон'югованих антитіл становить 2 – 4 мкг/мл.

Інкубація з антитілами, що містять ферментну мітку, проводиться протягом 30 хв при кімнатній температурі і струшуванні на горизонтальному шейкері для планшетів.

Відмивання здійснюється фосфатно-сольовим буферним розчином рН 9,0, що містить 0,1 % Твін-20, не менше 3 – 4 разів.

Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках (у двохвильовому режимі 450 – 620 нм).

13. **Імуногенна активність.** Вакцина повинна стимулювати вироблення антитіл до HBsAg у одноразово імунізованих мишей лінії Balb/c.

Тваринам вводять внутрішньочеревно по 1 мл відповідного розведення досліджуваного препарату, референс-вакцини і негативного контролю.

Через 28 – 30 днів тварин знекровлюють. Отримані індивідуально від кожної тварини сироватки аналізують на наявність антитіл методом ІФА з використанням тест-систем для кількісного визначення антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В з чутливістю 5 – 10 мОЕ/мл.

Для кожної групи мишей обчислюють відсоток ефективності (показник сіроконверсії) за формулою:

$$\text{ПСК} = \frac{\text{кількість сіропозитивних мишей в групі}}{\text{загальна кількість мишей в групі}} \cdot 100$$

14. **Повнота сорбції антигену.** Випробуваний зразок вакцини в об'ємі 1000 мкл центрифугують при 6000 об/хв протягом 5 хв при кімнатній температурі. Як референс-препарат використовують несорбований HBsAg з відомою концентрацією.

Визначення незв'язаного поверхневого антигену в надосадової рідині проводять методом ІФА з використанням комерційних тест-систем для

виявлення HBsAg з чутливістю не нижче 0,1 ОЕ/мл по відношенню до референс-препарату. Кількість незв'язаного поверхневого антигену вірусу гепатиту В визначають за калібрувальним графіком референс-зразка. Повноту сорбції (X) у відсотках розраховують за формулою:

$$X = \frac{A \cdot F_{1\text{розведення}}}{B \cdot F_{2\text{розведення}}} \cdot 100,$$

де А – середнє значення оптичної щільності надосадової рідини; В – середнє значення оптичної щільності референс препарату; $F_{1\text{розведення}}$ – фактор розведення надосадової рідини; $F_{2\text{розведення}}$ – фактор розведення референс препарату.

15. **Кількісне визначення.** Проводять або *in vivo* шляхом порівняння здатності вакцини та стандартного препарату в певних умовах індукувати утворення специфічних антитіл проти поверхневого антигена (HBsAg) гепатиту В у мишей, або *in vitro* імунохімічним визначенням вмісту антигена.

Використовують розчин 9 г/л натрію хлориду Р, до складу якого входить ад'ювант, що містить наноемульсію. Кожній тварині групи підшкірно вводять не більше 1,0 мл відповідного розведення. Одну групу тварин використовують як невакцинований контроль і кожній тварині цієї групи внутрішньочеревно вводять таку саму кількість розчинника (ДФУ, 2.7.15).

Маркування. На етикетці зазначають: кількість HBsAg на контейнер; тип клітин, використаних для виробництва вакцини; назву та кількість адсорбенту; вакцину слід струшувати перед застосуванням; вакцина не має бути заморожена (ДФУ, с. 233).

Термін придатності та умови зберігання. Зберігати при температурі від 2 °С до 8 °С (в холодильнику) протягом 3 років. Не заморожувати. Зберігати у недоступному для дітей місці.

7.3. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень виробництва вакцини (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря)

До виробництва стерильної продукції пред'являють особливі вимоги, щоб звести до мінімуму ризик контамінації мікроорганізмами, частками і пірогенами. При цьому багато чого залежить від кваліфікації, навчання і виробничої дисципліни працюючого персоналу [91].

Для виробництва стерильних лікарських засобів виділяють чотири класи, котрі класифікують у відповідності з вимогами навколишнього середовища в експлуатованому і оснащеному станах.

«Оснащений» стан – це умова, за якої система чистого приміщення цілком підготовлена, виробниче обладнання цілком встановлене і готове до роботи, але персонал відсутній. «Експлуатований» стан – це умова, за якої система чистого приміщення й обладнання функціонують у встановленому режимі з визначеною кількістю працюючого персоналу [72].

Таблиця 7.2

Класифікація чистих приміщень по максимально припустимому числу часток у повітрі [92]

Класчистоти	Максимально припустиме число часток в 1 м ³		Максимальне число життєспроможних мікроорганізмів, допустиме в 1 м ³ повітря робочої зони
	0,50 – 5 мкм	>5 мкм	
А (з ламінарним потоком повітря)	3500	ні	менше 1
В	3500	ні	5
С	350000	2000	100
Д	3500000	20000	500

Клас А: Локальна зона для операцій, що становлять високий ризик для якості продукції, наприклад: зони дозування, закупорювання ємностей, змішування в асептичних умовах. Як правило, такі умови забезпечуються

ламінарним потоком повітря на робочому місці. Системи ламінарного потоку повітря мають забезпечувати рівномірну швидкість повітря в діапазоні 0,36 – 0,54 м/с. У закритих ізоляторах та боксах із рукавичками можна використовувати односпрямований потік повітря із меншими швидкостями.

Клас В: Навколишнє середовище для зони класу А у разі виготовлення і наповнення в асептичних умовах.

Класи С і D: Чисті зони для здійснення менш критичних стадій виробництва стерильної продукції [91].

У чистих зонах усі відкриті поверхні мають бути гладенькими, непроникними і непошкодженими, щоб звести до мінімуму утворення і накопичення часток або мікроорганізмів, а також дозволити багаторазово застосовувати очищувальні та при необхідності дезінфікуючі засоби.

Отже, культивування та виділення поверхневого антигену вірусу гепатиту В здійснюється в приміщенні класу чистоти D. Розлив та укупорювання вакцини проти гепатиту В на основі наноемульсії у флакони здійснюється в приміщенні класу чистоти В, де встановлено автомат для розливу нановакцини із зоною А. Упаковка флаконів в первинну упаковку та пакування в групову упаковку здійснюється в приміщенні класу чистоти D.

Підготовка персоналу

У чистих зонах повинна бути присутня лише мінімальна кількість необхідного персоналу; це особливо важливо при обробці в асептичних умовах [91].

Персонал, що входить у виробничеприміщення, повинен бути одягнений в спеціальний одяг. Технологічний одяг персоналу повинен відповідати класу чистоти тієї зони, в якій він працює, тобто максимально захищати продукт виробництва від частинок, що виділяються людиною [72].

Весь персонал, який працює в таких зонах, повинен регулярно проходити навчання з дисциплін, пов'язаних з належним виробництвом стерильної продукції, включаючи питання гігієни й основи мікробіології [91].

Співробітники, зайняті у виробництві стерильних лікарських препаратів, 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.

У чистих зонах не допускається носити наручні годинники і ювелірні прикраси, а також використовувати косметику.

Переодягатися і митися необхідно згідно з письмовими методиками, розробленими так, щоб зводити до мінімуму ризик контамінації одягу для роботи в чистих зонах і не внести забруднення в чисті зони.

Необхідно, щоб одяг і його якість відповідали процесу і класу робочої зони. Одяг слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації [91].

До персоналу і технологічного одягу призначеного для зон класів чистоти А і Д, висуваються такі вимоги:

Клас Д: волосся і борода (при наявності) мають бути закриті. Слід носити звичайний захисний костюм і відповідне взуття або бахіли. Мають бути вжиті відповідні заходи для запобігання будь-якій контамінації чистої зони ззовні.

Клас С: волосся, а також борода і вуса (при їх наявності) мають бути закриті. Необхідно носити комбінезон або брючний костюм, що щільно прилягає на зап'ястях і має високий комір, а також відповідне взуття або бахіли. Від них практично не мають відокремлюватися волокна або часточки.

Клас А/В: головний убір має повністю закривати волосся, а також бороду і вуса (при їх наявності); він має бути вставлений у комір костюма; необхідно на обличчі носити маску для запобігання поширенню крапельок. Слід носити відповідним чином простерилізовані та ненапудрені гумові або пластикові рукавички і простерилізовані або продезінфіковані бахіли. Нижні краї штанів мають бути вставлені в бахіли, а рукави одягу – у рукавички. Захисний одяг практично не має виділяти волокна або часточки і має затримувати часточки, що відокремлюються від тіла.

Кожен робітник у зоні класу А повинен бути забезпечений чистим стерильним (простерилізованим або таким, що пройшов відповідну санітарну обробку) захисним одягом для кожної зміни або принаймні на один день, якщо це виправдано результатами контролю. Рукавички під час роботи потрібно регулярно дезінфікувати. Маски і рукавички необхідно змінювати принаймні кожну зміну [91].

Підготовка дезінфікуючих засобів

В якості мийних засобів використовують лужні (кальцинована сода, каустична сода) та кислотні (азотна, фосфорна, соляна, оцтова, сульфамінова кислоти) мийні засоби, а також мийні засоби на основі синтетичних поверхнево-активних речовин (синтетичні порошки типу А, Б, В, ТЕА-АБСК) і мийні засоби з протеолітичними ферментами («Біомой») [93].

Мийні засоби повинні відповідати наступним вимогам:

- виявляти високу мийну здатність;
- забезпечувати повне змочування поверхонь із різних конструкційних матеріалів;
- забезпечувати пом'якшення жорсткої води;
- забезпечувати повне видалення механічного, білкового та жирового забруднення шляхом їх диспергування та емульгування;
- забезпечувати нейтралізацію кислих забруднень та омилення жирів (для лужних мийних засобів);
- виявляти низьку агресивність щодо конструкційних матеріалів, які використовують для виготовлення технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю та внутрішньоцехової тари підприємств хіміко-фармацевтичної промисловості [93].

Кальцинована сода являє собою зневоднений вуглекислий натрій (Na_2CO_3). Має вигляд білого дрібнокристалічного порошку, який добре розчиняється у воді. У водних розчинах кальцинована сода частково розкладається з утворенням їдкого луку та гідрокарбонату, які зумовлюють мийні властивості.

Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки).

Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника в критих складських приміщеннях.

Каустична сода (їдкий натр) являє собою безбарвну кристалічну речовину, гігроскопічну, яка добре розчиняється у воді [93].

Засіб належить до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки). При попаданні на шкіру викликає хімічний опік. Подразнює слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів.

Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника в складських неопалюваних приміщеннях [94].

Біомой – мийний засіб, що містить синтетичні поверхово-активні речовини та протеолітичні ферменти (лужна фосфатаза). Являє собою порошок світлого кольору (від білого до світло-жовтого), який має помірний запах використаної сировини.

Засіб належить до малонебезпечних речовин (4 клас небезпеки), не виявляє кумулятивні, шкіряно-резорбтивні та алергенні властивості. У сухому вигляді подразнює шкіру і слизову оболонку очей [93].

Гарантійний термін зберігання 1 рік з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника в критих складських приміщеннях, які провітрюються і не мають доступу для загального користування.

Для проведення дезінфекційних заходів використовують дезінфекційні засоби, що містять в якості активно діючої речовини окислювачі (перекис водню), глутаровий альдегід у суміші з четвертинними амонійними сполуками (Деконекс), похідні гуанідину (Гембар) та мийно-дезінфекційні засоби, які містять в якості активно діючої речовини (АДР) хлорпохідні гідантоїну (Дезактин, Хлорантоїн) [94].

Дезактин – дезінфекційний засіб з мийним ефектом. В якості АД містить дихлорантин. До складу засобу введені аніонні поверхнево активні речовини, диспергатор, наповнювач. Являє собою порошок від білого до жовтуватого кольору із слабким запахом хлору. Розчинність у воді не менше

20 мг/дм. Для прискорення розчинення Дезактину допускається використовувати теплу воду температурою (40 ± 5 °С).

Водні розчини Дезактину прозорі, безбарвні, мають помірний запах хлору. Засіб належить до помірно небезпечних речовин (3 клас небезпеки) [94].

Рекомендується використовувати 0,2 % розчини Дезактину для поточної дезінфекції поверхонь приміщення (стіни, підлога, вікна, двері), інвентарю, обладнання, комунікацій та внутрішньоцехової тари [93].

Гарантійний термін зберігання 3 роки з дати виготовлення. Зберігають в пакуванні виробника у критих складських приміщеннях не більше, ніж у 3 яруси осторонь від джерел відкритого вогню та тепла [94].

Перекис водню являє собою безбарвну прозору рідину, яка містить 30 – 40 % АДР.

Перекис водню відноситься до високонебезпечних речовин (2 клас небезпеки). Подразнює шкіру, слизову оболонку очей та верхніх дихальних шляхів [93].

Гарантійний термін зберігання 6 місяців з дати виготовлення. Зберігають у складських приміщеннях, які забезпечують захист від дії сонячних променів, при температурі не вище 30 °С. Допускається зберігання перекису водню на відкритих майданчиках оснащених наметом, що виключає дію прямих сонячних променів, у складських ємкостях з ізотермічним пристроєм, який забезпечує температуру не вище + 30 °С і не нижче –30 °С.

