

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Директор інституту (декан факультету)

Завідувач кафедри

_____ Наталія ГРЕГІРЧАК

_____ Віктор СТАБНИКОВ

(підпис) (прізвище та ініціали)

(підпис) (прізвище та ініціали)

«___» ___ лютий 2024 р.

«___» ___ лютий 2024 р.

**Кваліфікаційна робота
на здобуття освітнього ступеня магістра**

зі спеціальності 162 « Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: «Ад'юванти як засіб підвищення імуногенності вакцин»

Виконала: здобувачка 2 курсу, групи 02

БЕЛЕМЕЦЬ Тетяна Олександрівна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент

Маргарита ЛОМБЕРГ

(прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

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

Здобувач

_____ (підпис)

Київ - 2024р.

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 «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БЕЛЕМЕЦЬ Тетяни Олександрівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи: «Ад'юванти як засіб підвищення імуногенності вакцин»

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року №913-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент: *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 для отримання імунобіологічного препарату (вакцини проти ВПГ-2) з використанням β -1,3/1,6-глюкану у якості ад'юванта

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел, РОЗДІЛ 2. ТЕО виробництва імунобіологічного препарату (вакцини), РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів та підбір технологічного обладнання стадій отримання β -глюкану, РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання післяферментаційних стадій отримання β -глюкану, РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення β -глюкану для одержання імунобіологічного препарату, РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва субстанції для імунобіологічного препарату, РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання імунобіологічного препарату, РОЗДІЛ 8. Специфікація обладнання стадій отримання імунобіологічного препарату, РОЗДІЛ 9. Опис технологічної схеми одержання імунобіологічного препарату, РОЗДІЛ 10. Опис імунобіологічного препарату згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна (А3) та апаратурна (А3) схеми отримання β -глюкану, а також технологічна (А1) й апаратурна (А1) схеми отримання готового імунобіологічного препарату (вакцини проти ВПГ-2).

6. Консультанти розділів роботи

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

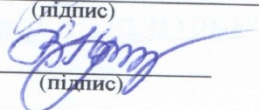
7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	РОЗДІЛ 1. Огляд літературних джерел	02.11.23р.- 15.11.23р	
	РОЗДІЛ 2. ТЕО виробництва імунобіологічного препарату (вакцини)	15.11.23р.- 19.11.23р.	
	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів	19.11.23р.- 22.11.23р.	
	РОЗДІЛ 4. Специфікація обладнання післяферментаційних стадій отримання β -глюкану	22.11.23р.- 27.11.23р.	
	РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення β -глюкану для одержання імунобіологічного препарату	27.11.23р.- 31.11.23р.	
	РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва субстанції для імунобіологічного препарату	31.11.23р.- 02.12.23р.	
	РОЗДІЛ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання імунобіологічного препарату	02.12.23р.- 12.12.23р.	
	РОЗДІЛ 8. Специфікація обладнання стадій отримання імунобіологічного препарату	12.12.23р.- 17.12.23р.	
	РОЗДІЛ 9. Опис технологічної схеми одержання імунобіологічного препарату	17.12.23р.- 22.12.23р	
	РОЗДІЛ 10. Опис імунобіологічного препарату згідно АНД	22.12.23- 29.12.23р.	
	Оформлення апаратурних та технологічних схем	29.12.23р- 11.01.24р	
	Оформлення вступу та реферату	11.01.24- 14.01.24р.	

Здобувач

Керівник роботи


(підпис)

(підпис)

Тетяна БЕЛЕМЕЦЬ
(ім'я та прізвище)

Вікторія КРАСІНЬКО
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Представлена кваліфікаційна магістерська робота – присвячена аналізу актуальної наукової літератури з питання імунологічної дії та особливостей біотехнологічного одержання епігенетичного ад'юванта мікробного походження – β -1,3/1,6-глюкану, для його подальшого застосування у складі імунобіологічного препарату (вакцини проти інфекційного агенту герпесу 2-го типу). Зокрема у межах роботи здійснено розроблення: технологічної та апаратурної схем одержання полісахариду β -1,3/1,6-глюкану, отриманого культивуванням штаму *Saccharomyces cerevisiae* TRTH11 (продуктивність – 3,5 г/л β -глюкану; час культивування – 48 год.; джерело вуглецю в середовищі – глюкоза), а також технологічну схему отримання готової вакцини ін'єкційної форми проти ВПГ-2-го типу.

Згідно техніко-економічного розрахунку, потреба населення України у β -глюкані складає 30 %, а саме 873,6 г з урахування курсу вакцинації у 2 дози по 50 мкг високо очищеного β -глюкану (заг. к-ть 100 мкг). Період виробництва, при цьому, триває 42 дні (6 тижнів) у ферментері об'ємом 10 л упродовж 16 циклів.

У роботі також розглянуто та порівняно різні мікробіологічні продуценти ад'ювантного полісахариду з технологією його подальшого виділення з культуральної рідини та високого ступеня очищення. Обґрунтовано допоміжні роботи необхідні для отримання вакцини: підготовка аераційного й вентиляційного повітря, поживного середовища для здійснення культивування, очищеної води та води для отримання ін'єкцій, а також первинної упаковки.

Кваліфікаційна магістерська робота викладена на 223 сторінках друкованого тексту, має у своєму складі: реферат, вступ, 10 розділів, список використаних джерел (300 джерел літератури), 12 таблиць, 9 рисунків, та графічну частину – 5 креслень.

Ключові слова: імунопотенціюючий агент, ад'ювант, епігенетичний ад'ювант, агоністи Toll-подібних рецепторів, імунобіологічний препарат, вакцина, β -1,3/1,6-глюкан, полісахарид, вірус герпесу 2-го типу.

ABSTRACT

The presented qualifying master's thesis is devoted to the analysis of current scientific literature on the issue of immunological action and features of the biotechnological production of an epigenetic adjuvant of microbial origin - β -1,3/1,6-glucan, for its further use as part of an immunobiological preparation (vaccines against an infectious agent herpes type 2). In particular, within the framework of the work, the following was developed: technological and apparatus schemes for the production of β -1,3/1,6-glucan polysaccharide obtained by cultivation of the strain *Saccharomyces cerevisiae* TRTH11 (productivity - 3.5 g/l β -glucan; cultivation time - 48 h. ; the source of carbon in the environment is glucose), as well as a technological scheme for obtaining a ready-made vaccine against HSV-2.

According to the technical and economic calculation, the need of the population of Ukraine for β -glucan is 30%, namely 873.6 g, taking into account the course of vaccination in 2 doses of 50 μ g of highly purified β -glucan (total quantity 100 μ g). The production period, meanwhile, lasts 42 days (6 weeks) in a 10-liter fermenter for 16 cycles.

The work also considered and compared various microbiological producers of adjuvant polysaccharide with the technology of its further isolation from the culture liquid and a high degree of purification. Substantial auxiliary works are necessary for obtaining the vaccine: preparation of aeration and ventilation air, nutrient medium for cultivation, purified water and water for receiving injections, as well as primary packaging.

The qualifying master's work is laid out on 223 pages of printed text, includes: an abstract, an introduction, 10 chapters, a list of used sources (300 literature sources), 12 tables, 9 figures, and a graphic part - 5 drawings.

Key words: immunopotentiating agent, adjuvant, epigenetic adjuvant, Toll-like receptor agonists, immunobiological drug, vaccine, β -1,3/1,6-glucan, polysaccharide, herpes virus type 2.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ	8
1.1. Ад'юванти, як імунопотенціюючі агенти у складі вакцин: механізми та платформи...	8
1.2. Імунологічні та біотехнологічні особливості використання ад'ювантів у наукових дослідженнях та виробництві вакцин...	14
1.3. Ад'юванти мікробного походження, як перспективні імунопотенціюючі агенти в імунобіотехнології	20
1.4. Агоністи Toll-подібних рецепторів, як епігенетичні ад'юванти нового покоління: наукові дослідження та перспектива фармацевтичного застосуванн.	28
1.5. Ад'ювантна активність β -глюкану у складі протиінфекційних вакцин...	36
РОЗДІЛ 2. ТЕО ВИРОБ-НИЦТВА ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПА-РАТУ (ВАКЦИНИ)	59
2.1. Передумови виробництва імунобіологічного препарату.....	59
2.2. Аналіз фармакологічних властивостей імунобіологічного препарату та β -глюкану, галузей використання та потреби	60
2.3. Обсяг ринку вакцин та очікувані темпи його розвитку	66
2.4. Обґрунтування форми випуску імунобіологічного препарату, його первинної та вторинної упаковок.....	70
2.5. Обґрунтування вибору БА та середовища для його культивування	73
2.6. Розрахунки потреб у субстанції для випуску імунобіологічного препарату, річної кількості необхідної культуральної рідини, об'єму ферментеру та кількості виробничих циклів.....	88
РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	94
РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ β-ГЛЮКАНУ	115

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ β-ГЛЮКАНУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	118
РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	123
РОЗДІЛ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	132
7.1. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень	132
7.2. Обґрунтування вибору підготовки води очищеної та води ін'єкційної	140
7.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки... ..	144
7.4. Вибір технологічних стадій, операцій, обладнання	149
РОЗДІЛ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	154
РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	160
РОЗДІЛ 10. ОПИС ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ЗГІДНО АНД	183
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	192

ВСТУП

На сьогоднішній день не існує більш ефективної стратегії для зниження статистичних показників захворювання та смертності в усьому світі за вакцинацію. Саме вакцинація є не тільки доцільним інструментом для зменшення величезного соціального впливу, але й найбільш економічно вигідним вирішенням проблематики захисту людини від 25 інфекційних захворювань. Зокрема з початком глобальної програми імунізації у 1974р. слід відмітити зниження рівня захворюваності та смертності проти шести інфекційних агентів, збудників – коклюшу, дифтерії, правця, поліомієліту, туберкульозу та кору [1].

У сучасному ж світі лише завдяки імунізації людству вдалось подолати та пережити масштабні світові пандемії, останньою з яких була пандемія коронавірусної зооантропонозної інфекції викликаной інфекційним агентом – SARS-CoV-2.

Однак, незважаючи на те що технологія отримання вакцин є достатньо вивченою, виробництво даних препаратів пов'язане із численними ризиками та проблемами, у першу чергу, через характер цих лікарських засобів. В середньому, розробка вакцин на сучасному етапі, займає 5...7 років та залежить від фінансування та зацікавленості в отриманні конкретної вакцини, а також патогену. Нині виробники прагнуть розробити вакцини, котрі будуть ефективні у запобіганні або зменшенні тяжкості протікання інфекційного захворювання, де їх ефективність напряду залежить від вироблення імунної відповіді при застосуванні мінімальної кількості доз. Тому зміни, що відбуваються у технологіях виробництва вакцин, пов'язані з необхідністю отримання стабільного антигенного матеріалу з належною імунною відповіддю та високим рівнем безпеки [2].

Для усунення даної проблематики, велика кількість наукових праць світових вчених зосереджена на удосконаленні існуючих й відкритті нових вакцин. При цьому важливим є етап підбору найбільш раціонального та безпечного ад'юванту з метою збереження антигенності та досягнення належної імуногенності розроблених імунобіологічних препаратів.

Актуальність даної кваліфікаційної роботи визначається високим рівнем попиту українців саме у новітній вітчизняній вакцині проти вірусу герпесу 2-го типу (з підвищеною імуногенністю завдяки раціонально обраному ад'юванту) за рахунок відсутності єдиного, раніше існуючого імпорту російського виробника, та унеможливленням наявної протівірусної медикаментозної терапії (ВПГ-2) – повним чином запобігти рецидивам захворювання та його викоріненню.

Отримання такої вакцини дозволить вирішити наступні проблеми: наявну соціально-економічну проблему захворювання працездатних людей репродуктивного віку (15-49 років), спровокувати позитивну тенденцію щодо попередження розповсюдження інфекційної і соматичної захворюваності на ВПГ-2 (за даними ВООЗ вірусом герпесу 2-го типу інфіковано – 1/6 населення світу; кожна 5-та людина на планеті є носієм), котра протягом останніх 24 років (з 1997р.) в Україні складає – 80 % дорослого населення; проблему отримання вакцин з безпечним, ефективним та стабільним імунопотенціюючим агентом нового покоління для індукції потужних, але безпечних імунних відповідей з урахуванням природи патогену вакцини.