Допускається зберігати невикористані розчини лужних мийних засобів (кальцинована сода, каустична сода) та мийних засобів на основі поверхнево-активних речовин (синтетичні порошки типу А, Б, В) протягом 14 діб з моменту приготування, мийних засобів з протеолітичними ферментами (Біомой) – протягом 1 доби з моменту приготування, розчинів хлорактивних дезінфекційних засобів і перекису водню – протягом 1 доби з моменту приготування, розчинів дезінфекційних засобів з групи четвертинних амонійних сполук – протягом 14 діб з моменту приготування [93].

Дезінфекційні й антисептичні засоби необхідно чергувати кожні 1 – 3 місяці з метою недопущення формування і поширення стійких форм мікроорганізмів.

Отже, в даному випадку, для миття обладнання, комунікацій, інвентарю при виробничому культивуванні доцільно використовувати кальциновану соду, оскільки вона більш дешева і ефективна при митті обладнання та комунікацій, а при виробництві ЛЗ – перекис водню; для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей – Дезактин при виробничому культивуванні, оскільки він є дешевим мийно-дезінфікувальним засобом, що дає змогу заощадити кошти, а при виробництві вакцини доцільно використовувати розчин Санокварт.

7.4. Обґрунтування вибору підготовки вентиляційного повітря

Повітря виробничих приміщень – потенційне джерело забруднення ліків, тому його очищення є одним з ключових завдань підготовки виробництва. Рівень чистоти повітря, що знаходиться в приміщенні, визначає клас чистоти [72].

Повітрязабірні пристрої проточної вентиляції повинні бути розташовані на висоті 2 м над дахом у місцях з максимальною чистотою повітря з урахуванням напрямку вітру.

Для стерилізації повітря використовують два методи: знищення мікрофлори за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання та вилучення її методом фільтрування.

У виробничих умовах доцільно використовувати перший метод, наприклад, ультрафіолетове опромінення. Для знезараження встановлюють неекрановані ультрафіолетові бактерицидні випромінювачі з розрахунку потужності 2 – 2,5 Вт на 1 м³ об'єму приміщення, які вмикають на 1 – 2 год. до початку роботи, коли немає людей. Вимикач для цих випромінювачів має бути розміщений перед входом у приміщення [95].

У присутності персоналу можна використовувати екрановані бактерицидні випромінювачі, які встановлюються на висоті 1,8 – 2,0 м від підлоги, з розрахунку 1 Вт на 1 м³ об'єму приміщення, за умови виключення

спрямування випромінювання на людей, які перебувають у приміщенні. Під час роботи випромінювачів вентиляція повинна бути увімкнена [95].

При виробництві стерильної продукції використовують системи ламінарної вентиляції, що забезпечують спрямовані до робочої зони приміщення потоки стерильного повітря (які попередньо проходять через фільтри різного ступеня очищення) і витискують всі механічні і мікробні контамінанти, що знаходяться в повітрі приміщення [72].

Приміщення з ламінарним потоком – приміщення, у яких повітря подається в напрямку до робочої зони через фільтри, що займають всю стіну або стелю, і видаляється через поверхню, протилежну входів повітря. Розрізняють дві системи: вертикальний ламінарний потік, при якому повітря рухається вгору через стелю і виходить через ґратчасту підлогу, і горизонтальний ламінарний потік, при якому повітря надходить через одну, а виходить через протилежну перфоровану стінку [72].

Системи ламінарного повітряного потоку повинні забезпечувати рівномірну швидкість руху повітря: близько 0,30 м/с для вертикального і близько 0,45 м/с для горизонтального потоків.

У приміщеннях класу чистоти D подають повітря, що пройшло один ступінь очищення. Очищення повітря, що подається в приміщення С класу чистоти, двоступеневе, а в приміщеннях А і В класу чистоти – тільки 3-х ступеневе [72].

На першому ступені використовують, як правило, фільтри попереднього очищення типу ФМ (мішечні фільтри), ФРП (сухі рулонні фільтри), ФЯВ, ФЯП, ФЯЛ або ФЯУБ (осередкові фільтри), передфільтри «PREFIL» і «KOFIL», які звільняють повітря від механічних частинок. Їх встановлюють на вході в кондиціонер або припливну вентиляційну камеру [72].

Другий ступінь підготовки повітря здійснюється комбінованими фільтрами типу ФР5, ФПП, а також фільтрами типу «MULTISACK», які призначені для тонкої фільтрації повітря від бактерій і твердих частинок при концентрації пилу

0,5 мг/м³. Останнім часом широкого поширення набули ефективні повітряні фільтри HEPA, VERA, ULPA.

Третій ступінь здійснюється стерилізуючими повітряними фільтрами різних конструкцій, наприклад «HEPA», «SUPER-ULPA» з ефективністю очищення 99,99 %, які встановлюють безпосередньо в місці подачі повітря в робочу зону [72].

Отже, в приміщенні класу чистоти A/B використовують повітряні фільтри ULPA, а в приміщенні класу чистоти D – HEPA.

7.5. Обґрунтування вибору підготовки води

Вода є одним з основних продуктів, що використовуються фармацевтичною промисловістю. Вона може бути присутньою як допоміжна речовина, або використовуватися для підготовки препаратів до застосування, в процесі синтезу, у ході виробництва готової продукції або як очищувальний засіб для промивання ємностей (резервуарів), обладнання, первинних пакувальних матеріалів [96].

Воду, яку використовують у фармацевтичній промисловості поділяють на наступні види: вода питна, вода очищена, вода очищена стерильна, вода для ін'єкцій, стерильна вода для ін'єкцій, бактеріостатична вода для ін'єкцій [97].

Воду очищену в промислових умовах, в основному, отримують з питної (водопровідної) або демінералізованої (знесоленої) води, яка пройшла спеціальну водопідготовку.

Водопідготовкою називають поліпшення якості води, що надходить з вододжерела для виробничого використання [79].

Фармацевтичні компанії очищають воду безпосередньо на виробництві. З огляду на те, що вода природного походження містить цілий ряд забруднюючих речовин, для їх видалення були розроблені численні технології обробки. Стандартна схема очистки води на фармацевтичному підприємстві складається з декількох типових процесів, призначених для видалення різних компонентів. Вибір схеми очищення та загальної конструкції установки є вирішальним фактором у забезпеченні виробництва води належної якості [97].

Вода питна може бути використана у процесах хімічного синтезу та на ранніх стадіях очищення обладнання фармацевтичних виробництв, якщо відсутні особливі технічні вимоги або вимоги щодо застосування води більш високих категорій якості. Вода питна є прийнятним джерелом вихідної води для одержання води фармакопейної якості [96].

Для отримання води питної, набрану з джерела водопостачання піддають обробці за допомогою процесів коагуляції, осадження (освітлення) і фільтрування з метою видалення з неї нерозчинних речовин. Потім за допомогою таких методів, як аерація, хлорування, знищують патогенні мікроорганізми, що знаходяться у воді. Для видалення з води хлору та інших розчинених органічних речовин застосовують фільтри на основі активованого вугілля, хоча вони можуть бути середовищем для розмноження мікроорганізмів. Смакові якості води покращують за допомогою аерації та вугільної очистки [97].

Воду демінералізовану(обезсолену) отримують, як правило, з водопровідної води питної якості, яка попередньо піддається ретельному аналізу, тому що в ній міститься значна кількість розчинених і зважених речовин. Демінералізація води (звільнення від небажаних катіонів та аніонів) в промислових умовах проводиться за допомогою іонного обміну і методів поділу через мембрану [79].

Вода очищена – це вода для виготовлення лікарських препаратів, при виробництві яких до води не висувають вимоги щодо стерильності або апірогенності. Очищену воду, зазвичай отримують шляхом очищення питної води з використанням таких процесів, як дистиляція, деіонізація і зворотній осмос [96, 97].

Високоочищена вода вільна від домішок, органічних і неорганічних речовин повинна відповідати всім вимогам ДФУ. Її отримують комбінованими методами мембранного поділу (наприклад, методом подвійного осмосу з деіонізацією та ультрафільтрацією) на спеціально сконструйованому обладнанні. Для забезпечення належної якості такої води слід використовувати

валідовані процедури і регулярний контроль електропровідності і мікробної чистоти в процесі виробництва [79, 96].

Вода для ін'єкцій повинна відповідати всім вимогам, що пред'являються до води очищеної, а також повинна бути стерильною і апірогенної. Вода для ін'єкцій повинна бути вільною від механічних видимих включень [79].

Вимоги до якості води для ін'єкцій суворіші, ніж до якості води очищеної. У зв'язку з цим відрізняються і методи приготування води (як правило, на останній стадії), що забезпечує високі якісні показники води для ін'єкцій. В останні роки зворотній осмос став найбільш поширеним методом отримання води очищеної, використовуваної для фармацевтичних цілей; його застосовують як завершальну стадію очищення або як процес попередньої підготовки, що передує дистиляції [97].

Дистиляція – процес, який має на увазі випаровування води з подальшою конденсацією отриманого пара. Метод дистиляції є дорогим, проте дозволяє видаляти майже всі органічні та неорганічні домішки і отримувати воду дуже високої якості. Крім того, дистиляція визнана найбільш ефективним методом запобігання забруднення води мікроорганізмами і ендотоксинами [97].

Деіонізація – іонообмінний процес, заснований на здатності деяких видів синтетичних смол до селективної адсорбції катіонів або аніонів і вивільненню (обміну) інших іонів, зумовленого їх відносною активністю. Катіоно- і аніонообмінні смоли використовують для очищення питної води шляхом видалення розчинених у ній іонів. Видаляють також розчинені гази, а хлор в тих кількостях, в яких він міститься у питній воді, нейтралізують безпосередньо іонітом. Деяка кількість органічних і колоїдних сполук відокремлюють за допомогою методів адсорбції і фільтрації. Якщо не вжити необхідних заходів для запобігання забруднення, то шари іоніту можуть стати середовищем розмноження і росту мікроорганізмів і причиною отримання пірогенної води. Ще одним недоліком методу є необхідність використання для регенерації смоли деяких хімічних реактивів [97]. У системах безперервної деіонізації, де поєднані процеси іонного обміну і мембранного поділу, для безперервної

регенерації іонообмінної смоли використовують електричний струм; регенерація здійснюється одночасно з процесом водопідготовки, завдяки чому виключається необхідність застосування сильних хімічних реактивів. В даний час апарати для іонного обміну широко використовують з метою підготовки водопровідної води перед проведенням дистиляції чи зворотного осмосу.

Зворотній осмос. Воду примусово пропускають через напівпроникну мембрану в напрямку, протилежному звичайній осмотичній дифузії. Як правило, використовують мембрани з розміром пор 0,1 – 1 нм, які затримують не тільки органічні сполуки, бактерії і віруси, а й 90 – 99 % всіх розміщених у воді іонів. Зазвичай застосовують двоступеневі системи зворотного осмосу, що є двома послідовними стадіями фільтрування [97].

Мембранна фільтрація. Мембранні фільтри – це фільтри поверхневого типу, які не пропускають частинки більшого розміру, ніж величина пор передньої поверхні полімерної мембрани. У мікрофільтрації використовують мембрани з діаметром пор 0,1 – 1 мкм, які можуть затримувати частинки пилу, активованого вугілля, дрібні частинки іонітів і більшу частину мікроорганізмів [97]. Для ультрафільтрації використовують мембрани, які затримують не тільки тверді частинки, але також розчинені речовини з високою молекулярною масою.

Для виробництва вакцини проти гепатиту В на основі наноемульсії використовують воду очищену, яку отримують шляхом очищення питної води з використанням таких процесів, як деіонізація і зворотній осмос.

7.6. Розрахунок річної потужності виробництва вакцини та кількості серій на рік

Відповідно до ТЕО 1 людині на рік вводять 3 дози вакцини, то для вакцинації 325 578 осіб загальна кількість вакцини становитиме:

$$325\ 578 \times 3 \text{ дози} = 976\ 734 \text{ доз}$$

Назальна нановакцина проти гепатиту В складається із поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) вад'юванті наноемульсії і є ефективною при меншій кількості введення. Наноемульсія виготовлена з поверхнево-

активних речовин, води очищеної, соєвої олії та етанолу в якості розчинника [53].

Річна потреба в антигені, згідно ТЕО складає, $G_{ар} = 21$ г/рік. Відповідно до АНД одна доза нановакцини включає $G_{ар1} = 20$ мкгНВsAg в ад'ювантаноемульсії, склад якої представлено в таблиці 7.3.

Таблиця 7.3

Склад нановакцини проти гепатиту В на основі наноемульсії

Компоненти нановакцини	Вміст компонентів, %	Кількість компонентів в 1 дозі (8 мкл), мкл
Цетилпіридиній хлорид	1	0,08
Полісорбат (Твін-80)	5	0,40
Етанол	8	0,64
Соєва олія	64	5,12
Вода очищена	12	0,96
Наноемульсія	90	7,20
НВsAg, мг АСР (АСБ)	0,25	0,02
Натрій-фосфатний буфер	9,75	0,78
Нановакцина	100	8,00

Загальна кількість доз

$$N_{\text{доз}} = \frac{G_{ар} \cdot 1000}{G_{ар1}} = \frac{21 \cdot 1000}{0,02} = 1\,050\,000 \text{ доз}$$

Кількість доз у серії, при кількості серій $n_c = 12$

$$N_{\text{дозс}} = \frac{N_{\text{доз}}}{n_c} = \frac{1\,500\,000}{12} = 67\,500 \text{ доз}$$

Кількість вакцини на 1 серію $V_{\text{вк}} = 67500 \times 0,008 \text{ мл} = 540 \text{ мл}$

Враховувивтратинановакцини при їїприготуванні $E_{\text{ем}} = 1\%$ та розливі у спрей-флакони $E_p = 1\%$ кількість компонентів нановакцини на 1 серію складе 551 мл.