Новизною даної роботи є застосування штаму *Saccharomyces cerevisiae* НІІ31 для синтезу β -1,3/1,6-глюкану з продуктивністю в 3,5 г/л (48 год. культивування) для отримання високоочищеного епігенетичного ад'юванта мікробіологічного походження (застосовується вперше для даного типу вакцин) з метою його подальшого використання для отримання імунобіологічного препарату – вакцини проти вірусу герпесу 2-го типу (ВПГ-2).

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1.1. Ад'юванти, як імунопотенціюючі агенти у складі вакцин: механізми та платформи

Під час виготовлення якісного імунобіологічного препарату, надважливим є активність використовуваного патогенного матеріалу, тобто застосування високоімуногенного штаму вірусу та підбір ад'юванту, котрий володів би імуностимулюючим ефектом і максимальною адсорбуючою дією. При чому один і той самий ад'ювант здатен, як стимулювати імунітет, так і бути інертним у залежності від типу антигену. Імунопотенціюючі агенти виконують це завдання, імітуючи специфічні набори еволюційно консервативних молекул, які включають ліпополісахариди (LPS), компоненти клітинної стінки бактерій, ендцитовані нуклеїнові кислоти, такі як dsRNA, ssDNA та неметильований CpG динуклеотид, що містить ДНК [3].

Ад'юванти можна використовувати з кількома цілями: для посилення імуногенності високоочищених або рекомбінантних антигенів, економічності доцільності за рахунок зменшення кількості антигену або доз вакцинації (необхідних для розвитку імунітету), для прискорення імунної відповіді, для використання у якості системи доставки антигену й його асиміляції у слизовій оболонці, а також збільшення тривалості захисту або підвищення ефективності в популяціях із слабкою імунною відповіддю, включаючи новонароджених, осіб з ослабленим імунітетом та людей похилого віку. Було також показано, що ад'юванти захищають антигени від деградації, хоча це, зазвичай, залежить від природи самого ад'юванта [4].

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив(ла)	Белемєць Т.О.				РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ		Літ.	Арк.
Консультант								Акрушів
Керівник	Красінько В.О.							223
Н. Контр.							Кафедра БТМ	
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

Ад'юванти можна класифікувати за п'ятьма потенційними способами дії: імуномодуляція (модифікація мереж цитокінів), презентація (підтримка презентації антигену), індукція цитотоксичних Т-лімфоцитів (CTL), націлення на конкретні клітини та створення депо [5].

Однією з найбільш популярних класифікаційних систем є та, що базується на механізмах дії ад'ювантів, розділяючи їх на дві основні категорії: системи доставки (частинки) і імунні потенціатори. Узагальнений механізм дії вакцинних ад'ювантів, з точки зору активації імунної відповіді (клітинна та гуморальна ланки імунітету), наведено на рисунку №1.

В ад'ювантних системах доставки, антигени пов'язані з ад'ювантом, який працює, зокрема, як носій антигену. Окрім того, вони здатні індукувати місцеву прозапальну відповідь шляхом активації вродженої імунної системи, що призводить до залучення імунних клітин до місця ін'єкції.

Однак не всі вакцини потребують ад'ювантів. Наприклад, ліцензовані кон'юговані менінгококові вакцини не містять ад'ювантів, оскільки сама кон'югація з білковим носієм здатна стимулювати хорошу імунну відповідь [6].

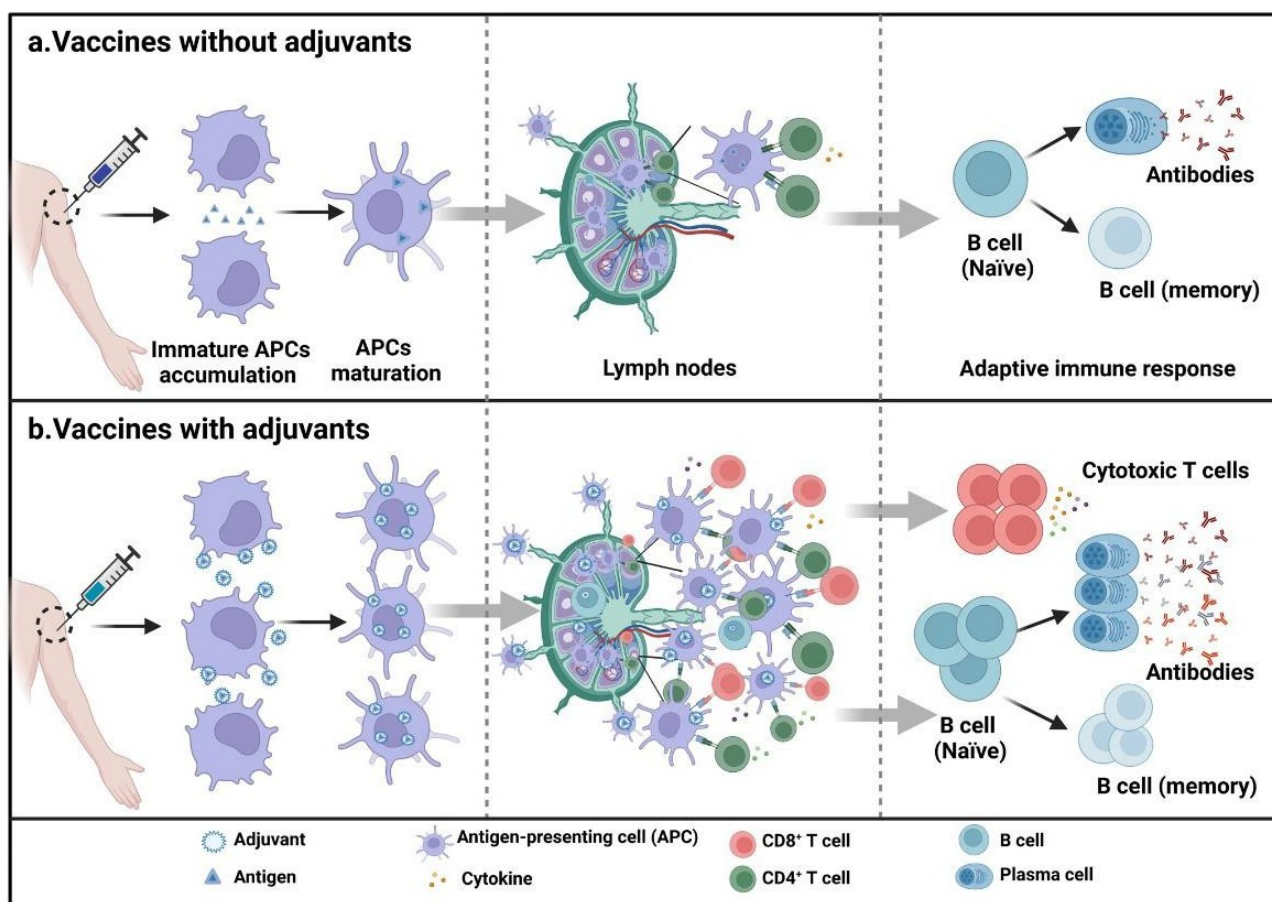


Рисунок № 1 – Узагальнена схема імуногенності вакцин а) вакцини без використання ад'ювантів; б) вакцини з ад'ювантами у своєму складі [7]

Аналізуючи ілюстровану інформацію наведену на рис. №1, можна стверджувати, що імунобіологічні препарати отримані без застосування ад'ювантів, – здатні індукувати помірну імунну відповідь за рахунок роботи адаптативної ланки імунітету та вироблення Т-хелперних поляризуючих цитокінів, антитіл та активованих Т-клітин. На противагу вакцини з ад'ювантами у своєму складі – сприяють дозріванню більшої кількості антигенпрезентуючих клітин (АПК; APC), посиленню взаємодії між АПК і Т-клітинами, виробленню більшої кількості та різноманітності класів Т-хелперних-поляризуючих цитокінів, багатофункціональних Т-клітин та антитіл. Як результат – широкий та стійкий імунітет за умови збереження дози застосованого антигену.

Наразі Управлінням по санітарному надзору за якістю харчових продуктів та медикаментів (FDA), а також Європейським агенством лікарських засобів (EMA)

є ліцензованим ряд ад'ювантів загальновідомих вакцин; представлений у таблиці № 1.

З наведеної інформації у табл. №1 видно, що переважна більшість ліцензованих FDA та ЕМА вакцин у своєму складі містять ад'юванти синтетичного походження по типу солей алюмінію та ад'ювантів на основі/із вмістом сквалену. Дана закономірність є цілком зрозумілою, адже зазначені ад'юванти є одними із першочергово дозволених для використання у рецептурах вакцин. Тому потреба у збільшенні та розробленні нових видів ад'ювантів є актуальною задачею сьогодення з метою підвищення безпеки та ефективності новітніх вакцин.

Однак схвалення нових джерел ад'ювантів може зазнавати часових затримок і високих економічних витрат унаслідок нормативних проблем з питання їх використання та вивчення, застосування клітинних субстратів або заяви на внесення змін у технологічні процеси отримання – аспекти перешкоди, котрі стримують новинки, а також затримують доступність вакцин (особливо в країнах з низьким рівнем ресурсів).

Підтвердженням стала пандемія COVID-19, яка підкреслила важливість доступу до ефективних вакцин, з метою протистояння потенційній загрозі нової пандемії. Адже властивості ад'ювантів у вже ліцензованих РНК-вакцинах проти COVID-19 – пов'язані з ліпосомальними компонентами, котрі використовуються як носії кодуючої РНК. При чому найновіша ліцензована вакцина проти COVID-19 у своєму складі має ад'ювант «Matrix-M», який містить фракцію-А та фракцію-С екстракту *Quillaja saponaria Molina* [8].

Саме тому при розробці новітніх вакцин важливим є підбір найбільш раціонального та ефективного, за імуностимулюючою дією, ад'юванту, що відповідатиме наступним вимогам: володітиме науковим та експериментальним шляхами підтвердження безпечності, переносимістю, доступністю та легкістю у виробництві. Слід також врахувати фармацевтичні характеристики ад'юванту (рН, осмоляльність, рівень ендотоксину та ін.), можливий термін зберігання та економічну життєздатність.

Таблиця № 1 – Список ад'ювантів вакцин ліцензованих FDA та ЕМА для використання людиною [5,9,10]

Торгова назва	Тип	Ад'ювант	Спосіб введення
ADACEL	Правцевий анатоксин, відновлений дифтерійний анатоксин і ацелюлярна (цільноклітинна) вакцина проти кашлюку	Фосфат алюмінію (0,3 мг Al^{3+})	Внутрішньом'язове
AVAXIM	Інактивована вакцина проти гепатиту А	Гідроксид алюмінію (0,3 мг Al^{3+})	
BOOSTRIX	Вакцина проти дифтерії, правця та кашлюку (безклітинний компонент) (знижений вміст антигену)	Гідроксид алюмінію (0,3 мг Al^{3+}) і фосфат алюмінію (0,2 мг Al^{3+})	
CERVARIX	Вакцина проти вірусу папіломи людини (типи 16, 18) (рекомбінантна)	AS04, що містить 3- <i>O</i> -дезацил-4'-монофосфорилліпід А (MPL) 50 мкг, адсорбований на гідроксиді алюмінію (0,5 мг Al^{3+})	
FENDRIX	Вакцина проти гепатиту В (рекомбінантна).	AS04, що містить 3- <i>O</i> -дезацил-4'-монофосфорилліпід А (MPL) 50 мкг, адсорбований на гідроксиді алюмінію (0,5 мг Al^{3+})	
FLUAD	Вакцина проти грипу інактивована, поверхневий антиген	MF59, що містить 9,75 мг сквалену; 1,175 мг полісорбату 80; 1,175 мг сорбітантріолеату; 0,66 мг цитрату натрію; 0,04 мг лимонної кислоти.	
NUVAXOVID	Вакцина проти COVID-19 (рекомбінантна, з ад'ювантом)	Matrix-M, що містить фракцію А (42,5 мкг) і фракцію С (7,5 мкг) екстракту <i>Quillaja saponaria</i> Molina	

Торгова назва	Тип	Ад'ювант	Спосіб введення
GARDASIL 9	9-валентна вакцина проти вірусу папіломи людини (рекомбінантна)	Аморфний гідроксифосфат сульфату алюмінію (0,5 мг ді Al^{3+}).	Внутрішньом'язове
PREVENAR 13	Пневмококова полісахаридна кон'югована вакцина (13-валентна)	Гідроксид алюмінію (0,125 мг Al^{3+})	
SHINGRIX	Вакцина проти оперізувального герпесу (рекомбінантна)	AS01B, що містить екстракт рослини <i>Quillaja saponaria</i> Molina, фракція 21 (QS-21) 50 мкг, 3-O-дезацил-4'-монофосфорилліпід А (MPL) із <i>Salmonella minnesota</i> 50 мкг	
SYNFLORIX	Пневмококова полісахаридна кон'югована вакцина	Фосфат алюмінію (0,5 мг Al^{3+})	
TETRAVAC	Вакцина проти дифтерії, правця, кашлюку (ацелюлярний компонент) та поліомієліту (інактивована)	Гідроксид алюмінію (0,3 мг Al^{3+})	
VAXELIS	Вакцина проти дифтерії, правця, кашлюку (ацелюлярний компонент), гепатиту В (рекомбінантна), поліомієліту (інактивована) та вакцина проти <i>Haemophilus influenzae type b</i>	Фосфат алюмінію (0,17 мг Al^{3+}) Аморфний сульфат гідроксифосфату алюмінію (0,15 мг Al^{3+})	

Дотримуватись зазначених вимог без впливу на безпеку ад'юванту, є важкою задачею, як для науковців при виборів нових джерел отримання імунопотенціюючих агентів, так і для виробника. Із зазначених вище причини, дуже мало вакцинних ад'ювантів включено до складу ліцензованих імунобіологічних препаратів, котрі наразі набули широкого використання.

1.2. Імунологічні та біотехнологічні особливості використання ад'ювантів у наукових дослідженнях та виробництві вакцин

Для того щоб різні види вакцин увійшли у практику, необхідними є речовини-підсилювачі (ад'юванти), що стимулюють антигенну активність [11]. Ад'юванти (імунопотенціюючі агенти) – це різноманітне сімейство молекулярних сполук, які підвищують тривалість імунної відповіді та імуногенність вакцин, шляхом стимуляції вродженої імунної системи для індукції стійких Т- і В-клітинних відповідей [12].

Сьогодні ад'юванти є центральними компонентами багатьох імунобіологічних препаратів та мають важливе значення для максимізації захисного ефекту вакцин за рахунок підвищення як величини, так і тривалості імунної відповіді. В ідеалі імунопотенціюючі агенти – спрямовані на збільшення та покращення імуногенності антигенів завдяки зменшенню їх кількості у самій вакцині та доз імунізації. При чому раціональний дизайн ефективних і безпечних новітніх вакцин, передбачає логічний вибір імунопотенціатора, виходячи з механізму його дії, очікуваного впливу на ефективність і безпеку імунобіологічного препарату, умови застосування ад'юванта, котрий відповідатиме бажаному імуногенному потенціалу (виклик потужної імунної відповіді за найменшого ризику для здоров'я), а також вимогам безпеки для використання людиною [13].

Останніми роками робота світових вчених була зосереджена на новому поколінні ад'ювантів, котрі безпосередньо націлені на рецептори розпізнавання патернів (PRR) вроджених імунних клітин. Адже саме клітини вродженого імунітету є ключовими модуляторами імунної системи, оскільки вони організовують адаптативні імунні реакції та націлюються на специфічні імунні

відповіді завдяки дії ад'ювантів, що у значній мірі доведено для точного налаштування відповідей антитіл та Т-клітин. Ад'юванти, що націлені на TLR як CpG1018 (TLR9) та MPL, вже включеними складу ліцензованих вакцин, разом з кількома іншими – (R848) (TLR7/8 ліганд), що продемонстрували великі перспективи у викликанні стійких і тривалих Т- і В-клітинних відповідей. Однак, незважаючи на те що дане нове покоління ад'ювантів – багатообіцяюче, механізм їх дії є недостатньо вивченим [14].

Найбільш часто використовуваними імунопотенціюючими агентами є ад'юванти на основі алюмінію та масляно-водні емульсії. При цьому їх вибір важливий для опосередкованої ад'ювантами індукції імунітету різних типів вакцин, адже навіть якщо компоненти антигену та ад'юванту добре складені індивідуально, утворена суміш може бути неоптимальною або несумісною, що впливатиме на безпеку та ефективність отриманих протиінфекційних засобів [15].

Упродовж більш ніж семи десятиліть з моменту першої ліцензії ад'юванту в 1920-х роках, нерозчинні солі алюмінію (галуни) залишаються єдиними включеними до ліцензованих продуктів, таких як вакцини проти гепатиту В, дифтерії, правця та кашлюку або вірусу папіломи людини. Однак наприкінці 1990-х років ад'ювант емульсії «масло-у-воді» MF59 – вперше було включено до ліцензованого продукту в Європі, відомого як «Fluad», що являє собою тривалентну інактивовану вакцину проти сезонного грипу, ліцензовану для дорослих старше 65 років.

За минулі 20 років чотири інші ад'юванти були включені в додаткові продукти: AS01 (для вакцини проти оперізуючого лишая «Shingrix» і вакцини проти малярії «Mosquirix»), AS04 (для вакцини проти гепатиту В «Fendrix» і вакцини проти папіломи людини «Cervarix»), AS03 (для вакцин проти пандемічного грипу «Pandemrix» і «Arepanrix») і цитозинфосфатгуанозин (CpG) 1018 (для вакцини проти гепатиту В «Hepelisav-B») [16].

Ад'ювантом масляно-водної емульсії, котрий широко використовувався в експериментах на тваринах є ад'ювант Фрейнда у двох можливих формах: неповний (IFA) та повний (CFA); останній містить також вбиті клітини бактерій

Mycobacterium tuberculosis для посилення імунної дії шляхом залучення макрофагів та інших імунних клітин до місця ін'єкції (зазвичай застосовують при первинній імунізації). Типова композиція CFA включає 1 мг *Mycobacterium tuberculosis*, убитих нагріванням і висушених з 0,85 мл парафіну та 0,15 мл Arlacel® 83 (суміш олеїнової, пальмітинової, стеаринової та лінолевої ефірів з 2-(3,4-дигідрокситетрагідрофураніл)-етиленгліколем) [17].

На сьогоднішній день, можливими шляхами інокуляції ад'ювантної емульсії з антигеном є: підшкірний, внутрішньошкірний, а за відповідних умов – внутрішньочеревний спосіб введення. Однак останній можливий виключно під час досліджень на лабораторних тваринах, адже мінеральне масло – не метаболізується людським організмом, а мікобактеріальні елементи можуть призвести до гранулематозних реакцій [18].

Активні компоненти, обумовлені *Mycobacterium tuberculosis*, – це дипептид, N-ацетилмураміл-L-аланін-D-ізоглутамін (MDP), молекула, яка активує макрофаги та дендритні клітини через домен олігомеризації, який зв'язує нуклеотиди, котрі містять 2 (NOD2) та скелетні елементи стінки бактеріальної клітини. Окрім стимуляції запалення, даний імунопотенціюючий агент викликає агрегацію та преципітацію розчинних білкових антигенів з утворенням частинок, які сприяють їх ефективному поглинанню антигенпрезентуючими клітинами (АПК). CFA також позитивно впливає на субпопуляції клітин Th1, синтез імуноглобулінів класу IgG (на противагу синтезу класу IgM), пригнічує індукцію толерантності та сприяє реакціям відстроченої гіперчутливості.

Проте за рахунок токсичності та побічних реакцій, використання CFA є неприйнятним для людських вакцин на противагу IFA, що проявляє меншу токсичність і тому підходить для клінічного використання [19].

Нині найбільш розповсюдженими в імунобіотехнологічних виробництвах є наступні ад'юванти: агоніст TLR9 – CpG1018, агоніст TLR4 – AS01b і AS04 5, 6, 7 або ад'юванти на основі сквалену, такі як AS03 (містить α -токоферол) і MF59 (наноемульсія типу «масло у воді», що містить сквален). Окремо до переліку

дозволені для використання у ліцензованих вакцинах, слід віднести ад'юванти Tween 80 і Span 85 (обидва є поверхнево-активними речовинами) [20].

Сквален – це терпен, який міститься в рослинах і печінці деяких видів тварин, у тому числі людини. Він діє як попередник холестерину, стероїдних гормонів і вітаміну D; використовується як допоміжний засіб для кількох різних вакцин разом з антигенами вірусу грипу, вірусів гепатиту В і С, вірусу простого герпесу, тощо.

Дія імунологічного ад'юванту MF59 на основі сквалену асоціюється зі збільшенням активності хелперних Т-лімфоцитів і вищими концентраціями імуноглобулінів, зокрема ізотипів IgG1 та IgG2a. Також повідомляється, що MF59 – здатний індукувати відповіді Th1 в CD8⁺ Т-лімфоцитах [21].

Зокрема дослідження [22] демонструють, що MF59 сприяє сероконверсії (продукції специфічних антитіл у сироватці крові) та серопротекції (титр захисних антитіл) через 21 день після першого введення вакцини проти грипу «А/Н1N1». При чому та сама вакцина викликала вищий відсоток серопротекції та сероконверсії через 21 і 42 дні з ад'ювантом, ніж без ад'юванту. Що стосується безпеки: повідомляється про легкі та помірні реакції, включно з головним болем, болем у м'язах та синцем у місці ін'єкції. Тим не менш, жодна з цих побічних реакцій не тривала більше 72 годин.

Вченими [23] протестовано декілька формул ад'ювантів, що містять сквален та інші сполуки. GLA-SE (емульсія «масло у воді» зі скваленом) і GLA (включає глюкопіранозилліпідний ад'ювант). Було показано, що ця композиція індукує сильну передачу сигналів через шляхи TLR-4, каспази, IL-18 та IFN- γ , що призводить до відповіді Th1. Наразі GLA-SE використовується у якості ад'юванту у вакцинах проти туберкульозу, що характеризується потужними відповідями антитіл й піку їх кількості після другої імунізації, а також легких побічних ефектів, включаючи головні болі та втому [24].

Проведені дослідження на людях [25], які отримували вакцину проти грипу з ад'ювантом AS03 на основі сквалену, показали тривалі модифікації гістонів та епігенетичні зміни в моноцитах, аж до 21 дня після введення вакцини. Також було

виявлено, що класичні моноцити зберігають підвищений рівень хроматину антивірусних локусів IRF, включаючи ключові противірусні імунні регулятори – RIG-1 (DDX58), IRF1, IRF8 та ряд генів стимульованих інтерфероном. Необхідно зазначити, що моноклеарні клітини периферійної крові (PBMCs) від вакцинованих піддослідних, що контролювали «in vitro» заражаючи Данге і вірусом Зіка, є більш ефективними. Про це свідчать зниження вірусного навантаження після вакцинації культури та кореляція титрів вірусів з рівнями експресії інтерферон-регуляторних факторів (IRF).

Нині у всьому світі було введено понад 20 мільйонів доз вакцин на основі сквалену (AS03) з результатами біобезпеки від прийнятних до відмінних [26].

Новим агоністом TLR7/8 є 3М-052, що індукує потужні антигенспецифічні імунні відповіді за рахунок клітинних відповідей Th1, у поєднанні з антитілами і плазматичними клітинами [27]. Однак, незважаючи на потужність 3М-052, механізм його дії й досі залишається недостатньо вивченим. Дослідження, що вивчають ад'ювантний потенціал 3М-052, складеного на основі галуну або наночастинок PLGA – були обмежені характеристикою периферичної імунної відповіді в крові від NHP, при цьому мало відомо про події, які відбуваються в лімфатичних вузлах, як місць ініціації імунних відповідей.

Після вакцинації активовані дендритні клітини з локального місця ін'єкції мігрують до дренуючих лімфатичних вузлів для представлення антигену Т-лімфоцитам та секреції цитокінів, які підтримують активацію та диференціацію Т-і В-клітин, тим самим стимулюючи імунну відповідь [28]. Однак, незважаючи на доведену потужну активацію вродженого та адаптивного імунітетів, на сьогоднішній день немає досліджень, котрі б «порівняли» імунні відповіді індуковані вакцинами з 3М-052 з відповідями, стимульованими живими вірусними вакцинами, що можуть викликами стійку продукцію антитіл [29].