Таблиця 7.4

Кількість компонентів нановакцини на серію

Компоненти наноемульсії	%	Кількість компонентів в 1 дозі (8 мкл), мкл	Кількість компонентів на серію з врахуванням втрат, мл
Цетилпіридиній хлорид	1	0,08	5,5
Полісорбат (Твін-80)	5	0,40	27,6
Етанол	8	0,64	44,1
Соева олія	64	5,12	352,6
Вода очищена	12	0,96	66,1
Наноемульсія	90	7,20	495,9
HBsAg, г АСР (АСБ)	0,25	0,02	1,38
Натрій-фосфатний буфер	9,75	0,78	53,72
Антиген	10	0,80	55,10
Вакцина	100	8,00	551,0

7.7. Матеріальний баланс на серію виробництва вакцини

Загальна потреба в антигені на рік $G_{ар} = 21$ г

Вміст однієї дози $G_{ар1} = 20$ мкг HBsAg в ад'юванті наноемульсії

Загальна кількість доз

$$N_{доз} = \frac{G_{ар} \cdot 1000}{G_{ар1}} = \frac{21 \cdot 1000}{0,02} = 1\ 050\ 000 \text{ доз}$$

Кількість доз у серії, при кількості серій $n_c = 12$

$$N_{дозс} = \frac{N_{доз}}{n_c} = \frac{1\ 050\ 000}{12} = 87\ 500 \text{ доз}$$

Об'єм 1 дози $V_{1д} = 8$ мкл

Втрати нановакцини при її приготуванні $E_{ем} = 1\%$ та розливі у спрей-флакони $E_p = 1\%$

Втрати при розливі $E_p = 1\%$

Геометричний об'єм спрей-флакона – 1 мл

Кількість доз у 1 спрей-флакони – 50 доз

Об'єм нановакцини в 1 спрей-флакони

$$V_{нв} = V_{1д} \cdot n_{дсф} = 8 \cdot 50 = 400 \text{ мкл} = 0,4 \text{ мл}$$

Кількість спрей-флаконів за серію при $V_{вк} = 540$ мл

$$n_{\text{сфсер}} = \frac{V_{\text{ВК}}}{V_{\text{НВ}}} = \frac{540}{0,4} = 1\,350 \text{ флаконів}$$

Кількість спреї-флаконів на рік

$$n_{\text{сфр}} = n_{\text{сфсер}} \cdot n_{\text{сер}} = 1\,350 \cdot 12 = 16\,200 \text{ флаконів}$$

Таблиця 7.5

Кількість компонентів нановакцини на серію

Компоненти наноемульсії	%	Кількість компонентів в 1 дозі (8 мкл), мкл	Кількість компонентів на серію з врахуванням втрат, мл
Цетилпіридиній хлорид	1	0,08	5,5
Полісорбат (Твін-80)	5	0,40	27,6
Етанол	8	0,64	44,1
Соєва олія	64	5,12	352,6
Вода очищена	12	0,96	66,1
Наноемульсія	90	7,20	495,9
НВsAg, г АСР (АСБ)	0,25	0,02	1,38
Натрій-фосфатний буфер	9,75	0,78	53,72
Антиген	10	0,80	55,10
Вакцина	100	8,00	551,0

Таблиця 7.6

МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА ОДНУ СЕРІЮ НАНОВАКЦИНИ

№ з/п	Використано		Отримано	
	Назва сировини і напівпродукту	Кількість, г, мл	Назва кінцевого продукту, відходів та втрат	Кількість, г, мл
1.	<i>ПРИГОТУВАННЯ НАНОЕМУЛЬСІЇ</i>			
1.1.	Цетилпіридиній хлорид	5,5	Отримано наноемульсії	495,9
1.2.	Полісорбат (Твін-80)	27,6		
1.3.	Етанол	44,1		
1.4.	Соєва олія	352,6		
1.5.	Вода очищена	66,1		
	Всього:	495,9	Всього:	495,9
2.	<i>ПРИГОТУВАННЯ НАНОВАКЦИНИ</i>			
2.1.	Внесено наноемульсії	495,9	Отримано нановакцини	551,0

2.2.	Внесено антигену в натрій-фосфатному буфері	55,1		
	Всього:	551,0	Всього:	551,0
3.	<i>РОЗЛИВ НАНОВАКЦИНИ У СПРЕЙ-ФЛАКОНИ</i>			
3.1.	Використано нановакцини	551,0	Отримано нановакцини	540
	Об'єм однієї дози (8x50/1000)мл	0,40	Отримано доз	1 350
	Втрати	0,02	Втрати нановакцини	11,0
	Всього:	551,0	Всього:	551,0
	Використано спреї-флаконів	1378	Отримано спреї-флаконів	1350
	Втрати	0,01	Втрати спреї-флаконів	15
	Всього:	1 378		1378

7.8. Специфікація обладнання ділянки виробництва вакцини

Таблиця 7.5

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевією сіткою для видалення механічних домішок
Ф-2,3	Фільтр попереднього очищення	1	Фільтруючий матеріал – волокнистий, швидкість фільтрування 0,1 м/с, Е = 90 %.
В-4	Вентилятор	1	Вентилятор ВПА 100-1,8-1 фірми Вентс (Україна). Продуктивністю 190 м ³ /год [98].
К-5	Компресор	1	Компресор фірми Cooper&Hunter (США). Тиск – 75 кПа, швидкість випаровування – 83,6 л [99].
Ф-6	Фільтри грубого очищення (G3)	1	Мінімальне і максимальне значення перепаду тиску на фільтрі (40 – 200 Па) [100]. Ефективність очистки – 50 %.

Ф-7	Фільтри тонкого очищення (F9)	2	Мінімальне і максимальне значення перепаду тиску на фільтрі (150 – 450 Па) [100]. Ефективність очистки – 98 %.
Ф-8	Фільтри високоефективного очищення (H14)	1	Мінімальне і максимальне значення перепаду тиску на фільтрі (250 – 600 Па) [100]. Ефективність очистки – 99,995 %.
Зб-10	Збірник, що містить воду питну	1	Збірник оснащений перемішувачем.
Зб-17	Збірник, що містить воду очищену	1	Збірник оснащений перемішувачем.
Ф-12	Піщаний фільтр	1	Фільтруючий матеріал – кварцевий пісок, швидкість фільтрування 20 – 50 м ³ /год, ступінь очистки 50 мкм.
Ф-13	Вугільний фільтр	1	Фільтруючий матеріал – активоване вугілля, ступінь очистки 10 мкм.
ІК-14	Іонообмінні колонки	1	Іонообмінна колонка для пом'якшення води Lewatit Clack V1DM-FCI 0844 фірми Екволс. Продуктивність 0,8 м ³ /год, тиск – 6 атм. [101]
УЗО-16	Установка зворотнього осмосу	1	Установка зворотнього осмосу фірми Aqua-line, модель ECOSOFT MO2500LPD MINI. Продуктивністю 100 л/год [102].
Н-11,15, 18,20,23	Насос перистальтичний	5	Перистальтичний насос фірми RSM серії Speroni (Італія), продуктивність – 0,6 м ³ /год [103].
Р-19	Реактор-змішувач для змішування компонентів наноемульсії	1	Збірник оснащений перемішувачем. Збірник об'ємом 1 л.

Г-21	Гомогенізатор під високим тиском	1	Гомогенізатор фірми ІКА (Німечинна), модель НРН 2000/4-SH5. Продуктивністю – 6 л/год, максимальний робочий тиск – 2000 бар [104].
Р-22	Реактор-змішувач для приготування нановакцини	1	Збірник оснащений перемішуючим пристроєм. Збірник об'ємом 1 л.
УР-24	Установка для розливу у флакони	1	Автомат по розливу субстанції у флакони з мікродозатором. Продуктивність установки до 2000 фл/год.
ПС-25	Стіл для пакування продукції	1	Габаритні розміри, мм: 1500×1500×850
УС-26	Машина для нанесення етикеток	1	Автомат для нанесення етикеток LS-108R (Україна) [105]. Продуктивність до 10000 шт./год.
Р-27	Реактор-змішувач для приготування розчину перекису водню	1	Реактор об'ємом 8 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм.
Р-28	Реактор-змішувач для приготування розчину Санокварт	1	Реактор об'ємом 5 л, оснащений сорочкою та перемішуючим пристроєм.
КП-29	Ваги лабораторні	1	Матеріал – нержавіюча сталь. Модель SF-400 D3. Діапазон зважування від 0,1 до 3 кг [106].

7.9. Опис технологічного процесу виробництва вакцини

7.9.1. Опис допоміжних робіт (підготовки виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря, підготовки води)

ДР 1. Санітарна підготовка виробництв

ДР 1.1. Підготовка персоналу

ДР 1.1.1. Навчання персоналу

Навчання персоналу відбувається постійно та проводиться протягом усієї трудової діяльності, воно спрямоване на забезпечення, підтримання на

належному рівні та вдосконалення професійних якостей персоналу для ефективного виконання робочих обов'язків та перспективних планів і завдань підприємства. Існує два види навчання: первинна підготовка персоналу (процес введення у посаду, професійне навчання, стажування нових фахівців) та періодичне подальше навчання персоналу здійснюється для підтримання кваліфікації персоналу на рівні, достатньому для ефективного виконання посадових обов'язків, щорічне навчання з питань GxP.

ДР 1.1.2. Перевірка знань персоналу

Перевірка знань персоналу проводиться після закінчення випробувального терміну (зазвичай 3 місяці), а також щорічно з метою підтримання у працівників підприємства кваліфікаційних знань і навичок на належному рівні. Відповідною комісією проводиться перевірка практичних навичок персоналу із знання технології виробничих процесів та знань нормативної документації, необхідної для ведення технологічного процесу.

ДР 1.1.3. Санітарно-гігієнічний стан персоналу

При влаштуванні на роботу персонал повинен пройти медичний огляд. Персонал, зайнятий безпосередньо у виробництві, включаючи тимчасово працюючих, повинен регулярно проходити медичні огляди.

Перед влаштуванням на роботу персонал має бути навчений правилам особистої гігієни та в подальшому проходити систематично санітарно-гігієнічне навчання і дотримуватися гігієнічних вимог, котрі відповідають його діяльності.

ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів

Приготовані миючі та дезінфікуючі засоби використовують з метою санітарної обробки (миття та дезінфекції) приміщень, технологічного обладнання, комунікацій, інвентарю, санітарно-технічного обладнання.

ДР 1.2.1. Приготування розчину Санокварту

Розчин Санокварту має концентрацію 2 %. Для приготування 1 л розчину у збірник (P-28) наливають 980 мл води питної і додають 20 г Санокварту. Розчин перемішують протягом 1 хв. Допускається зберігати невикористаний

розчин протягом 14 днів у тарі зі щільно закритою кришкою. Готовий розчин направляється до ДР 1.3.

ДР 1.2.2. Приготування розчину перекису водню

Розчин перекису водню має концентрацію 6 %. Для приготування 1 л робочого розчину перекису водню в збірник (Р-27) наливають 829 мл води питної і додають 171 мл 35 %-го розчину перекису водню. Розчин перемішують протягом 1 – 2 хв. Готовий розчин направляється до ДР 1.4.1.

ДР 1.3. Підготовка приміщень

Для того, щоб підготувати приміщення для виробництва потрібно пройти ряд заходів щодо забезпечення чистоти і зведення до мінімуму механічних та мікробних забруднень, що складається з вологого прибирання, дезінфекційної обробки поверхонь приміщень. Підготовка виробничих приміщень поділяється на щоденну (1 раз на зміну) та генеральну (1 раз на тиждень).

ДР 1.3.1 Щоденне прибирання

Підготовку виробничих приміщень слід проводити в одязі, передбаченому для виробничих приміщень того ж класу чистоту. Щоденне прибирання виконується за допомогою розчину Санокварту від ДР 1.2.1.

По-перше, з поверхні прибираються розсипані порошки і механічні забруднення за допомогою пилососа, витираються пролиті рідини. Далі проводиться вологе прибирання: стіни, двері, столи та інші поверхні приміщення миють поролоновою губкою, яка добре змочена розчином мийного засобу, потім промивають теплою водою, висушують або витирають досуха та проводять дезінфекцію поверхонь.

По-друге, проводиться підготовка обладнання та інвентарю.

По-третє, прибирання підлоги проводиться щозмінно. Підлогу миють теплою водою з мийним засобом, потім промивають теплою водою, витирають досуха і проводять дезінфекцію. Щоразу починаючи з віддаленої від дверей площі.

Відпрацьований розчин направляється на знешкодження відходів, вимиті приміщення маркують, вказуючи його готовність до роботи.

ДР 1.3.2. Генеральне прибирання

Обробку виробничих приміщень також виконують розчином Санокварту від ДР 1.2.1.

Проводиться миття стелі, дезінфекційна обробка підлоги всієї ділянки. Також проводять прибирання і наведення порядку в шафах, стелажах, очищення та дезінфекційну обробку повітроводів і вентиляційних камер та виконують усі заходи щотижневої підготовки приміщень. Відпрацьований розчин направляється на знешкодження відходів.