Відомою є робота [30], в якій досліджували молекулярний атлас імунітету до ад'ювантних і живих ослаблених вакцин у мишей, за використання проточної цитометрії, одноклітинної РНК (scRNA-seq) і одноклітинне секветування АТАС (scATAC-seq) для створення комплексної клітинної, транскриптомної та

епігеномної карти вродженої імунної відповіді в dLN на ранніх і пізніх термінах після імунізації антигеном з ад'ювантом YF-17D або 3М-052-Alum. Встановлено, що імунізація антигеном плюс 3М-052/Alum – індукує активацію й рекрутинг мієлоїдних клітин у dLNs зі стійкою гуморальною відповіддю у мишей на 14 і 28 день після імунізації, що вказує на високий титр IgG, IgG2c, IgG3. При чому імунізація 5 мкг 3М-025-Alum – значно посилювала відповіді зародкового центру, Т-фолікулярних хелперних клітин, а також підвищувала титри антитіл порівняно з використанням галуну окремо, як ад'юванта.

Ад'юванти на основі алюмінію (алюміній гідроксид або алюмінієвий галун) нині застосовують у складі щонайменше 146 схвалених вакцин для профілактики захворювань. Найбільш використовуваними ад'ювантами на основі алюмінію у вакцинах є солі трьох типів: алюмінію гідроксид, алюмінію фосфат і калію алюміній сульфат.

Ефективність алюмінієвих солей обумовлена: створенням «депо» антигену у місці введення, уповільненням його виходу (має здатність до сорбції, чим продовжує час контакту вакцини з імунною системою), сильною гуморальною відповіддю при слабкій індукції клітинно-опосередкованої імунної відповіді. Для попередження розвитку абсцесу (можливе за умови підшкірної інокуляції), введення вакцин з солями алюмінію повинно здійснюватись виключно внутрішньом'язово [31,32].

Механізми дії гідроксиду алюмінію та загалом ад'ювантів на основі алюмінію, включають утворення агрегатів (забезпечує безперервне вивільнення антигенів), утворення часткових структур (сприяють фагоцитозу АПК) та індукцію локального запалення (через інфламасому NLRP3), що обумовлює залучення та активацію макрофагів зі збільшенням експресії молекул головного комплексу гістосумісності (МНС II) та презентації антигену. Активація інфламасоми індукує секрецію зрілого IL-1 β та IL-18 дендритними клітинами, диференціювання клітин Th2, сприяючи активації В-клітин й подальшому виробленню антитіл (переважно IgG). Проте у дослідженнях також були

представлені незалежні від NLRP3 шляхи виробництва антитіл та нефагоцитарний спосіб дії гідроксиду алюмінію [33,34].

Незважаючи на те, що алюмінієві ад'юванти широко використовуються у складі вакцин для ефективного потенціювання імунної відповіді, слід приділяти особливу увагу тому, щоб тип алюмінієвого ад'юванта не впливав на стабільність антигенної композиції. Загалом алюмінієвий галун виконує функцію антигенного депо та підсилює фагоцитоз; даний тип ад'юванту дозволяє організму збільшити титр антитіл проти патологій вірусного або бактеріального характерів. Проте варто також зазначити, що алюміній гідроксид вважається генотоксичною речовиною, здатною при надлишковій кількості в організмі призвести до незворотніх змін, погіршувати пам'ять, призводити до психічних розладів та хвороб Паркінсона і Альцгеймера. Разом з тим існує ймовірність підвищення розвитку атеросклерозу та епілепсії [35].

Ще на початку двохтисячних років, групами різних вчених на чолі Rivas E [36] та RK Gherardi [37], було науково підтверджено процес утворення довгострокових відкладень у місцях ін'єкцій вакцин з солями алюмінію, які можуть зберігатися упродовж десятиліть після введення вакцини (макрофагальний міофасциїт). Спочатку вважалося що депо-ефект є важливим для ад'ювантної активності квасцов, але це у подальшому було спростованим завдяки демонстрації їх ад'ювантної дії навіть після виведення депо. Наразі будь-який шкідливий патофізіологічний вплив довготривалих відкладень алюмінію в тканинах і пов'язаного з ними макрофагального міофасциїту, — залишається предметом дискусії.

1.3. Ад'юванти мікробного походження, як перспективні імунопотенціюючі агенти в імунобіотехнології

На сьогоднішній день питанням особливостей ніші застосування, вивчення та дослідження ад'ювантів бактеріального походження, у розрізі їх використання у вакцинології, займався ряд зарубіжних вчених. До прикладу: Selin Parmaksız зі співавторами пропонують використання ад'ювантної системи на основі комбінації поринів *Salmonella typhi* у формі наночасток з ліпосомами (катіонними

та нейтральними) із застосуванням модельного антигену овальбуміну [38]; DH Lee з командою вивчали ад'ювантний ефект від використання сферичних нанометричних везикул зовнішньої мембрани (OMV) грамнегативних бактерій (продуцент *Escherichia coli*) на антигенспецифічний праймінг Т-клітин [39]; Taleghani N. з колегами в одному із останніх досліджень розглядають можливість застосування монофосфорилліпиду А (MPL-A), виділеного переважно з генетично сконструйованого штаму *Salmonella minnesota* R595, як історично першого ліганду TLR, схваленого для використання у якості ад'юванта при створенні людських вакцин [40], та ін.

Відомим ад'ювантом бактеріального походження є флагеллін – найважливіший структурний білок джгутиків грамнегативних бактерій, що складається з 494 амінокислот, де як основний компонент, – сприяє рухливості клітин.

Після потрапляння в організм людини, більшість молекул бактеріальних флагеллінів залишається у джгутиках, але деякі з них вивільняються у середовище, уможливаючи їх розпізнавання імунною системою [41].

Згідно досліджень [42] гіперконсервативні N і C кінці флагелліну, можуть бути розпізнані молекулами Toll-подібного рецептора імунокомпетентних клітин, зокрема TLR-5 (експресуються на макрофагах, лімфоцитах, дендритних клітинах та ін.), та в діапазоні від 1 до 10 нМ – викликати максимальну інтенсивність сигналізації розпізнаним рецептором.

Розпізнавання TLR-5 за допомогою флагелліну призводить до передачі сигналу через MyD88-залежний і MyD88-незалежний шляхи, котрі обумовлюють індукцію факторів транскрипції AP-1, NF- κ B і IRF3, що викликають вироблення цитокінів і хемокинів, які у свою чергу приваблюють (направляють) дендритні клітини, а також Т- та В-лімфоцити до лімфатичних вузлів. Окрім того, флагеллін може сприяти сильній Ag-специфічній (антиген-специфічній) CD4⁺ Т-клітинній відповіді шляхом взаємодії з TLR-5 на CD11c⁺ клітинах. Результатом даної взаємодії є високий титр утворення антитіл, котрий демонструє потенціал флагелліну, як ад'юванта білкової природи [43].

Як ад'ювант флагеллін використовується шляхом спільного введення з основним антигеном та через злиті білки, отримані у результаті додавання епітопів пов'язаних з молекулою флагелліну. При цьому науково доведено, що фізичне зв'язування антигенів вакцини з флагелліном створює значно більш потужну вакцину, ніж просте змішування антигену та флагелліну. Наразі вже визначено у які саме ділянки молекули флагелліну слід вставити епітопи з метою максимізації титру антитіл, однак остаточні висновки наразі поки відсутні [44].

До прикладу, Song L. разом із колегами [45] отримали оптимальні титри антитіл шляхом введення в гіперваріабельну ділянку флагелліну епітопу гемаглютиніну (HA). Науковцями був розроблений підхід зв'язування агоністів Toll-подібного рецептору (TLR-5), флагелліну із самодостатньою захисною субодиницею (глобулярною голівкою) HA. Домен глобулярної голівки охоплює більшість нейтралізуючих епітопів у HA і, у контексті злитого білка флагелліну, стабільно повторно згортається для точного формування цих конформаційно чутливих епітопів. Дані злиті білки і є імунологічно потужними вакцинами та можуть бути експресовані у стандартних системах прокаріотичної ферментації (ферментації *E.coli*). Встановлено, що вакцина R3 (конфігурація – обидва кінця глобулярної голівки HA прив'язані до флагелліну) з-поміж декількох вакцин підтипу H5 (на основі вірусу грипу A/Vietnam/1203/2004 (VN04)), у якій домен D3 флагелліну замінено глобулярною голівкою HA, є найбільш ефективною для виявлення захисних титрів HAI і захисту мишей від хвороб та летальних наслідків.

Інші дослідження [46] демонструють, що вставка епітопу L1R в гіперваріабельну область не тільки не обумовлює вироблення антитіл, але й за умови вставки епітопів L1R в N-кінець флагелліну може призвести до утворення антитіл здатних взаємодіяти з нативним L1R.

Альтернативно, науковці на чолі з Lin K. [47] показали, що вставка епітопів до C-кінця флагелліну може індукувати передачу сигналів через NLRC4 і NAIP5, що призводить до CD8⁺ Т-клітинних відповідей проти пухлинних клітин. Продемонстрована різноплановість відповідей імунної системи, демонструє

універсальність флагелліну у якості допоміжного засобу різної цільової направленості залежно від області введення антигену. Однак, для розкриття повного потенціалу застосування флагелліну, необхідне здійснення подальших фундаментальних наукових досліджень.

На сьогоднішній день використання флагелліну, як допоміжного засобу має ряд переваг щодо безпеки: для ефективності потрібні лише низькі дози; не викликає синтезу IgE; токсичність не є пов'язаною з інтраназальним введенням на тваринних моделях.

Зокрема, авторами досліджень [48], підтверджено безпечність використання злитих білків флагелліну у якості ад'юванта у вакцинах проти грипу А H1N1. Згідно отриманих результатів усі наявні системні побічні ефекти в одних дослідних групах осіб – стабілізуються через 4 дні відпочинку, в інших після прийому нестероїдних протизапальних засобів.

Іншими ад'ювантами мікробного походження, котрі наразі представляють науковий інтерес у біотехнологічних виробництвах є везикули зовнішньої мембрани грамнегативних прокаріот, зокрема *E. coli*. Виділені з *E. coli* везикули зовнішньої мембрани (OMVs) – представляють новий підхід до розробки вакцин (для профілактики та лікування бактеріальних інфекцій) із використанням ад'ювантів бактеріальної природи, через їх властивий запальний потенціал та здатність стимулювати вроджену імунну систему.

Бактеріальні мембранні везикули (BMV) – являють собою сферичні нанометричні везикули (сферичні протеоліпосоми), які вивільняються під час нормального росту та утворюються виступами на зовнішній мембрані, завдяки чому містять ліпополісахариди (LPS), пептидоглікани, фосфоліпіди, білки, ДНК, РНК та інші фактори вірулентності, такі як екзотоксини. Оскільки BMV несуть велику кількість антигенів, котрі можуть індукувати імунну відповідь «in vivo», різноманітні BMV включають OMV (везикули зовнішньої мембрани) та EV (позаклітинні везикули), одержані з бактерій дикого типу або бактерій, отриманих біоінженерними методами [49].

Нині бактеріальні везикули привернули підвищену увагу, як потужна та універсальна вакцинна платформа, адже за своєю суттю є імуностимуляторами здатними активувати одночасно як вроджену, так і адаптивну імунні відповіді ($CD4^{+}$ Т- клітинну та і В-клітинну відповіді). Даний механізм обумовлений розпізнаванням LPS та інших молекул на мембранах молекулами TLR і системою комплементу, що призводить до залучення АПК клітин. Спільна стимуляція молекулами, присутніми в OMV, призводить до більш потужної відповіді, ніж та, що викликається LPS самостійно.

Коли бактеріальні мембранні везикули потрапляють у підслизову оболонку, вони можуть взаємодіяти з макрофагами, дендритними клітинами (ДК) і нейтрофілами (поглинають, метастазують/інактивують везикули). Активовані макрофаги виробляють прозапальні цитокіни, такі як TNF- α та IL-6, і індукують адаптивні імунні відповіді шляхом посилення експресії основного комплексу гістосумісності II класу (MHC-II) молекули HLADR, костимулюючих молекул CD80 і CD86 і молекули міжклітинної адгезії (ICAM1). При цьому BMV мають здатність не лише індукувати дозрівання дендритних клітин, що призводить до посиленого захоплення молекули антигену та її презентації для розвитку адаптивної імунної відповіді, а й також активувати В-клітини для виробництва IgA, IgM, IgG та інших антитіл [50].

Загалом BMV – містять ряд особливостей, котрі роблять їх привабливими для розробки вакцин, зокрема: природня присутність патоген-асоційованих молекулярних патернів (PAMP) для виклику сильних імунних відповідей, здатність презентувати білки з різних джерел, нанорозмір (від 50 до 200 нм) для ефективної обробки та доставки антигену (можуть бути легко захоплені імунними клітинами). Наразі за використання даних властивостей, імунологами по усьому світу було розроблено ряд вакцин на основі BMV проти широкого спектру патогенів [51].

Везикули піддаються модифікації різними способами, зокрема шляхом генної інженерії, завантаження вантажу та покриття наночастинками, щоб створити багатофункціональні платформи, які можна використовувати проти

різних захворювань. У природі BMV можуть утримувати та розподіляти поживні речовини, фактори вірулентності та токсини, водночас виснажуючи антибактеріальні молекули, які генерує господар. Крім того завдяки біогенезу, поверхні бактерій BMV – демонструють широкий спектр бактеріальних мембранних антигенів, які можуть служити основними мішенями для вакцин [52].

Вплив BMV, як ефективного рушія на вроджену імунну систему описується у роботах [53-55], за результатами яких підкреслюється здатність BMV індукувати довготривалі гуморальні та клітинні імунні відповіді за умови їх використання у складі вакцин. Такі властивості можуть бути пояснені високою щільністю асоційованих з патогенами молекулярних структур (PAMP) на бактеріальних везикулах, які служать сильними стимуляторами імунітету.

На сьогоднішній день існує достатньо наукових даних щодо використання BMV/ OMVs у якості ад'юванта у ряді вакцин проти бактеріальних патогенів [56]. До прикладу перші вакцини проти грам позитивної *Neisseria meningitidis*, що викликає захворювання на менінгіт, показали ефективність на 73% або вище у різних піддослідних групах; використовувались у боротьбі з епідеміями та були частиною програм вакцинації більше 20 років [57]. Наразі OMV було включено до ліцензованої багатокомпонентної рекомбінатної менігококової вакцини 4CMenB (Bexsero), що набула широкого використання у багатьох країнах світу.

Також на думку Petousis-Harris, H. зі співавторами наукової роботи [58], існує потенційний вплив вакцини проти *N. meningitidis* OMV (MeNZB) на додаткову імуногенність та перехресний захист від гонореї; підтверджують дану гіпотезу проаналізованими екологічними спостереженнями статистикою зареєстрованих захворювань у Новій Зеландії.

Про перехресний вплив вакцин MeNZB OMV і «Bexsero» засвідчують дані біоінформаційного аналізу вчених з Австралії [59]. За результатами проведеного імуноферментного аналізу (використовували для оцінки утворення антитіл) встановлено, що антитіла проти гонококів, індуковані MeNZB-подібними білками OMV, можуть пояснити попередні спостереження щодо зниження захворюваності на гонорею після вакцинації MeNZB; високий рівень людських анти-гонококових

антитіл NHBA, що утворюються під час вакцинації «Вехсеро», може забезпечити додатковий перехресний захист від гонореї. Наукові пояснення причинно-наслідкового зв'язку перехресного впливу від вакцинації – досі з'ясовуються.

Інші види розроблюваних вакцин з використанням у своєму складі OMV, почали переходити на стадію клінічних випробувань завдяки попередньо продемонстрованій ними безпеці та ефективності. До них відносяться вакцини проти алергенів (фаза I клінічних випробувань), *Shigella flexneri* (фаза I і II клінічних випробувань) та грипу [60]. Дані вакцини вводилися інтраназально та викликали вироблення антитіл із дуже незначними побічними ефектами (імуностимулюючі білки та LPS з OMV не реплікуються, що підвищує їх безпеку), що підкреслюють потенціал OMV, у якості імунопотенціюючих агентів [61].

Відомою є робота [62], де автори мали на меті розробити вакцину-кандидата на основі злиття PorA серогруп A і B (*N. Meningitidis*), у поєднанні з OMV та протестувати її на лабораторних тваринах, порівнюючи ефективність OMV з іншими широко розповсюдженими ад'ювантами. В ході експерименту мишей з різних груп вакцинували підшкірною ін'єкцією з сумішами білків PorA, OMV і ад'ювантом Фрейнда. Надалі здійснювали вимірювання імунної відповіді методом ELISA та аналіз бактерицидної активності сироватки (SBA). Згідно отриманих результатів, титр бактерицидних антитіл у групах, вакцинованих антигенами змішаними з OMV, був значно вищим порівняно з мишами, які отримували антигени плюс ад'ювант Фрейнда, при цьому рекомбінантний білок PorA плюс ад'ювант OMV – були здатні індукувати відповіді антибактеріальних антитіл проти серогруп A і B у моделі миші BALB/c.

Зокрема розповсюдженою наразі є розроблена система клонування на основі *Escherichia coli* та похідних OMV, злитих з ліпопротеїном I зовнішньої мембрани (OprI) *P. aeruginosa*. На практиці дана система виявила імуногенність стимулюванням дендритних клітин/макрофагів, демонструючи потенційну ад'ювантність.

Пізніше Yingying Gan з колегами запропонували використання бактеріальних мембранних везикул OMV продукованих грам негативними бактеріями (*S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecium*) та EV, отримані з грампозитивних бактерій, як системи доставки вантажу у боротьбі з інфекціями, викликаними бактеріальним збудником. Однак дане застосування OMVs та EVs у якості ад'юванта отриманого з використанням продуценту бактеріальної природи, має свої недолік. Проблема обумовлена важкістю підтримання бактеріальної мембрани через відносну крийкість структури MB, що може вплинути на їх поглинання антигенпрезентуючими клітинами. Тому авторами статті з цією метою запропоновано використання покриття MVs на наночастинки для збільшення стабільності «*in vivo*» та часу циркуляції [63].

Тим не менш, використання OMV, як ад'ювантів, створює ще кілька проблем щодо їх виробництва та дизайну. Адже масове виробництво OMV є складною процедурою, за рахунок потреби у контролі вмісту деяких ендотоксинів з метою уникнення стимуляції надмірного запалення. Зокрема необхідно точно контролювати дозу LPS, оскільки OMV з низьким LPS є менш ефективними ад'ювантами, тоді як надмірна LPS може викликати токсичні ефекти [64].

Загалом різні бактеріальні види здатні бути сконструйовані за допомогою генної інженерії для доставки антигену до АПК із сильним ад'ювантним ефектом через їхнє мікробне походження. Шляхи доставки протеїнових або ДНК-кодуючих антигенів і природні бактеріальні тропізми можуть відрізнятися серед видів, що дозволяє їх різне застосування. Після багатьох наукових зусиль, спрямованих на вирішення проблем безпеки та ефективності, деякі фірми, нещодавно почали клінічні випробування живих *Listeria* або *Salmonella spp.*

Бактеріальні вектори дозволяють доставляти складні антигени, які можна оптимізувати для стимуляції як CD8, так і CD4 Т-клітин для отримання довготривалої ефекторної відповіді, одночасно зменшуючи супресорні [65].

Окрім того, наявні бактеріальні LPS та ліганд TLR4 – індукують стійку епігенетичну модифікацію у кістковому мозку та мієлоїдних специфічних

клітинах попередниках з підвищенням мієлоїдних енхансерів, що спостерігається до 12 тижнів після вакцинації [66]. Обумовлюється за рахунок розпізнаванням рецептору TLR4 ліпополісахаридами та його унікальною передачею імунологічних сигналів через MyD88- і TRIF-залежні шляхи.

До прикладу після отриманих результатів лабораторних досліджень проведених на мишах, у ході яких виявили стійкість піддослідних після лікування LPS до подальшого зараження грамнегативними патогенами, стало очевидним, що ліпополісахариди надають стійкість до широкого спектру мікроорганізмів, включаючи грампозитивний *Staphylococcus aureus*, грибкові патогени та полімікробний сепсис. Стійкість до інфекцій, опосередкована LPS, індукується за рахунок посиленого залучення лейкоцитів та послабленням запальних процесів [67].

У відомих дослідженнях з LPS науковцями на чолі з de Laval [66] було продемонстровано, що трансплантовані HSPCs з кісткового мозку LPS-експонованих мишей, здатні захищати мишей-реципієнтів від інфекцій викликаних *P. Aeruginosa*, демонструючи знижене бактеріальне навантаження у селезінці та печінці.

Однак, незважаючи на усі наявні наукові дослідження, результати яких демонструють потенційну терапевтичну користь та LPS-опосередковану стійкість до інфекцій пов'язану зі зниженим бактеріальним тягарем, застосування LPS у якості імуномодулятора для перекладу на клінічний сценарій було значною мірою залишене через його токсичність [68].

1.4. Агоністи Toll-подібних рецепторів, як епігенетичні ад'юванти нового покоління: наукові дослідження та перспектива фармацевтичного застосування

Довгий час вважалося, що імунологічна пам'ять була обмежена антиген-специфічною пам'яттю і є привілеєм адаптивної імунної системи за рахунок роботи лімфоцитів. Проте опис системної набутої резистентності у рослин, специфічної пам'яті у безхребетних, антиген-специфічної пам'яті природних кіллерних клітин (NK) і гетерологічного захисту, що забезпечується вакцинами

БЦЖ, віспи та кору – свідчить про існування форми вродженої імунної пам'яті [69].

Для відображення того факту, що вроджений імунітет «згадує» або адаптується після першого виклику для створення надійної імунної відповіді на наступний виклик подібним або не схожим мікробним стимулом, було запропоновано термін «тренований імунітет». Молекулярні механізми, що лежать в основі тренованого імунітету включають: метаболічне, епігенетичне і функціональне перепрограмування клітин-попередників мієлоїдного ряду гематопоезу, а також клітин вродженого імунітету [70].

Загальновідомо, що ад'юванти посилюють імуногенність вакцини шляхом специфічного націлювання на клітини вродженої імунної системи [71]. Проте наразі з'являється все більше доказів, що попереднє тренування вродженої імунної системи може забезпечити гетерологічний захист від вторинних інфекцій [72-74].

Останні дані підкреслюють здатність деяких імунопотенціюючих агентів індукувати стійне епігенетичне перепрограмування вродженої імунної системи з метою створення покращеної стійкості проти патогенів, що підвищує перспективу розробки епігенетичних ад'ювантів. Відтак експериментально підтверджено, що агоністи Toll-подібних рецепторів (TLR) є багатообіцяючим класом імуномодельюючих агентів, що забезпечують довготривалий захист від наступного інфекційного зараження шляхом посилення вродженого імунітету. Наразі кілька агоністів TLR широко відомі завдяки своїм ад'ювантним властивостям для вакцин, а деякі з них вже схвалені FDA (англ. U.S. Food and Drug Administration), адже їх здатність індукувати тренований імунітет стає все більш визнаною у світі [75].

Зокрема отримані результати проведених епідеміологічних досліджень засвідчують, що імунізація вакцинами БЦЖ [76], вакцинами проти кору [77] та ОПГ – може забезпечити гетерологічний захист антиген-неспецифічним способом проти низки неспоріднених інфекцій. Нині достовірність даного твердження

також досліджується під час клінічних випробувань у контексті використання вакцини БЦЖ, у якості профілактичного заходу проти COVID-19 [78].

Епігенетичні ад'юванти здатні не тільки стимулювати стійкі Т- і В-клітинні відповіді, а й також забезпечувати широкий спектр захисту від різноманітних патогенів шляхом тренування вродженої імунної системи. Відтак вченим Mihai N. з колегами нещодавно запропоновано опис уявлення про «тренований (навчений) імунітет», у розрізі якого підвищується ймовірність набуття клітинами вродженого імунітету нових властивостей через метаболізм та епігенетичне перепрограмування. Докази даного опису представлені у наукових роботах [79,30], що засвідчують здатність деяких вакцинних ад'ювантів індукувати епігенетичний імпринтинг клітин вродженого імунітету, що призводить до тривалого стану протівірусного імунного захисту вакцинованих осіб до широкого спектру інших патогенів.

Однак точні імунологічні параметри та основні механізми вродженого перепрограмування, а також його вплив на захист від різноманітних патогенів – залишаються недостатньо вивченими. Саме тому актуальним є питання механізму дії та впливу попередньої вакцинації на вторинну відповідь при повторному вакцинуванні у контексті ад'ювантів.

До прикладу у статті [80] продемонстровано, що бактеріальний ЛПС (ліпополісахариди/LPS) і грибний β -глюкан здатні індукувати тренований (навчений) імунітет; звідси можна вважати що ад'юванти, які опосередковують вроджені шляхи імунних відповідей, можуть мати подібні ефекти та, відповідно, властивості характерні епігенетичним ад'ювантам.