ДР 1.4. Підготовка обладнання та комунікації

Підготовка обладнання як складова санітарної підготовки виробництва направлена на досягнення необхідного рівня чистоти та асептичності.

ДР 1.4.1. Миття та ополіскування

Через збірники пропускають миючий засіб. З'ємні частини (вузли) обладнання вимиваються в розчині миючого засобу при температурі 60 °С протягом 40 – 50 хв.

Обробку обладнання проводять 6 % розчином перекис водню. Для цього в дане обладнання по завантажувальній лінії подають розчин перекис водню за температури 20 °С, після чого його заповнюють водою до необхідного рівня. Розчин перекису водню перемішують за допомогою мішалки чи подачею повітря через барботер упродовж 15 хв.

Ополіскування проводиться очищеною водою. З'ємні частини (вузли) обладнання, що безпосередньо стикаються з виробничою сировиною, слід зняти, розібрати і ретельно вимити з розчином перекис водню при температурі 36 °С, протягом 30 хв. Відпрацьована вода йде на знешкодження відходів до ЗВ 7.1.

ДР 1.4.2. Стерилізація

Стерилізацію обладнання проводять шляхом подання гострої пари при $t = 131$ °С і тиску 0,2 МПа, впродовж 30 хв. Після стерилізації конденсат, що утворився, подається до знешкодження.

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 2.1. Забір повітря

Повітрязабірні пристрої розташовують на висоті 2 м над дахом у місцях з максимальною чистотою повітря з урахуванням напрямку вітру.

ДР 2.2. Попереднє очищення повітря

На цій стадії на фільтрах (**Ф-2,3**) з повітря видаляється основна маса великих фракцій механічних та пилу.

ДР 2.3. Нагнітання повітря

Нагнітання повітря здійснюється за допомогою вентилятора (**В-4,9**), повітря стискають до 0,35 МПа, при температурі 200 °С.

ДР 2.4. Конденсування повітря

Після нагнітання повітря охолоджується в компресорі (**К-5**) до температури 25 °С.

ДР 2.5. Очищення повітря в фільтрах грубої очистки

Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі (**Ф-6**). Ефективність очистки – 50 %, тиск – 200 МПа.

ДР 2.6. Очищення повітря в фільтрах тонкого очищення

Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі (**Ф-7**). Ефективність очистки – 98 %, тиск – 450 МПа.

ДР 2.7. Очищення повітря в фільтрах високоефективного очищення

Подальше очищення повітря відбувається у фільтрі (**Ф-8**). Ефективність очистки – 99,95 %, тиск – 600 МПа.

ДР 3. Підготовка води очищеної

ДР 3.1. Забір води

Джерелом питної води є міська мережа водопостачання ПАТ «Київводоканал».

ДР 3.2. Очищення води від механічних частинок

На цій стадії на фільтрі (**Ф-12**) з води видаляється основна маса великих фракцій механічних. Даний тип фільтрації дозволяє видаляти з води частинки розміром більше 50 – 100 мкм. Для фільтрації використовують піщаний фільтр.

ДР 3.3. Очищення води на вугільних фільтрах

Фільтрація через вугільний фільтр (**Ф-13**) дозволяє знизити концентрацію органічних речовин і хлору. Використовуються стандартні патронні фільтри з активованим вугіллям. Дозволяє видалити з води частки розміром 10 мкм.

ДР 3.4. Очищення води на іонообмінних колонках

Вода через фільтр (**Ф-13**) з розміром пор 10 мкм, поступає на дві установки пом'якшення (**ІК-14**), що підключені паралельно. Кожна з установок складається з двох колон, в які завантажений іонообмінний матеріал. В процесі пом'якшення з води видаляються катіони твердості (Ca^{2+} , Mg^{2+}) і заміщаються на іони Na^+ .

ДР 3.5. Зворотній осмос

На стадії зворотного осмосу (**УЗО-16**) вода очищається від органічних сполук і солей. Видалення домішок відбувається за рахунок пропускання води через напівпроникну мембрану при тиску, що перевищує осмотичний. Для збільшення ефективності процесу використовується тангенціальна подача води до поверхні мембрани при рециркуляції. Устаткування являє собою системи мембран. Мембрани мають розміри пор 0,0005 – 0,001 мкм.

ДР 3.6. Зберігання та розподіл води очищеної

Після зворотного осмосу вода очищена надходить у нержавіючі ємкості для зберігання очищеної води, звідки розподіляється по стадіях виробництва.

7.9.1. Опис основних стадій процесу виробництва вакцини

ТП 4. Приготування наноемульсії

ТП 4.1. Змішування компонентів наноемульсії

На технічних вагах зважуємо цетилпіридиній хлорид та полісорбат. Зважений цетилпіридиній хлорид додають у збірнику (**Р-19**), в якому міститься етанол. Цетилпіридиній хлорид розчиняють при безперервному перемішуванні за кімнатної температури. Зважений полісорбат та соєву олію додають до розчину цетилпіридиній хлориду. Суміш перемішують протягом 20 хвилин при температурі 20 – 25 °С.

ТП 4.2. Гомогенізація під високим тиском

Після змішування компоненти наноемульсії передають за допомогою насосу (Н-20) в гомогенізатор (Г-21). Формування емульсії здійснюється під високим тиском, за температури 5 °С, при тиску 150 МПа, розмір краплин має становити 400 нм.

ТП 5. Приготування нановакцини

Білок HBsAg зі збірника (ЗБ-47) за допомогою насосу (Н-48) перекачують у реактор-змішувач (Р-22), куди також передають із гомогенізатора (Г-21) емульсію. Приготування вакцини проти гепатиту В на основі наноемульсії здійснюють шляхом змішування білку HBsAg з емульсією протягом 30 – 60 хв.

ПМВ 6. Пакування та маркування готової продукції

ПМВ 6.1. Розлив та закупорювання розчину у флакони

Флакони після стерилізації поступають в чисту зону, в якій розміщені ламінари. Під ламінаром здійснюється наповнення флаконів розчином (УР-24). Після розливу субстанції, на флакони встановлюють мікродозатори. Далі флакони з мікродозатором передають на закупорювання.

ПМВ 6.2. Пакування в первинну упаковку

Після закупорювання флакони передають на упаковку. Флакони поміщають у картонні коробки разом з інструкцією для медичного застосування.

ПМВ 6.3. Пакування у групову тару

Далі картонні коробки пакують в групову тару (гофрокороби). На короб наклеюють етикетку-бандероль, де вказують назву продукту, масу, номер партії, дату виготовлення та термін придатності.

ЗВ 7. Знешкодження відходів

ЗВ 7.1. Знешкодження рідких відходів

Виробничі стоки на ділянці виробництва готових лікарських препаратів утворюються на стадії санітарної підготовки та промивки обладнання та разом з загальнозаводськими стоками скидаються в міську каналізацію.

ЗВ 7.2. Знешкодження газоподібних відходів

Каталітичні методи є найперспективнішими для процесів очищення вихідних газів. Даний метод заснований на хімічних перетвореннях токсичних домішок у нетоксичні на поверхні твердих каталізаторів. В результаті реакцій, домішки, що перебувають в газі перетворюються на інші сполуки, що становлять меншу небезпеку, або легко відокремлюються від газу. Причому речовини, які беруть активну участь у хімічній реакції (каталізатори), залишаються незмінними після закінчення процесу.

ЗВ 7.3. Знешкодження твердих відходів

Тверді некондиційні відходи виробництва збираються та направляються на полігон твердих побутових відходів.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ВАКЦИНИ

8.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва

Ступінь чистоти субстанції охарактеризований за допомогою методів визначення частки потенційних забруднюючих білків методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ). Ступінь очищення HBsAg повинен бути не менше 95 %.


Вміст HBsAg в субстанції визначають методом імуноферментного аналізу (ІФА). Як зразок порівняння може використовуватися високоочищений референс-препарат з відомим вмістом HBsAg і білка [107].

Електрофорез в поліакриламідному гелі

Метод визначення білка HBsAg проводять з використанням електрофорезу в поліакриламідному гелі і методу Вестерн-блоту. Метод заснований на комбінації гель-електрофорезу та імунохімічної реакції «антиген-антитіло». За допомогою гель-електрофорезу білки розподіляються в поліакриламідному гелі. Далі білки переносять на нітроцелюлозну або PVDF мембрану. Потім їх детектують з використанням антитіл методом «сендвіча»: спочатку білки зв'язуються з первинними (моно- або поліклональними) антитілами, які в свою чергу зв'язуються з вторинними антитілами, кон'югованими з ферментами (лужною фосфатазою) [108].

Для електрофорезу зазвичай застосовують поліакриламідний (ПААГ) гель, агарозу, змішаний гель (агароза+ПААГ) та ацетатцелюлозну плівку, яка імпрегнована в поліакриламідний гель [109].

НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сліпчук Т.О.			РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва вакцини	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					108	11
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Поліакриламідний гель (ПААГ) володіє багатьма якостями ідеального носія (табл. 8.1). Маючи властивості молекулярного сита, він забезпечує електрофоретичний поділ білкових сумішей не тільки по заряду, але і за розміром і формою частинок. При електрофорезі в ПААГ великі молекули, розміри яких однакові з діаметром пор гелю, рухаються повільніше, а дрібні молекули вільно і швидко проходять через пори гелю [110].

Таблиця 8.1

Переваги і недоліки використання різних носіїв при електрофорезі

Назва методу, носій	Переваги методу і / або носія	Недоліки
В поліакриламідному (ПААГ) гелі [110]	Хімічно інертний, можна кип'ятити. Можна задати необхідний розмір пор і забезпечити властивості молекулярного сита. Пружний, міцний.	На сьогоднішній день найкращий носій, але готується з акриламиду – отруйної речовини.
В агаровому і агарозному гелях	Задовільна прозорість, висока пластичність, простота виготовлення.	Через негативний заряд на сульфатних і СООН-групах сітки агару виникає електроосмос, що приводить до нерівномірного розподілу електричного поля, а іноді – гідростатичного тиску. Можлива хімічна взаємодія речовин з агаром.
На фільтрувальному або хроматографічному папері	Знижена конвекція, розділені зони можна зафіксувати і пофарбувати. Устаткування простіше.	Непрозорість. Забруднення і неоднорідність паперу заважають поділу.

В поліакриламідному гелі можна проводити як нативний електрофорез, так і електрофорез в денатуруючих умовах.

Нативний електрофорез в ПААГ служить для поділу білків, що не піддаються денатурації (тобто білків в нативному стані). Електрофоретична рухливість білка в нативному стані залежить одночасно від його сумарного

заряду, від молекулярної маси, від просторової конфігурації поліпептидного ланцюга [110].

У разі, коли потрібно фракціонувати білки виключно по молекулярній масі, застосовують ПААГ-електрофорез в денатуруючих умовах. Цей метод дозволяє оцінити кількість поліпептидів в білковій суміші. Денатуруючі умови досягаються шляхом обробки проби додецилсульфатом натрію. Метод заснований на властивостях заряджених частинок (молекул) переміщатися під дією електричного поля. Зазвичай швидкість міграції залежить від трьох параметрів аналізованих білків: величини молекул, форми молекул і сумарного заряду. Електрофорез проводять в тонкому шарі поліакриламідю. Після завершення електрофорезу, зони білків виявляють за допомогою барвника [110].

Прилад для електрофорезу складається з [111]:

1) джерела постійного струму з регульованою напругою і зі стабілізатора напруги;

2) камери для електрофорезу, служать для розміщення пластинки або трубки гелю і підтримки постійних умов проведення аналізу. Камера зазвичай має прямокутну форму, виготовлена зі скла або твердої пластмаси з двома ізольованими буферними резервуарами (анодним і катодним), що містять розчин електроліту. У кожен резервуар занурений електрод, підключений до відповідного полюса джерела струму. Повинен підтримуватись однаковий рівень електролітів в резервуарах, щоб запобігти потоку рідини і гідростатичного тиску на гель. Камера для електрофорезу оснащена кришкою, яка запобігає випаровуванню розчинників і забезпечує рівномірно насичену вологою атмосферу під час всього процесу [111].

3) пристрій для заливки гелю, представляє собою скляну трубку, скляну пластину або пару прямокутних пластин (осередок), котрі служать для формування підтримуючого середовища, в якому безпосередньо проводиться процес електрофоретичного розділення. Пластини можуть бути розташовані в камері вертикально або горизонтально (варіант горизонтального електрофорезу

зазвичай застосовується для агарозних гелів). Перевага горизонтальних пластин в порівнянні з вертикальними полягає у відсутності проблеми герметизації швів, а недолік – у великій поверхні контакту з повітрям і, відповідно, ризику випаровування рідини [111].

Імуноферментний аналіз

Метод імуноферментного аналізу є високочутливим і високоспецифічним імунодіагностичним методом, за допомогою якого проводять якісне і кількісне визначення різних речовин, що володіють властивостями антигену або антитіла. Метод ІФА широко використовується для діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань людини і тварин.

Принцип методу полягає в реакції специфічної взаємодії антигену з антитілом з утворенням імунного комплексу та подальшої детекції отриманого комплексу за допомогою спектрофотометрії.

Метод ІФА включає 3 основні етапи [112]:

- 1) утворення імунного комплексу «антиген (досліджувана речовина) – специфічне до нього антитіло» або навпаки;
- 2) формування зв'язку кон'югату з утворюваним на попередньому етапі імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування (детермінантами);
- 3) перетворення субстрату під дією ферментної мітки в реєстрований сигнал в результаті біохімічної реакції.