β -глюкани, як вуглеводні полімери, залежно від джерела походження (клітини бактерій, дріжджів, грибів, рослин та зернових – овес і ячмінь) мають первинні структурні варіації та фізико-хімічні параметри, котрі впливають на їх фізіологічні функції. Дана група полісахаридів вже знайшла своє застосування у виробництві ліків та інших продуктів охорони здоров'я. β -глюкани отримані з різних джерел мають різноманітну первинну структуру та конформації; первинна

структура визначається типом глікозидного зв'язку, а також ступенем розгалуження і полімеризації [81].

Останніми роками β -глюкани вивчали як допоміжні речовини у протиінфекційних вакцинах, а також як імуномодулятори в протипухлинній імунотерапії. β -глюкани можуть регулювати імунну відповідь, якщо їх вводити окремо, і можуть поєднувати вроджений і адаптований імунітети для підвищення імуногенності вакцин [82].

Внутрішня ад'ювантна здатність β -глюканів та здатність активувати вроджену імунну систему, була продемонстрована «*in vitro*» β -1,3-D-глюканами з дріжджів і грибів у посиленні функціональної активності нейтрофілів, макрофагів, ДК та епітеліальних клітин. До прикладу глюкан, отриманий з *Saccharomyces cerevisiae*, може збільшувати продукцію TNF- α в альвеолярних макрофагах щурів «*in vitro*», а інкубація цільної крові людини з PGG-глюканом (розчинний β -1,3-глюкан) – посилювати окислювальний вибух лейкоцитів і підвищувати їх антимікробну активність (за відсутності вироблення запальних цитокінів) [83].

За результатами ж інших проведених досліджень [84,85], β -глюкан та LPS індукують мієлоїдне перепрограмування на рівні клітин-попередників. Зокрема β -глюкан, як компонент клітинної стінки грибів, зв'язує Дектин-1 (CLEC7A – мембранний білок, рецептор розпізнавання патерну глюканів рослинного та грибкового походження) та модулює мієлопоєз у кістковому мозку мишей на рівні гемопоетичних стовбурових клітин та клітин-попередників (HSPCs), що зберігається до 28 днів після імунізації.

Тренування імунної системи β -глюканом у роботах [86, 87] також було пов'язано з метаболічною перебудовою, індукцією факторів транскрипції асоційованого з аеробним гліколізом та активацією шляху синтезу холестерину.

Відтак вченими на чолі з Dos Santos, J. C., [86] експериментальним шляхом (на модельних зразках лабораторних мишей) підтверджено проявлення захисних властивостей β -глюкану та зимозану щодо широкого спектру бактерій, зокрема інфекції подушечок лап викликані введенням інфекційного агента *L. braziliensis*

на 7-й день після праймінгу/імунізації (тренування). Отримані результати пояснювались збільшенням індукції інтерлейкіну IL-32γ, котрий також був присутнім у клітинах-попередниках кісткового мозку упродовж тижня після імунізації.

В інших експериментальних дослідженнях [88,89] β-глюкани різко підвищували рівень виживання піддослідних тварин після зараження патогенними мікроорганізмами або паразитами. Зокрема групою науковців [90] повідомляється про широкий аналіз впливу тренованого імунітету на бактеріальні інфекції викликані *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium* та *Pseudomonas aeruginosa*. У межах здійснених досліджень тренований імунітет у лабораторних мишей отримували шляхом внутрішньочеревного введення 1 мг зимозану (препарату клітинної стінки дріжджів, багатого на β-глюкан) за 3 та 7 днів до зараження. Активність тренованого імунітету визначали аналізами на кількість моноцитів у кістковому мозку, бактерицидним аналізом крові, продукцією цитокінів (імуноферментний аналіз) та імунопреципітацією хроматину. Згідно отриманих результатів, у всіх дослідних групах мишей з попередньо тренованим імунітетом демонструвались: зниження показників тяжкості перебігу захворювань, збільшення кількості цитокінів лейкоцитів й фагоцитів у зразках крові, кращі показники рівня виживання та загальне зменшення бактеріального навантаження.

Найбільш вражає те, що група мишей з «тренованим імунітетом» пережила інфікування *L. monocytogenes*, тоді як уся контрольна група мишей – померла упродовж 5-ти днів після зараження. Варто наголосити, що даний вид бактерій не був виявлений у крові «тренованих мишей» через 2 і 3 дні після інфікування, тоді як до 10⁵ КУО /мл ідентифікували у кровообігу контрольної групи. Загалом навчений імунітет захищав мишей у всіх перевірених доклінічних моделях, що свідчить про посилення широких механізмів захисту, зокрема шляхом підвищення продукції IL-1β та високої стимуляції мієлопоєзу в кістковому мозку.

Нині науково підтвердженою є перспективність застосування дріжджового β-глюкану, як платформи доставки антигену націленого на рецептори захоплення

АПК у поєднанні з властивою йому ад'ювантною функцією. Платформа доставки частинок β -глюкану являє собою високоочищені порожнисті пористі оболонки клітинних стінок (3...4 мкм), отримані з культури дріжджів *S. cerevisiae* шляхом обробки та екстракції лужними і кислотними розчинниками. Глюкан *S. cerevisiae* складається з β -1,3-зв'язаних глюкопіранозильних залишків з меншою кількістю β -1,6-зв'язаних гілок, котрі після лужної та кислотної обробок складаються переважно з β -1,3-глюкану (> 85%), хітину/хітозану (2 %) та є позбавленими від білків, ліпідів (1 %) і маннанів [91].

При потраплянні антигену з платформою доставки із β -глюкану, спостерігається взаємодія рецепторів імунних клітин з двома мембранними рецепторами платформи – CR3 і Дектином-1 (також відомим як CLEC7A). Дектин-1 взаємодіє з рецепторами лектину С-типу, які експресуються на клітинах мієлоїдного ряду (макрофаги, моноцити, нейтрофіли). Зв'язування бета-глюкану з Дектином-1 на ДК та макрофагах викликає їх активацію, дозрівання та посилює вироблення прозапальних цитокінів, таких як TNF- α , IL-6, IL-2, IL-10 та IL-23. Другий рецептор – іC3b-комplementу 3 (CR3, також відомий як Mac-1, CD11b/CD18 або α M β 2інтегрин) є високоекспресованим на природних кіллерних клітинах (NK), макрофагах та моноцитах [92]. Необхідно також зауважити, що дана платформа доставки із β -глюканових частинок – стимулює дендритні клітини для вироблення цитокінів – IFN- γ та IL-17, які пов'язані з позитивними реакціями (спостерігаються при взаємодії з TLR рецепторами) в вакцинних моделях захисту від патогенів.

На сьогоднішній день платформи із дріжджового β -глюкану вже були використані у ряді наукових робіт [93-95] для пероральної та парентеральної цільової доставки широкого спектру класів лікарських засобів (малі молекули, siRNA/DNA, пептидні/білкові антигени й наночастинки) у доклінічних моделях на тваринах.

До прикладу група вчених на чолі з Soto, E. R. ґрунтуючись на пошаровому синтезі «*in situ*» за допомогою електростатичних взаємодій сконструювали частинки клітинної стінки дріжджів для доставки патогенної ДНК [96].

Представлена стратегія інкапсулювання забезпечує високу ємність та доставку нуклеїнових кислот на додаток до пероральної біодоступності частинок β -глюкану та властивості їм здатності націлювати рецептори β -глюкану на АПК. Єдиним недоліком даної технології є цитотоксичність, що проявляється за рахунок послідовної адсорбції полімерів, а саме їх високих концентрацій.

Принцип усунення даного недоліку описується групою інших вчених [97] та здійснюється за рахунок чергування етапів гідратації і ліофілізації в процесі завантаження антигену всередину оболонок β -глюкану. Незважаючи на це, з використанням даного підходу для розробки наноматеріалів, платформу технології доставки було розширено для поєднання ад'ювантів TLR та/або siRNA (в окремих шарах навколо ядра антигену), що забезпечує мультикомплексну спільну доставку для підвищення ефективності та безпеки вакцини [98].

Відомою є робота вчених з Бельгії та США [99], в якій за принципами описаними Soto E. R. та Ostroff G. R., були одержані порожнисті β -глюканові дріжджові оболонки для проведення експерименту пероральної імунізації GP-OVA з метою оцінки ефективності та біосумісності даної модельної вакцини. Для досягнення поставленої мети початково було охарактеризовано мікрочастинки GP-антигену з використанням овальбуміну (OVA), як модельного антигену, а також досліджено імунологічну взаємодію між GP-OVA та епітелієм кишківника в лініях епітеліальних клітин «*in vitro*» та «*in vivo*» (експерименти з оральною імунізацією). Отримані результати досліджень підкреслюють компетентність порожнистих оболонок β -глюкану, як системи доставки у пероральних вакцинах за рахунок тісного контакту з поверхнею слизової оболонки, що призводить до вироблення прозапальних цитокінів і хемокінів. Сама ж пероральна імунізація GP-OVA призводить до стійких гуморальних реакцій у тонкому кишківнику (відповіді S-IgA слизової оболонки та сироваткових IgG) та є перспективною у поточному розвитку пероральної вакцинації проти кишкових патогенів.

Цікавими є наукові дослідження [100,101] з пероральної імунізації антигенами у поєднанні з частинками β -глюканів, як платформи доставки антигену для сприяння посиленій адаптивній імунній відповіді. У ряді даних

експериментів діагностували імуностимулюючу дію пероральної імунізації мікрочастинками β -глюкану, що несуть модельні антигени, такі як OVA та BSA.

В інших дослідженнях проведених Berner V. K. з колегами [102], харчові гранули вкриті кон'югантами MG/F-BSA перорально вводили лабораторним мишам з первинною імунізацією та бустерною дозою через 24 дні. Як результат, кон'югант MG/F-BSA індукував значну адаптативну імунну відповідь ініційовану високими титрами IgG на 29 день і до 100-кратного збільшення на 35 день.

Авторами наукової статті [103] експериментальним шляхом продемонстровано активацію, проліферацію й диференціювання антигенспецифічних клітин Th17 і Th1 та їх змішана відповідь, як результат сенсibilізації мишей упродовж 3 послідовних днів 100 мкг або 300 мкг OVA-вмісних композицій з стимулюванням на 14-й і 28-й день. Дане пероральне введення GP-OVA також викликало збільшення OVA-специфічного IgA, секреторного IgA, а також секреторного компонента у кишкових рідинах. Як результат у дослідних мишей генерувалась клітинна та гуморальна імунні відповіді.

Отримані дані добре узгоджуються з дослідженням проведеним Huang H. та колегами [104], де підшкірне введення композицій GP викликало сильні антигенспецифічні антитіла та Т-клітинні відповіді, включаючи продукцію IFN- γ і IL17а клітинами CD4⁺ Th1 та Th17.

Нині актуальним питанням у світових наукових спільнотах залишається застосування мікрочастинок β -глюканів з метою стимуляції вродженого імунітету. Відтак декілька груп науковців вивчали природну імуностимулюючу активність β -глюканів отриманих з дріжджової культури *S. cerevisiae* у розчинній формі та у вигляді мікрочасток. Поглиблені «*in vitro*» дослідження у роботі під керівництвом Berner, M. D. [105] засвідчують посилену експресію костимулюючих молекул B7.1 і B7.2 (є обов'язковими, як супутній сигнал при активації та проліферації Т-клітин), а також підвищену фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів, як відповідь на попереднє пероральне вакцинування мишей 0,1 мг/кг препаратом мікрочасток β -глюкану упродовж 2 тижнів. Відтак

продemonстровано, що мікрочастинки β -глюкану швидко фагоцитуються перитонеальними макрофагами та індукують регуляцію та секрецію прозапальних цитокінів IL-6, IL-1 β та TNF- α ; дана відповідь посилюється у результаті праймування IFN- γ .

На додаток до відігравання ролі у захисному імунітеті (тобто покращенні стійкості до хвороб), β -глюкани демонструють потенціал для використання в терапії. Наприклад пригнічення імунітету, опосередковане HBV (вірус гепатиту В), призводить до неефективної імунної відповіді у мікрооточенні печінки та є перешкодою в очищенні від вірусу. Однак згідно з дослідженнями [106] β -глюкан (отриманий з частинок дріжджів), який вводився модельним групам мишей проти HBV, здатен провокувати вербовку ДК, макрофагів, ефektorних Т-клітин до печінки, а також посилювати Th1-тип імунної відповіді, що сприяє виведенню ДНК вірусу гепатиту В з печінки.