Переваги імуноферментного методу [113]:

- ✓ Висока точність отриманих даних;
- ✓ Висока автоматизація процесу та мінімальна участь людини;
- ✓ Безболісність і мала інвазивність при відборі матеріалу.

Недоліки імуноферментного методу:

- ✓ Метод досить дорогий, тому що крім реактивів в лабораторії повинне бути дорогіше обладнання та зразки антигенів, що виготовляються в спеціальних інститутах;
- ✓ Інтерпретацію результатів повинен робити тільки висококваліфікований фахівець, так як для трактування отриманих даних

необхідно володіти спеціальною підготовкою і великим запасом медичних знань в певній галузі;

✓ У більшості випадків дозволяє визначати відповідь організму на патогенний агент, а не на самого збудника.

Отже, доцільним методом для визначення поверхневого антигену вірусу гепатиту В є електрофорез в поліакриламідному гелі з використанням додецилсульфату натрію, оскільки білки після обробки додецилсульфатом натрію знаходяться в повністю денатурованому стані, кількість молекул, пов'язаних з поліпептидом, пропорційно його довжині та молекулярній масі. Також даний метод є більш простим у використанні та не потребує великих фінансових витрат, у порівнянні з методом імуноферментного аналізу.

8.2. Контроль ділянки біосинтезу

Упродовж культивування періодично відбирають проби культуральної рідини (раз в 4 год).

Для мікроскопіювання готується препарат «роздавлена крапля», на середину предметного скла наносять петлею або піпеткою краплю досліджуваного матеріалу, обережно накривають покривним склом та розглядають з об'єктивом 40х.

Також мікробіологічний контроль здійснюють посівом проб культуральної рідини на агаризовані середовища для виявлення сторонніх мікроорганізмів. Для виявлення дріжджів використовуємо агаризоване середовище YPD.

Проте такий спосіб виявлення сторонньої мікрофлори тривалий в часі. Для більш швидкого виявлення сторонніх мікроорганізмів здійснюють мікроскопіювання (метод «роздавлена крапля»).

У разі відсутності в полі зору мікроскопа сторонньої мікробіоти, робиться висновок, що поживне середовище стерильне, а посівний матеріал, який використовується є чистим.

Концентрація біомаси

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії (непрямий метод) з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка.

У пробірки із 9 мл дистильованої води вносимо по 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтується, потім вимірюється оптична густина (при 540 нм), отримані дані перераховують за калібрувальним графіком.

Визначення концентрації джерела вуглецю

Гліцерин аналізують методом газової хроматографії, який заснований на методі розділення, в якому рухомою фазою є газ (газ-носій), а нерухомою фазою, вміщеною в колонку, є тверда речовина або рідина, нанесені на твердий інертний носій або рівномірно покривають внутрішні стінки колонки. Отриману надосаджуючу рідину вводять в петлю хроматографа «Хром-5» з використанням колонки, заповненої полімерним сорбентом «Porapak Q», розмір часток – 0,18 – 0,20 мм. Умови хроматографування: колонка скляна розміром 150×0,3 см, заповнена сорбентом «Porapak Q»; температура колонки – 205 °С; випарника – 250 °С; температура детектора – 250 °С; швидкість газу-носія (аргон) – 30 мл/хв., об'єм проби – 2 мкл [114].

Метод кількісного визначення НВс білка

Метод кількісного визначення білка проводять за методом Лоурі з попередньою десорбцією білка, концентрація білка становить 25 мкг/мл. Метод ґрунтується на визначенні інтенсивності забарвлення, яке дає розчин білка в кольорових реакціях – біуретовій і реакції Фоліна (ароматичні амінокислоти і цистеїн). При взаємодії білка з лужним розчином купрум(II) сульфату утворюються комплексні сполуки (біуретова реакція), які своїми тирозиновими і цистеїновими радикалами відновлюють суміш фосфатно-вольфраматної і фосфатно-молібдатної кислот з утворенням комплексної сполуки синього кольору (реактив Фоліна) [107, 115].

Реактиви: розчин білка, що містить 0,025 – 0,25 мг в 1 мл; 2 %-ий розчин Na₂CO₃ в 0,1 н розчині NaOH; реактив Фоліна.

Хід роботи. 1 мл досліджуваного розчину, що містить 0,025 – 0,250 мг білка, поміщають у пробірку, наливають 2 мл 2 %-ого розчину Na_2CO_3 в 0,1 н розчин NaOH і залишають при кімнатній температурі на 10 хв. Потім додають 0,5 мл реактиву Фоліна, перемішують і через 30 – 40 хв вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння є суміш цих же реактивів без досліджуваного розчину. Після визначення оптичної густини будується калібрувальна крива. На підставі калібрувальної кривої і оптичної густини випробуваного розчину визначають концентрацію білка у випробуваному розчині [115].

Визначення концентрації HBsAg методом електрофорезу в поліакриламідному гелі і метода Вестерн-блоту.

Метод заснований на комбінації гель-електрофорезу та імунохімічної реакції «антиген-антитіло».

Реактиви: буфер для блоту (25 мМ Тріс, 192 мМ гліцин, 10 % етанол, рН 8,3), фарбуючий розчин (0,3 % розчин Понсо S в 1 % оцтовій кислоті), розчин PBST, що містить 10 % сухе знежирене молоко, розчин хромогенного субстрату (3 мг діамінобензидину (ДАБ) і 10 мкл 30 % перекису водню в 10 мл 0,1 М трис- HCl , рН 7,6).

Розподіл білків здійснюється методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (ДСН).

Хід роботи. Поліакриламідний гель після проведення електрофорезу поміщають у ванночку з буфером для блоту (25 мМ Тріс, 192 мМ гліцин, 10 % етанол, рН 8,3). Два листа фільтрувального паперу, вирізані по формі касети для блоту і змочені буфером для блоту, поміщають на ту частину касети, яка буде звернена до анода. Потім на фільтрувальний папір поміщають попередньо змочену тим же буфером нітроцелюлозну мембрану, стежачи за тим, щоб між мембраною і папером не було бульбашок повітря. Після цього на мембрану слід обережно помістити гель, знову звернувши особливу увагу на відсутність бульбашок повітря між гелем і мембраною. Завершують формування «сендвіча» двома шарами змоченого фільтрувального паперу, які

поміщаються на поверхню гелю. Отриманий «сендвіч» затискається в касеті і поміщається між електродами так, щоб мембрана була звернена до анода [108, 116].

Електроперенос білків на нітроцелюлозну мембрану проводять в буфері протягом 30 – 50 хв при постійній напрузі 100 В. Якість електропереносу і розташування білкових смуг оцінюють, фарбуючи нітроцелюлозну мембрану 0,3 % розчином Понсо S в 1 % оцтовій кислоті.

Для блокування місць неспецифічного зв'язування антитіл мембрану інкубують при постійному перемішуванні при кімнатній температурі протягом 30 хв. в PBST (для кращого блокування можна використовувати розчин PBST, що містить 10 % сухе знежирене молоко). Після блокування мембрану інкубували протягом години при кімнатній температурі і постійному перемішуванні в PBST, що містить 1 – 10 мкг/мл специфічних антитіл [116].

Після блокування мембрани 3-хкратно відмивають буфером і переносять в розчин вторинних антитіл, кон'югованих з лужною фосфатазою. У розчині вторинних антитіл мембрану інкубують 1 годину при постійному перемішуванні.

Після ретельної відмивання PBST мембрану переносять в розчин хромогенного субстрату, що містить 3 мг діамінобензидину (ДАБ) і 10 мкл 30 % перекису водню в 10 мл 0,1 М трис-НСl, рН 7,6. Інкубацію проводять при перемішуванні 5 – 10 хв [116].

Мембрану після закінчення інкубації з субстратом слід промити PBST, підсушити, промокнув фільтрувальним папером, і відразу ж зробити електронну копію, скануючи в кольорі. Якщо мембрана повністю висихає, зафарбовані білкові смуги бліднуть, і зображення виходить менш яскравим і контрастним. Даний метод дозволяє проводити якісний та кількісний аналіз отриманих даних в порівнянні зі стандартними білками.

8.3. Контроль ділянки виробництва вакцини (карта постадійного контролю)

Термостабільність

Для досліджень термостабільності вакцини готують пробу шляхом енергійного змішування антигену вірусу гепатиту В (HbsAg) та наноемульсії для досягнення дози 2,5 мг/мл рекомбінантного білка в 20% наноемульсії і кінцевому буферному розчині - фосфорно-сольовий буфер 16. Потім вакцину поміщають в стерильні скляні флакони з кришками з тефлоновим покриттям (Wheaton) і зберігають при $4 \pm 2^\circ\text{C}$, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ або $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Контроль температури протягом періоду дослідження здійснюють за допомогою термографів Lufft OPUS10 (PalmerWahl). Через 6 тижнів, 12 тижнів (3 місяці), 24 тижні (6 місяців) і 52 тижні (1 рік) відбирають аліквоту та проводять дослідження *in vitro* та *in vivo* [53].

Дослідження імуногенності *in vivo* проводять за допомогою інтраназальних вакцинацій (вакцинація в 0 точці та ревакцинація через 6 тижнів) приблизно 8-тижневих самок мишей CD-1 (n = 10 на групу) і дослідження титрів сироваткового IgG на 2, 3, 5, 8, 10 і 12 тижнях.

Вакцина має зберігати повну імуногенність протягом року при 4°C , 6 місяців при 25°C і 6 тижнів при 40°C [53].

Таблиця 8.2

Карта постадійного контролю виробництва

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
Кх 1.2.1 Приготування робочого розчину Санокварту	Концентрація розчину Санокварту	Хімічний метод	Після приготування розчину	C = 2 %

Продовження табл. 8.2

Кх 1.2.2 Приготування робочого розчину перекису водню	Концентрація розчину перекису водню	Хімічний метод	Після приготування розчину	$C = 6 \%$
Кх 1.3.1, Кх 1.3.2 Підготовка виробничих приміщень	Підлога, стіни, обладнання, чистота	Візуальний огляд	Після прибирання	Чисте приміщення, відсутність пилу та бруду
Кт 1.4.1 Миття обладнання та ополіскування	Мийний розчин, обладнання, температура мийного розчину, чистота	Термометр технічний	Під час проведення операції обробки	$T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 40 - 50$ хв. $T = 36 \text{ }^\circ\text{C}$, τ $= 30$ хв.
Кт 1.4.2 Стерилізація обладнання	Обладнання, температура стерилізації, час стерилізації	Манометр технічний, годинник	Тиск визначається безперервно під час стерилізації	$P = 0,28$ МПа, $T = 125 -$ $130 \text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 1$ год
Кт 2.2 Попереднє очищення повітря	Повітря на виході з фільтра попереднього очищення, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі попереднього очищення	$E = 80 \%$
Кт 2.3 Нагнітання повітря	Температура, тиск	Термометр технічний, манометр	Після стиснення повітря	$T = 120 \text{ }^\circ\text{C}$, $P = 0,35$ МПа
Кт 2.4 Конденсування повітря	Температура	Термометр технічний	Після конденсування повітря	$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

Кт 2.6 Очищення повітря в фільтрах тонкої очистки	Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E = 98 %
Кт 2.7 Очищення повітря в фільтрах високоефективного очищення	Ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря у фільтрі високоефективного очищення	E = 99,95 %
Кт 3.5 Зворотній осмос (отримання води очищеної)	Тиск	Технологічний контроль	Технологічний контроль під час зворотнього осмосу	P = 2 – 3 МПа
Кт 4.1 Змішування компонентів наноемульсії	Частота обертання мішалки, час	Годинник, технологічний контроль	Технологічний контроль під час змішування	n = 6000 об/хв., t = 1 хв
Кт 4.2 Гомогенізація під високим тиском	Тиск, температура, розмір краплин емульсії	Годинник, термометр технічний, технологічний контроль	Технологічний контроль під час гомогенізації	P = 150 МПа, T = 5 °C, 400 нм
Кт 5 Приготування нановакцини	Час	Годинник, технологічний контроль	Технологічний контроль під час змішування	t = 30 – 60 хв.
Кт 6.1 Розлив та укупорювання субстанції у флакони	Кількість нановакцини у флаконі	Технологічний контроль, перевірка кількості вакцини у флаконі	Під час розливу	V _{нв} = 0,4 мл

РОЗДІЛ 9. СКЛАДАННЯ ПАТЕНТНОЇ ЗАЯВКИ

9.1. Галузь і застосування корисної моделі

Винахід належить до галузі фармацевтичної біотехнології та стосується розробки методу отримання антигену для виробництва вакцин проти вірусних інфекцій, зокрема гепатиту В. Запропонована корисна модель передбачає створення методу ефективного отримання поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) шляхом культивування штамма *Pichia pastoris* GS115-SS1S2, що містить дві генні конструкції білка гепатиту В — SS1 і SS2. Метод дозволяє досягти високих показників чистоти та стабільності антигену, що є ключовим для виробництва наномульсійних вакцинних форм.


Основна сфера застосування отриманого антигену — виробництво вакцин, призначених для імунізації медичних працівників, які перебувають під підвищеним ризиком зараження гепатитом В через контакти з інфікованими пацієнтами та біологічними матеріалами. Особлива увага приділяється створенню високоякісного продукту, що забезпечує стабільний імунний захист.