Пригнічення імунітету також часто виникає в мікрооточенні пухлини та перешкоджає опосередкованій імунними клітинами дії знищення. Тверді частинки β -глюкану можуть перетворювати імуносупресивні макрофаги в класично активовані макрофаги (M1) через Дектин-1 [107].

Нині загальновідомою також є функціональна діяльність β -глюкану у профілактиці або лікуванні злоякісних новоутворень різних органів, зокрема раку шийки матки [108], раку яєчників [109], раку легень [110] та ін. Дана властивість β -глюкану, згідно з представленими дослідженнями у статті [111], обумовлена рецептором CR3 та цитотоксичною дегрануляцією пухлинних клітин (покрытих iC3b), що викликана зв'язуванням опосередкованим β -глюканом-CR3. Саме тому наукова робота, пов'язана із застосуванням β -глюканів для лікування ракових захворювань, є актуальною тематикою сьогодення представленою у ряді досліджень останніх років [112-114].

1.5. Ад'ювантна активність β -глюкану у складі протиінфекційних вакцин

Завдяки таким важливим характеристам β -глюканів, як розпізнавання PRR імунокомпетентними клітинами, а також легкість біотехнологічного отримання, β -глюкани та їх похідні набули широкого використання у якості вакцинних

ад'ювантів та систем доставки вакцин. Варто підкреслити відмінну особливість імуномодулюючої дії β -1,3/1,6-глюкану, – помірне підвищення активності імунної системи без її надмірної стимуляції, що нерідко може спричинити небажані наслідки у вигляді виникнення аутоімунних захворювань [115]. У зв'язку з цим β -глюкани є широко вивченим у світі на предмет їх імуностимулюючих властивостей [116,117], а низка проведених наукових досліджень підтверджують можливість застосування частинок β -глюкану для доставки вакцинного антигену у пероральній імунізації [118,119].

Саме зміни клітинного метаболізму із переходом від окисного фосфорилювання до аеробного гліколізу (ефект Варбурга) є вирішальними для індукції тренованого імунітету індукованого β -глюканом. Індукований β -глюканом тренований імунітет у моноцитах викликає глибокі зміни в клітинному метаболізмі. При цьому трьома найбільш помітними метаболічними шляхами, залученими до тренованого імунітету, є гліколіз, глутаміноліз і синтез холестерину, які пов'язані зі збагаченням β -глюканом H3K4me3, необхідним для тренованого імунітету. Нарешті вже існують докази принципу метаболічно-епігеномних ланцюгів у вродженій імунній пам'яті, демонструючи істотну роль фумарату в модулюванні деградації HIF1 α , метилювання та ацетилювання гістонів [120].

Відтак, у рецептурах багатьох досліджених вакцин, β -глюкани з різних джерел – продемонстрували значну ад'ювантну активність в експериментах на тваринних моделях при варіативних шляхах введення. Огляд дії β -глюкану, як ад'юванта у протиінфекційних вакцинах, наведено у таблиці № 2.

Наразі вже авторами статі [121] розглянуто вплив дієти лосося з додаванням β -1,3/1,6-глюкану та модельної вакцини. Виявлено, що β -глюканова дієта потенціює імунну відповідь на вакцину шляхом посилення вродженої та адаптативної імунних реакцій через транскрипцію ключових генів цитокінів – INF- γ та IL-12.

Pavan T. R. з колегами [122] досліджували ад'ювантні властивості β -глюкану наступним чином: сріблястому сому внутрішньочеревним шляхом вводили

вакцину альбуміну бичачої сироватки (BSA) у дозі (200 мкг/рибу) окремо або в суміші з наступними ад'ювантами: повний ад'ювант Фрейнда (FCA), неповний ад'ювант Фрейнда (FIA), алюміній гідроксид (AlOH), монтанід, чотири типи цитозин-фосфат-гуанін (CpG) олігодезоксинуклеотидів (ODN) і три концентрації β -глюкану; властивість посилення імунітету оцінювали шляхом вимірювання анти-BSA антитіл у зразках крові з двотижневими інтервалами. За результатами проведених досліджень було встановлено, що CpGs ODN і β -глюкан були такими ж ефективними, як і класичні ад'юванти (FCA, FIA, AlOH і Montanide) у стимулюванні антитіл до BSA, з піком на 28 день після вакцинації.

Дослідженою також є ад'ювантна здатність β -глюкану у складі ДНК-вакцин. Такі ДНК-вакцини можуть викликати $CD8^+$ Т-клітинну специфічну імунну відповідь. За результатами проведеної наукової роботи [123] синтетична β -1,6- та β -1,3-глюкогексаоза, що вводиться разом з HBsAg ДНК (pB144) у ДНК-вакцинах, – може сприяти залученню та дозріванню дендритних клітин разом з посиленням вірус-специфічної цитотоксичності лімфоцитів й відповіддю антитіл.

В іншій роботі [124] експериментально підтверджено є потенціал β -глюкану у якості рецепторно-націленої системи доставки антигенів для протиінфекційних, а також протиракових вакцин за рахунок зв'язуючих і стимулюючих властивостей його рецепторів по відношенню до АПК клітин (дендритних клітин й макрофагів).

Зокрема вченими на чолі з Donadei A. [125] було розроблено препарат для шкіри на основі гексасахариду, як системи доставки, в якій β -глюкан ковалентно пов'язаний з білковим антигеном дифтерійного токсину (CRM197). Даний комплекс був орієнтований на Дектрин-1 поверхні ДК шкіри та стимулював продукцію високого рівня антитіл у порівнянні з внутрішньом'язовим введенням. Окрім того у праці [126] було використано оболонки порожнистих частинок β -глюкану (платформу доставки) для інкапсулювання OVA та імунізації піддослідних мишей. У якості відповіді на імунізацію у лабораторних мишей спостерігалась сильна імунологічна реакція за участю Т-хелперів (Th1 та Th17) та фагоцитуючих клітин.

Так, наприклад, у роботах [127-129] науковцями досліджувалось окремо приготовані комплекси β -глюкану-CpG для введення разом з білковими антигенами. Встановлено: дані комплекси сприяють вивільненню цитокінів та індукують сильну цитотоксичну Т-лімфоцитарну відповідь (CTL), що призводить до швидкого вивільнення антигену. У даному випадку препарат, котрий містить β -глюкан, подолав небажану агрегацію, а також видовий бар'єр ад'юванта CpG й ініціював більш сильні антигенспецифічні реакції за участі CD8⁺ Т-клітинних відповідей.

Таблиця № 2 – Узагальнений огляд дії β -глюканів у якості ад'ювантів в протиінфекційних вакцинах

Об'єкт дослідження	Структура β -глюкану (походження)	Форма введення β -глюкану	Антигени	Форма введення антигену	Ефект	Джерело літератури
Лабораторні миші	β -1,6-розгалужений β -1,3-глюкогексаоза (синтетична)	Внутрішньо-черевна	HBsAg	Внутрішньо-черевна	Збільшення кількості рекрутованих і дозріваючих макрофагів та дендритних клітин, вироблення специфічних антитіл. Підсилення Th2 імунної відповіді.	[130]
Собаки	β -1,3/1,6-глюкан (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Оральна	Бівалентна вакцина, що вміщує інактивовані <i>Bordetella bronchiseptica</i> та вірус парагрипу 2 типу	Підшкірна	Збільшення продукції сироваткових імуноглобулінів IgA, IgM. Рівень IgG – залишається незмінним.	[131]
Лабораторні миші	β -1,6-розгалужений β -1,3-глюкогексаоза (синтетична)	Внутрішньо-черевна	HBsAg DNA (pB144)	Внутрішньо-м'язова	Збільшення кількості рекрутованих і дозріваючих дендритних клітин, вірус-специфічних CTL антитіл. Підсилення Th2 імунної відповіді.	[132]
Лабораторні миші	Мікрочастинки β -глюкану (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Оральна	Бичачий сироватковий альбумін	Оральна	Зростання відповіді антитіл на антигени вакцини. Активація антигенпрезентуючих клітин.	[133]

Об'єкт дослідження	Структура β -глюкану (походження)	Форма введення β -глюкану	Антигени	Форма введення антигену	Ефект	Джерело літератури
Лабораторні миші	β -глюкан (ячмінь)	Підшкірна	Менінгококова група Y	Підшкірна	Підвищення CPS-специфічного титру IgG та IgG1	[134]
Лабораторні миші	β -1,3-глюкан гексахарид (синтетичний)	Внутрішньо-черевна	Знешкоджений (детоксикований) дифтерійний токсин	Внутрішньо-шкірна	Зростання титру антиген-специфічних антитіл	[135]
Лабораторні миші	β -глюкан (гриби)	—	Овальбумін	—	Збільшення кількості антиген-специфічних CD8 ⁺ T-клітинних імунних відповідей	[136]
Курчата	Сульфатований β -1,3–1,6-глюкан	Внутрішньо-черевна	Вакцина проти Ньюкаслської хвороби	Внутрішньо-м'язова	Збільшення титру сироваткових антитіл. Концентрація IL-2 and IFN- γ сироватки	[137]
Курчата	Сульфатований β -1,3-глюкан (<i>Lentinus edodes</i>)	Внутрішньо-черевна	Вакцина проти Ньюкаслської хвороби	Внутрішньо-м'язова	Більш високий титр антитіл та більш низька смертність ніж у несольфатованих та не ад'ювантних групах	[138]
Качки та курчата	β -глюкан (<i>Aureobasidium pullulans</i>)	Оральна	Вакцина проти грипу H5N1 та H5N2	Підшкірна	Збільшення титру антигенспецифічних антитіл	[139]

Вченими з шанхайського університету [140] досліджувалось поліпшення імунної відповіді на вакцину проти грипу (H5N1) з сульфатованим (ступінь сульфатування 0,16) дріжджовим (*Saccharomyces cerevisiae*) β -глюканом – GSC у її складі. Виявлено, що GSC можуть значно сприяти проліферації лімфоцитів окремо або синергічно з Con A та LPS, ефективно збільшити відсоток $CD4^{++}$ Т-клітин і підвищити співвідношення $CD4^{+}/CD8^{+}$, а також стимулювати клітини до секреції IL-2 та INF- γ . Дані результати продемонстрували, що сульфатований глюкан володіє допоміжним ефектом щодо вакцини проти H5N1 на моделях мишей та може бути використаний, як ефективний імунний ад'ювант для інактивованої вакцини H5N1.

Відомою є робота [141] в якій запропоновано використання сульфатованого β -глюкану з *Saccharomyces cerevisiae* GSC для підвищення імуногенності вакцини проти Ньюкасла у курей. У ході дослідження на 7, 14, 21, 28, 35 і 42-й день після першої вакцинації вимірювали проліферацію лімфоцитів, титр антитіл у сироватці крові, інтерлейкін-2 (IL-2) та INF- γ . Згідно одержаних результатів експерименту, GSC у відповідній дозі може значно сприяти проліферації лімфоцитів, посилювати титр антитіл та покращувати концентрації IL-2 та INF- γ у сироватці крові. Отримані дані засвідчують: GSC – значно підвищує імунну ефективність вакцини проти хвороби Ньюкасла та є кандидатом на імунний ад'ювант нового типу.

В іншій науковій роботі [142] представлені результати використання вакцини з дріжджовими (*Saccharomyces cerevisiae*) мікрочастинками β -глюкану (MG) кон'югованого з антигеном вакцини. У ході проведених досліджень дендритні клітини кісткового мозку (BMDC) обробляли MG, кон'югованим з овальбуміном (OVA), а потім взаємодіяли зі спленоцитами трансгенних мишей DO11.10, які експресують OVA пептид-специфічний Т-клітинний рецептор. Виявлено, що BMDC, оброблені MG:OVA, – індукували значно більшу кількість активованих ($CD25^{+}CD69^{+}$) OVA-специфічних $CD4^{+}$ Т-клітин, ніж BMDC, оброблений лише OVA. При чому BMDC, оброблений MG:OVA – посилював експресію CD86 і CD40, а також сам MG, що вказує на те, що кон'югація OVA не

змінює імуностимулюючу здатність MG. Активація CD8⁺ OVA-специфічних OT-1 клітин показала, що MG:OVA також здатний посилювати перехресне представлення BMDC до CD8⁺ цитотоксичних T-клітин. Ці результати демонструють, що MG діє як ад'ювант для посилення презентації антигену дендритними клітинами до наївних, антигенспецифічних CD4 і CD8 T-клітин «*in vitro*».