Отриманий антиген може бути широко використаний у фармацевтичній промисловості для розробки нових поколінь вакцин з покращеною стабільністю та імуногенністю, що сприятиме ефективній профілактиці вірусних інфекцій, а саме гепатиту В.

9.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки

На фармацевтичному ринку більшість комерційно доступних рекомбінантних вакцин проти HBsAg, таких як Recombivax HB (Merck) та Engerix-B (GSK), створені із дріжджових частинок антигену, адсорбованих на ад'юванті солі алюмінію (алюмокалієвий галун). Хоча галун зазвичай добре переноситься і вважається безпечним, було повідомлено про деякі побічні ефекти.

НУХТ БТЕК 02.01.20 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Сліпчук Т.О.			РОЗДІЛ 9. Складання патентної заявки	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Буценко Л.М.					119	6
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Крім того, він викликає переважно поляризацію Th2 імунної відповіді, яка пов'язана з клітинним імунітетом, що є неефективним у створенні відповіді CD8 на вірусно інфіковані клітини. Оскільки клітинний імунітет є важливим для ефективної відповіді проти деяких інфекцій і знищення вірусних патогенів, бажано розробити противірусну вакцину, здатну індукувати клітинно-опосередкований імунітет поряд із надійною та тривалою реакцією антитіл.

Вакцини проти гепатиту В мають порівняльні профілі термостабільності, що потребує безперервного зберігання холодого ланцюга (від 2°C до 8°C) для збереження їхньої ефективності. Вищі витрати, пов'язані з цим, від точки виробництва до точки використання, також сприяють недоступності цих вакцин. Таким чином, ефективна вакцина, яка потребує меншої кількості ін'єкцій і менш суворих вимог щодо холодного зберігання, принесе пряму користь населенню, яке недостатньо обслуговується [53].

Для виробництва вакцини проти гепатиту В, що містить поверхневий антиген вірусу (HBsAg), застосовуються біотехнологічні підходи з використанням різних мікроорганізмів-продуцентів, серед яких найпоширенішими є дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* та *Pichia pastoris*, які забезпечують ефективну експресію антигену.

Saccharomyces cerevisiae AN22rho8O демонструє відносно низьку продуктивність експресії HBsAg, досягаючи концентрації антигену лише 3,4 мг/л за оптимальних умов культивування. Це вимагає значних обсягів культурального середовища, що підвищує витрати на сировину та енергозатрати для культивування протягом 72 годин. Таким чином, економічна доцільність цієї системи для масштабного виробництва залишається під питанням [67].

На відміну від цього, *Pichia pastoris* забезпечує вищий рівень експресії білків і дозволяє використовувати меншу кількість культурного середовища. Наприклад, штам *Pichia pastoris* FHL1 демонструє продуктивність HBsAg на рівні 68 мг/л за культивування в середовищі з казеїновим пептоном, дріжджовим екстрактом та декстозою (20 г/л, 10 г/л та 20 г/л відповідно) за

температури 30 °C і швидкості обертання 200 об/хв. Однак використання такого середовища є досить витратним через вартість компонентів, зокрема казеїнового пептону та дріжджового екстракту, що обмежує економічну доцільність застосування штамму FHL1 у масштабному виробництві вакцини [66].

Описані методи виробництва рекомбінантного HBsAg мають суттєві недоліки, що ускладнюють їхнє широке застосування. Вони характеризуються низькою продуктивністю, вимагаючи значних об'ємів культурального середовища для отримання необхідної кількості білка, а також високою вартістю виробництва, що зумовлена використанням дорогих компонентів поживного середовища та енергоємними процесами культивування та є значним обмеженням. Крім того, існуючі методи демонструють обмежену масштабованість, що ускладнює їхнє застосування для задоволення потреб масової вакцинації.

Недоліки наведених методів полягають не лише у високих виробничих витратах, але й у технологічних складнощах. Обидва методи потребують складного очищення кінцевого продукту, оскільки велика кількість білкових домішок може негативно вплинути на стабільність і чистоту антигену, знижуючи ефективність вакцини. Крім того, технології на основі *Saccharomyces cerevisiae* AN22pho8O та *Pichia pastoris* FHL1 потребують значних енергетичних ресурсів, що призводить до загальних витрат на виробництво і може мати негативний вплив на екологію.

9.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення

Задача корисної моделі полягає у створенні високоефективного методу отримання поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg), який буде придатним для використання у виробництві вакцин. Основна мета — забезпечити високу стабільність, чистоту та біодоступність антигену, що сприятиме покращенню ефективності кінцевих вакцинних продуктів.

Поставлена задача вирішується шляхом культивування модифікованого штаму *Pichia pastoris* GS115-SS1S2, що забезпечує високий рівень експресії

HBsAg у контрольованих умовах. Даний штам містить дві генні конструкції білка гепатиту В SS1 і SS2, та за 72 години синтезує 600 мкг/мл білка, що еквівалентно 0,6 г/л. Після культивування проводиться ефективно вилучення антигену за допомогою гомогенізації, осадження, ультрацентрифугування та гель-фільтрації, що дозволяє отримати продукт з високими показниками чистоти та стабільності для подальшого використання у виробництві вакцинних препаратів [117].

9.4. Опис запропонованого способу

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю запропонованих ознак та очікуваним технічним результатом полягає у забезпеченні ефективного синтезу, вилучення та очищення антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) з клітин дріжджів *Pichia pastoris* GS115-SS1S2. Комплексна методика передбачає ретельний контроль на кожному етапі процесу, що сприяє мінімізації втрат білка, підвищенню його чистоти та стабільності для подальшого використання у виробництві вакцин.

Культивування клітин відбувається за температури 30 °C протягом 72 годин в умовах інтенсивної аерації, що забезпечує достатнє насичення киснем для активного росту дріжджів. Середовище містить гліцерин у концентрації 40 г/л як основне джерело вуглецю. Воно додатково збагачене необхідними мінеральними солями та мікроелементами: фосфорна кислота (85%) в об'ємі 26,7 мл, сульфат кальцію дигідрат ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – 0,93 г, сульфат калію (K_2SO_4) – 18,2 г, сульфат магнію гептагідрат ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 14,9 г, гідроксид калію (KOH) – 4,13 г, сульфат міді пентагідрат ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – 6 мг, йодид натрію (NaI) – 0,08 мг, сульфат марганцю моногідрат ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) – 0,08 мг, молібдат натрію ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – 0,2 мг, борна кислота (H_3BO_3) – 0,02 мг, хлорид кобальту (CoCl_2) – 0,5 мг, хлорид цинку (ZnCl_2) – 20 мг, сульфат заліза гептагідрат ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) – 65 мг, а також біотин у концентрації 0,2 мг. Для стабілізації середовища додається сірчана кислота в об'ємі 5 мл.

Після завершення культивування проводиться відділення біомаси методом сепарації при температурі 30 °C протягом 96 годин із фактором

розділення 4000. Для вилучення внутрішньоклітинного білка застосовується гомогенізація, що проводиться при тиску 1500 бар і температурі 4 °С, з повторенням чотирьох циклів для максимального руйнування клітинних стінок.

Отриманий гомогенат піддається освітленню шляхом осадження білкових домішок сульфатом амонію (14%) за температури 4 °С протягом 4 годин. Після цього ультрацентрифугування з коефіцієнтом розділення 9000 за температури 30 °С протягом 96 годин для видалення решток домішок, що забезпечує максимально ефективний продукт очищення. Наступним етапом є очищення розчину HBsAg за допомогою іонообмінної хроматографії з використанням носія DEAE Sepharose FF, де елюентом виступає розчин NaCl. Після цього розчин концентрується методом ультрафільтрації із застосуванням мембран, виготовлених з ацетатцелюлози, діаметром пор 500 нм, що відповідає молекулярній масі HBsAg у 3010 кДа.

Фінальне очищення проводиться за допомогою гель-фільтрації, використовуючи сефарозу 4 Fast Flow як носій, що дозволяє досягти чистоти HBsAg на рівні 99%. Очищений білок стабілізується у буферному розчині для збереження його активності та якості до моменту використання у вакцинах.

Запропонований метод дозволяє отримати антиген із високою чистотою та стабільністю, придатний для подальшого інкапсулювання в наноемульсійні системи та використання у складі вакцин проти гепатиту В [117].

9.5. Формула корисної моделі

Спосіб отримання високоочищеного поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) передбачає культивування генетично модифікованого штаму дріжджів *Pichia pastoris* GS115-SS1S2, який містить генні конструкції SS1 і SS2, що забезпечують високий рівень експресії білка, досягаючи синтезу 600 мкг/мл (0,6 г/л) HBsAg за 72 години культивування в оптимальних умовах. Після відділення біомаси методом сепарації, внутрішньоклітинний білок вилучають шляхом гомогенізації під тиском 1500 бар за температури 4 °С. Отриманий гомогенат очищають послідовним проведенням наступних процедур: осадження домішок сульфатом амонію, ультрацентрифугування,

іонообмінної хроматографії на носії DEAE Sepharose FF, ультрафільтрації через мембрани з діаметром пор 500 нм та гель-фільтрації на сефарозі 4 Fast Flow.

Запропонований спосіб забезпечує отримання високоочищеного (чистота не менше 99%) поверхневого антигену вірусу гепатиту В, стабільного при подальшому зберіганні.

9.6. Реферат

Запропонований винахід належить до галузі фармацевтичної біотехнології та стосується розробки ефективного методу отримання високоочищеного поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg), який є ключовим компонентом вакцин проти гепатиту В.

Метод базується на культивуванні генетично модифікованого штаму дріжджів *Pichia pastoris* GS115-SS1S2, який спеціально розроблений для високоефективної експресії HBsAg. Штам містить дві генні конструкції (SS1 і SS2), що кодують поверхневий антиген вірусу гепатиту В та дозволяє досягти значної продуктивності. За оптимальних умов культивування, цей штам здатний синтезувати до 600 мкг/мл HBsAg за 72 години.

Після завершення фази культивування, біомасу дріжджів піддають ретельному процесу очищення, який включає кілька послідовних етапів: сепарацію для відділення клітинної маси, гомогенізацію для руйнування клітинних стінок та вивільнення внутрішньоклітинного білка, осадження для видалення домішок, ультрацентрифугування для подальшої очистки, іонообмінну хроматографію для фракціонування білків, ультрафільтрацію для концентрації та гель-фільтрацію для досягнення високого ступеня чистоти. Кожен з цих етапів відіграє критичну роль у видаленні домішок та отриманні високоочищеного продукту.

Запропонований метод дозволяє отримати HBsAg з високою чистотою (не менше 99%), що є необхідною умовою для використання в медичних препаратах. Висока чистота забезпечує ефективність вакцини та мінімізує ризик побічних ефектів. Крім того, отриманий антиген характеризується високою стабільністю, що полегшує його зберігання та транспортування.

Висока продуктивність штаму *Pichia pastoris* GS115-SS1S2 в поєднанні з ефективними методами очищення робить запропонований метод перспективним для масштабного виробництва HBsAg та, відповідно, вакцин проти гепатиту В. Отриманий антиген може бути використаний для створення нових поколінь вакцин з покращеною імуногенністю та стабільністю, що забезпечить більш надійний захист медичних працівників від гепатиту В.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Pattyn, J., Hendrickx, G., Vorsters, A., & Van Damme, P. (2021). Hepatitis B Vaccines. *The Journal of infectious diseases*, 224(12 Suppl 2), S343–S351. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa668>.
2. Zhao, H., Zhou, X., & Zhou, Y. H. (2020). Hepatitis B vaccine development and implementation. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 16(7), 1533–1544. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1732166>.
3. Nanoemulsion-based vaccine for chronic hepatitis B virus. Project Number1R41AI085944-01. Contact PI/Project Leade: BAKER, JAMES R. Awardee Organization: BLUEWILLOW BIOLOGICS, INC. URL: <https://reporter.nih.gov/project-details/7806254>
4. Sambhakar, S., Malik, R., Bhatia, S., Al Harrasi, A., Rani, C., Saharan, R., ... & Sehrawat, R. (2023). Nanoemulsion: an emerging novel technology for improving the bioavailability of drugs. *Scientifica*, 2023. doi: 10.1155/2023/6640103.
5. Lee, K. C., Chen, W. J., & Chen, Y. C. (2017). Using Dextran-encapsulated gold nanoparticles as insulin carriers to prolong insulin activity. *Nanomedicine*, 12(15), 1823-1834. doi: 10.2217/nnm-2017-0019.
6. Sutradhar, K. B., & Amin, M. L. (2013). Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. *European Journal of Nanomedicine*, 5(2), 97-110. doi:10.1515/ejnm-2013-0001.
7. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*, 108(6), 2064-2110. doi: 10.1021/cr068445e.
8. Smith, D. K., & Korgel, B. A. (2008). The importance of the CTAB surfactant on the colloidal seed-mediated synthesis of gold nanorods. *Langmuir*, 24(3), 644-649. doi: 10.1021/la703625a
9. Khani, S., Keyhanfar, F., & Amani, A. (2016). Design and evaluation of oral nanoemulsion drug delivery system of mebudipine. *Drug delivery*, 23(6), 2035-2043. doi: 10.3109/10717544.2015.1088597.

10. Shakeel, F., & Ramadan, W. (2010). Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 356-362. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.010.
11. Primo, F. L., Michieletto, L., Rodrigues, M. A., Macaroff, P. P., Morais, P. C., Lacava, Z. G., ... & Tedesco, A. C. (2007). Magnetic nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1), 354-357. doi: 10.1016/j.jmmm.2006.10.1183.
12. Foscan. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/foscan>.
13. Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K., & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of controlled release*, 252, 28-49. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.
14. Ling Tan, S., Stanslas, J., Basri, M., Karjiban RA, A., P Kirby, B., Sani, D., & Bin Basri, H. (2015). Nanoemulsion-based parenteral drug delivery system of carbamazepine: preparation, characterization, stability evaluation and blood-brain pharmacokinetics. *Current drug delivery*, 12(6), 795-804. doi: 10.2174/1567201812666150901112544.
15. Bernocchi, B., Carpentier, R., & Betbeder, D. (2017). Nasal nanovaccines. *International Journal of Pharmaceutics*, 530(1-2), 128-138. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.012.
16. Gizurarson, S. (2012). Anatomical and histological factors affecting intranasal drug and vaccine delivery. *Current drug delivery*, 9(6), 566-582. doi: 10.2174/156720112803529828.
17. Han, J., Zhao, D., Li, D., Wang, X., Jin, Z., & Zhao, K. (2018). Polymer-based nanomaterials and applications for vaccines and drugs. *Polymers*, 10(1), 31. doi: 10.3390/polym10010031.

18. Mistry, A., Stolnik, S., & Illum, L. (2009). Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *International journal of pharmaceutics*, 379(1), 146-157. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.06.019.
19. Csaba, N., Garcia-Fuentes, M., & Alonso, M. J. (2009). Nanoparticles for nasal vaccination. *Advanced drug delivery reviews*, 61(2), 140-157. doi: 10.1016/j.addr.2008.09.005
20. Kumar, M., Misra, A., Babbar, A. K., Mishra, A. K., Mishra, P., & Pathak, K. (2008). Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *International journal of pharmaceutics*, 358(1-2), 285-291. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.03.029.
21. Wang, Y., Zhang, Z., Luo, J., Han, X., Wei, Y., & Wei, X. (2021). mRNA vaccine: a potential therapeutic strategy. *Molecular cancer*, 20(1), 33. doi: 10.1186/s12943-021-01311-z.
22. Samsa, M. M., Dupuy, L. C., Beard, C. W., Six, C. M., Schmaljohn, C. S., Mason, P. W., ... & Yu, D. (2019). Self-amplifying RNA vaccines for Venezuelan equine encephalitis virus induce robust protective immunogenicity in mice. *Molecular Therapy*, 27(4), 850-865. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.12.013.
23. Luisi, K., Morabito, K. M., Burgomaster, K. E., Sharma, M., Kong, W. P., Foreman, B. M., ... & Yu, D. (2020). Development of a potent Zika virus vaccine using self-amplifying messenger RNA. *Science advances*, 6(32), eaba5068. doi: 10.1126/sciadv.aba5068.
24. Lin, X., Yang, Y., Li, S., Li, Z., Sheng, Y., Su, Z., & Zhang, S. (2022). Oil-in-ionic liquid nanoemulsion-based adjuvant simultaneously enhances the stability and immune responses of inactivated foot-and-mouth disease virus. *International Journal of Pharmaceutics*, 625, 122083. doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122083.
25. Chen, Z., Zhang, S., Li, Z., Ma, G., & Su, Z. (2017). Construction of a stable w/o nano-emulsion as a potential adjuvant for foot and mouth disease virus vaccine. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(5), 897-906. doi: 10.1080/21691401.2016.1188396.

26. Shi, X., Yang, K., Song, H., Teng, Z., Zhang, Y., Ding, W., ... & Guo, H. (2022). Development and efficacy evaluation of a novel nano-emulsion adjuvant for a foot-and-mouth disease virus-like particles vaccine based on squalane. *Nanomaterials*, 12(22), 3934. doi: [10.3390/nano12223934](https://doi.org/10.3390/nano12223934).
27. Brito, L. A., Chan, M., Shaw, C. A., Hekele, A., Carsillo, T., Schaefer, M., ... & Geall, A. J. (2014). A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Molecular Therapy*, 22(12), 2118-2129. doi: [10.1038/mt.2014.133](https://doi.org/10.1038/mt.2014.133).
28. Poecheim, J., Heuking, S., Brunner, L., Barnier-Quer, C., Collin, N., & Borchard, G. (2015). Nanocarriers for DNA vaccines: co-delivery of TLR-9 and NLR-2 ligands leads to synergistic enhancement of proinflammatory cytokine release. *Nanomaterials*, 5(4), 2317-2334. doi: [10.3390/nano5042317](https://doi.org/10.3390/nano5042317).
29. Lopez, P. A., Denny, M., Hartmann, A. K., Alflen, A., Probst, H. C., von Stebut, E., ... & Radsak, M. P. (2017). Transcutaneous immunization with a novel imiquimod nanoemulsion induces superior T cell responses and virus protection. *Journal of Dermatological Science*, 87(3), 252-259. doi: [10.1016/j.jdermsci.2017.06.012](https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.06.012).
30. Pielenhofer, J., Sohl, J., Windbergs, M., & Radsak, M. P. (2020). Current progress in particle-based systems for transdermal vaccine delivery. *Frontiers in immunology*, 11, 516309. doi: [10.3389/fimmu.2020.00266](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00266).
31. Tamayo, I., Gamazo, C., de Souza Reboucas, J., & Irache, J. M. (2017). Topical immunization using a nanoemulsion containing bacterial membrane antigens. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 42, 207-214. doi: [10.1016/j.jddst.2017.02.009](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.02.009).
32. Suciati, T., Aliyandi, A. (2014). Development of transdermal nanoemulsion formulation for simultaneous delivery of protein vaccine and artin-m adjuvant. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6.
33. Lin, C. A., Ho, H. M., Venkatesan, P., Huang, C. Y., Cheng, Y. J., Lin, Y. H., ... & Lai, P. S. (2021). Hyaluronic acid-glycine-cholesterol conjugate-based

nanoemulsion as a potent vaccine adjuvant for T cell-mediated immunity. *Pharmaceutics*, 13(10), 1569. doi: [10.3390/pharmaceutics13101569](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101569).

34. Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M., Watanabe, T., Sakoda, Y., Hatta, M., ... & Kawaoka, Y. (2009). *In vitro* and *in vivo* characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature*, 460(7258), 1021-1025.

35. Das, S. C., Hatta, M., Wilker, P. R., Myc, A., Hamouda, T., Neumann, G., ... & Kawaoka, Y. (2012). Nanoemulsion W805EC improves immune responses upon intranasal delivery of an inactivated pandemic H1N1 influenza vaccine. *Vaccine*, 30(48), 6871-6877. doi: [10.1016/j.vaccine.2012.09.007](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.09.007).

36. Ceja, A. R., Arzate, A. V., & Cornejo, L. C. (2019). Nanoemulsions as coadjuvants in intranasal vaccines. *International Conference Series on Multidisciplinary Sciences*, 6239. doi: [10.3390/mol2net-05-06239](https://doi.org/10.3390/mol2net-05-06239).

37. Ganesan, S., Acosta, H., Brigolin, C., Orange, K., Trabbic, K., Chen, C., ... & Bitko, V. (2022). Intranasal nanoemulsion adjuvanted S-2P vaccine demonstrates protection in hamsters and induces systemic, cell-mediated and mucosal immunity in mice. *Plos one*, 17(11), e0272594. doi: [10.1371/journal.pone.0272594](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272594).

38. Yang, Y., Chen, L., Sun, H. W., Guo, H., Song, Z., You, Y., ... & Zou, Q. M. (2019). Epitope-loaded nanoemulsion delivery system with ability of extending antigen release elicits potent Th1 response for intranasal vaccine against *Helicobacter pylori*. *Journal of nanobiotechnology*, 17, 1-15. doi: [10.1186/s12951-019-0441-y](https://doi.org/10.1186/s12951-019-0441-y).

39. Farazuddin, M., Goel, R. R., Kline, N. J., Landers, J. J., O'Konek, J. J., & Baker Jr, J. R. (2019). Nanoemulsion adjuvant augments retinaldehyde dehydrogenase activity in dendritic cells via MyD88 pathway. *Frontiers in Immunology*, 10, 454731. doi: [10.3389/fimmu.2019.00916](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00916).

40. Yang, L. Y., Zhou, H., Yang, Y., Tong, Y. N., Peng, L. S., Zhu, B. H., ... & Zou, Q. M. (2018). Protective effects of a nanoemulsion adjuvant vaccine (2C-Staph/NE) administered intranasally against invasive *Staphylococcus aureus* pneumonia. *RSC advances*, 8(18), 9996-10008. doi: [10.1039/c7ra13630g](https://doi.org/10.1039/c7ra13630g).

41. Sravanthi, V., Pallavi, M. P., Bonam, S. R., Sathyabama, S., & Kumar, H. M. S. (2015). Oleic acid nanoemulsion for nasal vaccination: Impact on

adjuvanticity based immune response. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 28, 56-63. doi: 10.1016/j.jddst.2015.05.007.

42. Makidon, P. E., Bielinska, A. U., Nigavekar, S. S., Janczak, K. W., Knowlton, J., Scott, A. J., ... & Baker Jr, J. R. (2008). Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine. *PloS one*, 3(8), e2954. doi: 10.1371/journal.pone.0002954.

43. Патент України № 10241. Спосіб прогнозування перебігу вірусного гепатиту в у дітей/ Кузнецов С. В., Вашев Є. А. Опубл. 25.12.1996. https://uapatents.com/2-10241-sposib-prognozuvannya-perebigu-virusnogo-gepatitu-v-u-ditejj.html#google_vignette.

44. Патент України на корисну модель № 15038. Спосіб консервативного лікування хронічних гепатитів/ Жмудовська Т. В., Попадинець М. В. Опубл. 15.06.2006, Бюл. № 6. <https://uapatents.com/3-15038-sposib-konservativnogo-likuvannya-khronichnikh-gepatitiv.html>.

45. Патент України № 12628. Спосіб лікування гострого вірусного гепатиту/ Журбіна А. І., Суремченко М. С., Легеза К. М. Опубл. 28.02.1997. <https://uapatents.com/5-12628-sposib-likuvannya-gostrogo-virusnogo-gepatitu.html>.

46. Патент України на корисну модель № 30769. Спосіб лікування гломерулонефриту з нефротичним синдромом та реплікативною фазою вірусного гепатиту в у дітей/ Фоміна С. П., Лавренчук О. В., Багдасарова І. В. Опубл. 11.03.2008. <https://uapatents.com/3-30769-sposib-likuvannya-glomerulonefritu-z-nefrotichnim-sindromom-ta-replikativnoyu-fazoyu-virusnogo-gepatitu-v-u-ditejj.html>.

47. Патент України на корисну модель № 5616. Спосіб лікування гострого вірусного гепатиту в жовтяничної форми/ Карімов І. З., Андреев І. М. Опубл. 15.03.2005, Бюл. № 3. <https://uapatents.com/2-5616-sposib-likuvannya-gostrogo-virusnogo-gepatitu-v-zhovtyanichno-formi.html>.

48. Патент України на корисну модель № 12947. Вакцина “овісан” асоційована інактивована концентрована проти браздоту, злякисного набряку, некротичного гепатиту, дизентерії ягнят і анаеробної ентеротоксемії овець/

Риженко В. П., Белік С. М., Дементьєва С. А., Риженко В. В. Опубл. 15.03.2006, Бюл. № 3. <https://uapatents.com/3-12947-vakcina-ovisan-asocijiovana-inaktivovana-koncentrovana-proti-bradzotu-zloyakisnogo-nabryaku-nekrotichnogo-gepatitu-dizenteri-yagnyat-i-anaerobno-enterotoksemi-ovec.html>.

49. Патент України на корисну модель № 82907. Вакциний штам vnb-1 *clostridium novyi* (тип в) для виготовлення полівалентної концентрованої гідроксид-алюмінієвої формолвакцини проти браздоту, інфекційної ентеротоксемії, некротичного гепатиту, злякисного набряку овець і дизентерії ягнят/ Лозовицька Н. С., Мандигра М. С., Бойко П. К., Бойко О.П. Опубл. 27.08.2013, Бюл. № 16. <https://uapatents.com/4-82907-vakcinnijj-shtam-vnb-1-clostridium-novyi-tip-v-dlya-vigotovlennya-polivalentno-koncentrovano-gidroksid-alyuminiehvo-formolvakcini-proti-bradzotu-infekcijjno-enterotoksemi-nekrotich.html>.

50. Патент України на винахід № 40596. Композиція вакцини та спосіб її одержання/ Петре Жан, Хаузер П'єр. Опубл. 15.08.2001, Бюл. № 7. <https://uapatents.com/8-40596-kompoziciya-vakcini-ta-sposib-oderzhannya.html>.

51. Baker J. R., Bielinska J. A. U., Mank N., Makidon P. E., Cao Z., Scott A. J., et al. Immunogenic Compositions Comprising Nanoemulsion and Hepatitis B Virus Immunogen and Methods of Using the Same. University of Michigan, Ann Arbor, USA, 2016 Patent number US9415006B2. <https://patents.google.com/patent/US20100028433A1/en>

52. Minz, S., & Pandey, R. S. (2018). Development of adjuvanted solid fat nanoemulsions for pulmonary hepatitis B vaccination. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(6), 1701-1712. doi: 10.1016/j.xphs.2018.02.007.

53. Makidon, P. E., Bielinska, A. U., Nigavekar, S. S., Janczak, K. W., Knowlton, J., Scott, A. J., Mank, N., Cao, Z., Rathinavelu, S., Beer, M. R., Wilkinson, J. E., Blanco, L. P., Landers, J. J., & Baker, J. R., Jr (2008). Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine. *PloS one*, 3(8), e2954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002954>

54. ЕНДЖЕРИКС™-В/ENGERIX™-В ВАКЦИНА ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ВІРУСНОГО ГЕПАТИТУ В, РЕКОМБІНАНТНА [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=41775>

55. Global Vaccine Market Size Expected to Reach USD 186.5 Billion by 2032 with 10.7% CAGR - SNS Insider [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://www.globenewswire.com/news-release/2024/10/07/2958991/0/en/Global-Vaccine-Market-Size-Expected-to-Rreach-USD-186-5-Billion-by-2032-with-10-7-CAGR-SNS-Insider.html>

56. Державний реєстр лікарських засобів України. Пошук ЛЗ [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua>

57. ANNUAL REPORT OF THE PUBLIC HEALTH CENTER OF THE MOH OF UKRAINE [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://phc.org.ua/sites/default/files/users/user90/National_response_HIV_TB_VH_SMT_war_2023_ENG.pdf

58. Meireles, L. C., Marinho, R. T., & Van Damme, P. (2015). Three decades of hepatitis B control with vaccination. *World journal of hepatology*, 7(18), 2127–2132. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i18.2127>

59. Гепатити: шляхи передавання та профілактика [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://phc.org.ua/news/gepatiti-shlyakhi-peredavannya-ta-profilaktika>

60. Настанова 00216. Вірусний гепатит [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://guidelines.moz.gov.ua/documents/3106>

61. Важливість вакцинації від гепатиту В для медичних працівників. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pb3.mk.ua/novyny/vazhlyvist-vakczynacziyi-vid-gepatytu-b-dlya-medychnyh-pracziivnykiv/>

62. В Україні побільшало зареєстрованих лікарів і медпрацівників. НСЗУ пояснює причини [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://life.pravda.com.ua/columns/2023/01/17/252380/#:~:text=%D0%A2%D0%B0%D0%BA%20%D0%BA%D1%96%D0%BB%D1%8C%D0%BA%D1%9>

[6%D1%81%D1%82%D1%8C%20%D0%BC%D0%B5%D0%B4%D0%BF%D1%80%D0%B0%D1%86%D1%96%D0%B2%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D1%96%D0%B2%20\(%D0%BB%D1%96%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%96%D0%B2%2C%20%D1%81%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B4%D0%BD%D1%8C%D0%BE%D0%B3%D0%BE,%D1%82%D0%B8%D1%81%D1%8F%D1%87%2C%20%D0%B0%20%D0%BC%D0%B5%D0%B4%D0%B7%D0%B0%D0%BA%D0%B%D0%B0%D0%B4%D1%96%D0%B2%20%E2%80%93%205193.](https://doi.org/10.1007/s12242-020-01808-0)

63. Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України. Щеплення проти гепатиту В: дітям і дорослим [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://phc.org.ua/news/scheplennya-proti-gepatitu-v-dityam-i-doroslim>

64. Енджерикс-В суспензія д/ін. 1 доза д/дор. (20 мкг) по 1 мл №10 у флак. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%B6%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%81-%D0%B2/28305/>

65. Європа медична. Скільки лікарів у Польщі? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.evromed.org.ua/ua/skilky-likariv-v-polshchi/>

66. Spice, A. J., Aw, R., Bracewell, D. G., & Polizzi, K. M. (2020). Synthesis and Assembly of Hepatitis B Virus-Like Particles in a *Pichia pastoris* Cell-Free System. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 72. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00072>.

67. Miyanohara, A., Toh-e, A., Nozaki, C., Hamada, F., Ohtomo, N., & Matsubara, K. (1983). Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(1), 1–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.1.1>.

68. To-E, A., Ueda, Y., Kakimoto, S. I., & Oshima, Y. (1973). Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 113(2), 727–738. <https://doi.org/10.1128/jb.113.2.727-738.1973>.

69. TAN, C., YUAN, J., JIN, O., JIANG, L., & HU, B. (2007). Preparation and Immunogenicity of a *Pichia pastoris*-derived Hepatitis B Vaccine Containing

PreS1, PreS2, and S Epitopes. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23(4), 700–703. doi:10.1016/s1872-2075(07)60046-6.

70. Новіков В.П. Обладнання технологічних процесів фармацевтичних та біотехнологічних виробництв: навч. посібник. – Вінниця: Нова книга, 2012. – 408 с.

71. Сидоров Ю.І. Процеси і апарати хіміко-фармацевтичної промисловості. – Вінниця: Нова книга, 2009. – 816 с.

72. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства: Ч. 2. – Винница: Нова книга, 2014. – 664 с.

73. Сидоров Ю.І. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості: навч. посібник. – Львів: Інтеллект-Захід, 2008. – 736 с.

74. Пат. № 6428984 США Method for obtaining recombinant HBsAg/ Pointek M. – Опубл. 06.04.2002.

75. Huang, Y., Bi, J., Zhang, Y., Zhou, W., Li, Y., Zhao, L., & Su, Z. (2007). A highly efficient integrated chromatographic procedure for the purification of recombinant hepatitis B surface antigen from *Hansenula polymorpha*. *Protein expression and purification*, 56(2), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.08.009>

76. Acikara O.B. Ion-Exchange Chromatography and Its Applications // IntechOpen. – 2013. – P.: 31 – 58.

77. O'Fágáin, C., Cummins, P. M., & O'Connor, B. F. (2011). Gel-filtration chromatography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 681, 25–33. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_2

78. Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

79. Чуешов В.И. Технология лекарств промышленного производства: Ч. 1. – Винница: Нова книга, 2014. – 696 с.

80. MBPX 404 Separation system for small scale fermenter capacities in the biotech Industry [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://assets.alfalaval.com/documents/pb75baa55/alfa-laval-mbpx-404-separation-system-product-leaflet-en.pdf>

81. НРН 2000/5-SH8 [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://www.neotec.cz/ikaprocess/wp-](https://www.neotec.cz/ikaprocess/wp-content/uploads/2017/08/Data_Sheet_NРН_2000-5-SH8.pdf)

[content/uploads/2017/08/Data_Sheet_NРН_2000-5-SH8.pdf](https://www.neotec.cz/ikaprocess/wp-content/uploads/2017/08/Data_Sheet_NРН_2000-5-SH8.pdf)

82. Центрифугу рефрижераторна настільна (без ротора) Hettich Universal 320 -1946 – 00263 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://chemtest.com.ua/ua/centrifuga_hettich_universal_320_ua

83. Dionex ICS-900 Ion Chromatography System Operator's Manual [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/66625-Man-IC-ICS-900-Operators-Oct2012-DOC065215-04.pdf>

84. Мембрани типу МФАС [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://labormarket.com.ua/ua/p127172210-membrany-tipa-](https://labormarket.com.ua/ua/p127172210-membrany-tipa-mfasc.html?srsId=AfmBOopKGP8Gqj9Q4rh26vJzL66CxJgxzQewkNCiNQaB6kJhbRpxGBKb)

[mfasc.html?srsId=AfmBOopKGP8Gqj9Q4rh26vJzL66CxJgxzQewkNCiNQaB6kJhbRpxGBKb](https://labormarket.com.ua/ua/p127172210-membrany-tipa-mfasc.html?srsId=AfmBOopKGP8Gqj9Q4rh26vJzL66CxJgxzQewkNCiNQaB6kJhbRpxGBKb)

85. Gel filtration using ÄKTA start Instructions [Електронний ресурс]. Режим доступу: [https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-17296-](https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-17296-original)

86. Фармацевтична технологія : навчальний посібник до самостійної роботи провізорів-інтернів зі спеціальності «Загальна фармація». Ч. 2 / Г. П. Смойловська, Т.В. Хортецька, О.О. Малюгіна, Л.А. Фуклева. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2017. – 100 с.

87. Наказ МОЗ України «Про лікарські засоби» від 26.06.2002 р. № 235.

88. Фармакологія: навчально-методичний посібник з позааудиторної та аудиторної роботи здобувачів вищої освіти / С. Ю. Штриголь, І. М. Риженко, К. Г. Щокіна та ін. ; за ред. проф. С. Ю. Штриголя. – Харків : Вид-во НФаУ, 2023. – 277 с.

89. Zaman, M., Chandrudu, S., & Toth, I. (2013). Strategies for intranasal delivery of vaccines. *Drug delivery and translational research*, 3(1), 100–109. <https://doi.org/10.1007/s13346-012-0085-z>
90. Lovelyn, Charles & Attama, Anthony. (2011). Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 02. 10.4236/jbmb.2011.225075.
91. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020. Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
92. Дмитрієвський Д.І. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва: навч. посібник. – Вінниця: Нова книга, 2008. – 280 с.
93. Наказ МОЗ України «Щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків» від 14.12.2001 № 502.
94. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів» від 14.12.2001 № 502.
95. Наказ МОЗ України «Вимоги до виготовлення стерильних на асептичних лікарських засобів в умовах аптеки» від 03.08.2005 № 391.
96. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації.
97. ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ ЯКІСТЬ ВОДИ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У ФАРМАЦІЇ СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2019/02/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%9B%D0%97-%D0%AF%D0%BA%D1%96%D1%81%D1%82%D1%8C-%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D0%B8.pdf>

98. Звуко-і теплоізолюваний вентагрегат Вентс ВПА 100-1,8-1 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ventilator.ua/ua/product/vents-vpa-100-18-1>.
99. Компресор інвер. 24" QXFS-D25zX090H R32 260-350V Gree Cooper&Hunter (C&H) 009001000195 [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ziperone.com.ua/ua/products/kompressor-24-r-v-cooper-hunter-c-h-46594?srsltid=AfmBOorU0vKzcyR38KvVon33QI7yDR6XXEx-D1986yZKAfOpF_MIFHtP
100. Промислові фільтри NEW FILTER [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://newfilter.com.ua/ua/promislovi-filtri-new-filter.html>
101. Система пом'якшення води Filtrons Clack CL 0844 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mir-aqua.com.ua/p1376417520-sistema-umyagcheniya-vody.html>
102. Установка зворотнього осмосу ECOSOFT MO2500LPD MINI [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://aqua-line.net.ua/catalog/filtru-dlya-promuslovosti/ustanovki-zvorotnogo-osmosu/ustanovka-zvorotnogo-osmosu-ecosoft-mo2500lpd-mini>
103. Насоси Speroni RSM [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://watton.ua/speroni/nasos-rsm.html?srsltid=AfmBOoqXxc072RYbf3YRzKIQFk-vUSJjeYnN2R1Iv3XWU0qkZz3I_Kg
104. Homogeniser, НРН 2000/04 [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://uk.vwr.com/store/product/14434769/homogeniser-hph-2000-04>
105. Етикетувальний автомат LS-108R [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.harchovyk.com/proposition/detail/2693>
106. Ваги лабораторні SF-400-D3 (3 кг, 0.1 г) [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://hottorg.com.ua/ua/p871440256-vesy-laboratornye-400.html?srsltid=AfmBOoqT5l_CN_xyUUgFnGzBeRYGTA_KDtCTOQn5YpNhuYlLpaAH_p4j

107. Kim S. H. (2017). ELISA for Quantitative Determination of Hepatitis B Virus Surface Antigen. *Immune network*, 17(6), 451–459. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.6.451>
108. Kaufmann, Scott. (2002). Springer Protocols Handbooks. 10.1385/1-59259-169-8:439.
109. Bhilocha, S., Amin, R., Pandya, M., Yuan, H., Tank, M., LoBello, J., Shytuhina, A., Wang, W., Wisniewski, H. G., de la Motte, C., & Cowman, M. K. (2011). Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis methods for molecular mass analysis of 5- to 500-kDa hyaluronan. *Analytical biochemistry*, 417(1), 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.026>
110. Packirisamy, V., & Pandurangan, P. (2023). Polyacrylamide gel electrophoresis: a versatile tool for the separation of nanoclusters. *BioTechniques*, 74(1), 51–62. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0086>
111. Sonagra, A. D., & Dholariya, S. J. (2022). Electrophoresis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
112. Aydin S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
113. Yolken R. H. (1982). Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: current limitations and future prospects. *Reviews of infectious diseases*, 4(1), 35–68. <https://doi.org/10.1093/clinids/4.1.35>
114. de Koning A. J. (2004). Determination of glycerol by gas chromatography using meso-erythritol as internal standard. *The Analyst*, 129(4), 352–354. <https://doi.org/10.1039/b400924j>
115. Krohn R. I. (2002). The colorimetric detection and quantitation of total protein. *Current protocols in cell biology*, Appendix 3, . <https://doi.org/10.1002/0471143030.cba03hs15>
116. Western Blot Protocol [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.e-blot.com/what-is-western-blot-3/>

117. Chang-Yao, T. A. N., Jin, Y. U. A. N., Ou, J. I. N., Jiang, L. M., & Bo, H. U. (2007). Preparation and Immunogenicity of a *Pichia pastoris*-derived Hepatitis B Vaccine Containing PreS1, PreS2, and S Epitopes. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23(4), 700-703. doi:10.1016/S1872-2075(07)60046-6.