Існують дані [143], щодо використання у якості «патогеноподібного» ад'юванту для антигену гепатиту В, біополімерів хітозану у поєднанні з поверхневою локалізацією частинок β-глюкану для імітації клітинної стінки деяких патогенів та стимулювання імунних клітин з експресією рецептору Dectin-1. Частинки β-глюкану (ChiGluPs) були розроблені за допомогою методу осадження хітозану в лужному розчині β-глюкану з подальшим зшиванням геніпіну. Оптимізований метод створив частинки із середнім діаметром 837 нм для ChiP і 1274 нм для ChiGluP, що показали високу ефективність завантаження антигену та низьку цитотоксичність. Окрім розвитку частинок, було проведено деякі аналізи «*in vitro*», щоб зрозуміти цитотоксичність частинок для клітин-мішеней, а також їх здатність завантажувати та доставляти модельні антигени.

Подальші дослідження вакцинації мишей демонструють, що ChiPs, і ChiGluPs мають допоміжний ефект для поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg). Окрім того ChiGluPs – призводить до підвищення відсотку імуноглобулінів класу G анти-HBsAg у сироватці крові у 16 разів вище, ніж ChiPs, за умови введення – 1,5 мкг HBsAg на дозу. Показники кількості IgG1, при цьому були у 5 разів вищі, а показники кількості IgG3 – у 4 рази вища для ChiGluP у порівнянні з ChiP. Загалом, розроблений метод приготування дозволив отримати вигідну комбінацію β-глюкану з хітозаном без хімічної функціональності, що є додатковим кроком до виробництва індивідуальних ад'ювантів з використанням простих методів осадження.

Аналіз та узагальнення фармакодинамічних ефектів β-глюкану, виявлених в експериментальних і клінічних умовах, дозволяють рекомендувати їх до

використання у якості засобів профілактики та лікування реконкурентних бактеріальних, грибкових, вірусних та паразитичних інфекцій в умовах первинних і вторинних імунодефіцитів різної етіології, а також при алергічних захворюваннях (бронхіальна астма, алергічний риніт, атопічна екзема). У даний час на українському фармацевтичному ринку присутній високотехнологічний продукт натурального походження, що містить β -1,3/1,6-глюкан з екстракту *Pleurotus ostreatus* – дієтична добавка «Імунікс» виробництва «IXX pharma» (Бельгія) [144].

Загалом про імунологічну дію β -глюкану, як результат низки наукових досліджень повідомлялось вже давно, однак дослідження щодо властивостей β -глюкану стосовно регуляції імунної системи, ад'ювантного ефекту та рецепторної взаємодії – знаходиться на етапах дослідження. І, хоч наразі ад'ювантність β -глюканів є загальновизнаною, існують наукові статті в яких повідомляється про протилежні результати та висновки [145].

До прикладу пероральне застосування β -1,3/1,6 глюкану не призводить до збільшення продукції антигенспецифічних антитіл до фібрального антигену F4 у дослідах зі свинями. Ідентична ситуація спостерігалась у дослідженнях групи добровольців чоловічої статі – пероральне введення β -глюкану не мало впливу на продукцію цитокінів і мікробну активність лейкоцитів [146]. Зважаючи на дані невідповідності, актуальним є проведення додаткових детальних досліджень за участі лабораторних тварин з вакцинним ад'ювантом на основі β -глюкану задля одержання більш переконливих результатів; результатів щодо зв'язувальних ефектів β -глюкану та їх механізмів з рецепторами імунних клітин (дендритних клітин, макрофагів і гранулоцитів).

Найважливіший фактор, який відіграє ключову роль у взаємодії β -глюканів з рецепторами імунних клітин – це структура PAMP (β -зчеплені магістралі), яку можна розпізнати PRRs – Дектрин-1 та CR3. Тобто, у загальному вигляді механізм дії β -1,3/1,6 глюкану можна пояснити його вираженою селективністю по відношенню до специфічних рецепторів (Dectin-1, Complement 3, Lactosylceramide і ін.), котрі знаходяться на поверхні макрофагів та зв'язуються лише з

нерозгалуженою ділянкою молекули β -глюкана. Як результат – спостерігалась активація макрофагів, яка в свою чергу призводить до реалізації цілого ряду процесів через тригерні механізми, що спрямовані на імунний захист. По-перше, активується фагоцитарна функція макрофагів, по-друге, посилено синтезуються і вивільняються цитокіни (інтерлейкіни, інтерферон), що є сигнальними білками для інших клітин імунної системи – Т-лімфоцитів, фактора росту епідермальних клітин, фактору ангіогенезу [147].

Активовані β -глюканом моноцити та макрофаги індукують метаболічний зсув через рецептор Dectin-1 у бік аеробного гліколізу. Дані зміни клітинного метаболізму із окисного фосфорилювання до аеробного гліколізу (ефект Варбурга) – вирішальні для індукції тренованого імунітету індукованого β -глюканом, котрий викликає глибокі зміни в клітинному метаболізмі моноцитів. При цьому трьома найбільш помітними метаболічними шляхами, залученими до тренованого імунітету, є гліколіз, глутаміноліз і синтез холестерину, які пов'язані зі збагаченням β -глюканом H3K4me3, необхідним для тренованого імунітету.

Саме ж навчання моноцитів β -глюканом – індукує переналаштування клітинного метаболізму, що модулює епігенетичне програмування метаболічних генів [148].

Нещодавні дослідження з використанням лігандів Toll-подібних рецепторів (TLR) показали, що антигени, асоційовані з їхніми лігандами, можуть продукувати надзвичайно високий рівень антитіл і швидку імунну відповідь. Тому найбільш доцільним при виборі імунопотенціюючого агента для створення вакцин є врахування його агоністичних властивостей Toll-подібних рецепторів та перспектив фармацевтичного застосування. Узагальнені дані з цього питання наведені у таблиці № 3.

Таблиця № 3 – Узагальнені таблиця порівняння характеристик найбільш розповсюджених ад'ювантів та систем доставки

№	Ад'ювант	Toll- подібні рецептори (TLR)	Практичне застосування «+»	Практичне застосування «-»	Імунологічна відповідь	Джерело літератури
<i>Хімічно синтезовані ад'юванти</i>						
1	Солі алюмінію	Активация PRR вроджених шляхів та виробництво цитокінів IL-1 β та Th2 типу імунних відповідей.	- Доступність; - низька собівартість; - практика попереднього застосування; - схвалення на ринку вакцин; - розвиток високого титру антитіл (при первин. імунізації).	- Низька захисна ефективність; - потенційні побічні ефекти; - потенційна токсичність (нейротоксичність); - алергічні реакції; - здатні сприяти до виникнення ASIA (аутоімунний/запальний синдром).	- Створення ефекту «депо». Стимулювання активації інфламасоми NLRP3, що призводить до виробництва IL-1 β та IL-18 з наступним місцевим запаленням і рекрутуванням APC. - Посилення презентації антигену APC клітинами та вироблення IgG1 та IgE, що сприяє відповіді клітин Th2 (ефективний стимулятор імунітету Th2). - Індукція виробництва DAMP, активация PRR вроджених імунних шляхів, що призводить до виробництва цитокінів IL-1 β .	[149-157]
2	Ліпідні наночастинки (LNP)	TLR4 ліпосоми.	- Комплексний імунний захист; - захист антигену від деградації та підвищення його стабільності в організмі; - біологічна сумісність. - входить до складу вакцин проти COVID-19 для доставки мРНК антигену Pfizer BNT162b2 (Comir-naty) і вакцина Moderna мРНК-1273 (Spikevax).	- Потенційні побічні ефекти;	- Посилення гуморального та клітинного імунітетів до білків і полісахаридних антигенів. Подовження періоду напіврозпаду антигенів у крові, забезпечуючи більший вплив антигену на APC після вакцинації. - Перенесення асоційованих з патогенами молекулярних структур (PAMP) або специфічних імуномодуючих молекул, ліпосом; можуть активувати ДК, макрофаги та NK-клітини. - Можлива модуляція генерації CD4+- та CD8+-опосередкованих імунних відповідей, а також генерації фенотипів Th 1, Th 2 або Th 1 /Th 2 , перемикачу Th 1 / Th 2.	[149-157]

№	Ад'ювант	Toll- подібні рецептори (TLR)	Практичне застосування «+»	Практичне застосування «-»	Імунологічна відповідь	Джерело літератури
3	CpG ODN 1018	TLR9	- Висока хімічна стабільність; - доступність обумовлена синтетичністю; - схвалення до використання у широкому спектрі вакцин.	- Підвищена чутливість до аутоімунних захворювань, схильність до токсичного шоку; - більш високі рівні побічних ефектів; - невизначеність потенційного профілю безпеки;	- Специфічно активує TLR9, що призводить до активації TRF7, надалі до вироблення прозапальних цитокінів та інтерферонів типу I, як наслідок – сильні клітинні відповіді Th1-типу та виробництва цитотоксичних Т-клітин. - Збільшення вироблення аутоантитіл, прозапальних цитокінів, а також TNF-α при багаторазовому введенні в організм господаря.	[149-157]
Емульсійні ад'юванти «масло-у-воді»						
4	MF59	Індукція відповіді антитіл через MyD88-залежний механізм, який не залежить від TLR. Взаємодія з рецепторами: TLR4,7,9.	- Доведена безпечність; - добре переноситься імунізованими; - схвалення до використання для людей із груп ризику; - подвійна функц.: доставка антигену та імунна стимуляція.	- Побічні ефекти у місці ін'єкції; - можливі еритема та ущільнення;	- Активує міелоїдні клітини (макрофаги та DC), які реагують утворенням хемокінів, таких як CC-хемокін-ліганд 2 (CCL2), CCL4, CCL5 і CXCL-хемокін-ліганд 8 (CXCL8; також відомий як IL-8), які, у свою чергу, рекрутують нейтрофіли, еозинофіли, а також більше моноцитів і DC до місця ін'єкції. - Індукує транскрипційні зміни в м'язових клітинах 71, більше, ніж у DC. - Може функціонувати через NLRP3-незалежні шляхи активації – ASC і TLR, MyD88. - Призводить до Th2-упередженої імунної відповіді та слабкої індукції Th1-відповіді в організмі. - Індукує відповіді антитіл через MyD88-залежний механізм.	[149-157]

№	Ад'ювант	Toll- подібні рецептори (TLR)	Практичне застосування «+»	Практичне застосування «-»	Імунологічна відповідь	Джерело літератури
5	AS03 (містить α -токоферол)	Шлях відповіді розгорнутого білка (UPR). Імуностимулюючий ефект через NLRP3-незалежний шлях активації ASC і TLR-незалежний шлях активації MyD88. Взаємодія з рецепторами: TLR4,7,9.	- Доведена антиоксидантна та імуностимулююча властивості α -токоферолу; - сильна імунна відповідь (після 6 місяців вакцинації); - ліцензований ЄС та FDA для вакцин проти грипу.	- Суб'єктивна непереносимість;	- Стимулює імунну систему шляхом активації NF- κ B, який індукує секрецію цитокінів і хемокинів у м'язах і лімфатичних вузлах, що сприяє міграції клітин вродженого імунітету. - Посилює величину та широту відповідей антитіл і відповідей CD4 ⁺ Т-клітин, що призводить до посиленого захисту від грипу за рахунок вироблення антитіл та більш високого рівня В-клітин пам'яті. - Підвищує сироваткові рівні IL-6 та IP10 (CXCL10), транскрипційні ознаки передачі сигналів інтерферону, процесингу антигену та презентації в DC, моноцитах й нейтрофілах.	[149-157]
Ад'юванти мікробного походження						
6	Ад'ювант Фрейнда CFA (містить мікобактерії вбиті теплом)	Мікобактерії у CFA приваблюють фагоцитарні клітини до місця ін'єкції.	- Сильна імунна відповідь на інкапсульований агент; - загальна посилена імунна відповідь.	- Тривале місцеве запалення; - сильні побічні ефекти; - можлива поява виразки в місці ін'єкції; - токсичність.	- Ефективність у стимулюванні клітинної імунної відповіді та може призводити до потенціювання продукції IgG та IgA. - Допоміжна активність IFA заснована на постійному вивільненні антигену в місці ін'єкції. Індукує переважно Th2-зміщену відповідь через утворення депо в місці ін'єкції та стимуляцію плазматичних клітин, що виробляють антитіла. - Збільшення тривалості життя антигену й	[149-157]

№	Ад'ювант	Toll- подібні рецептори (TLR)	+	-	Імунологічна відповідь	Джерело літератури
					сильної місцевої стимуляції вродженого імунітету з фагоцитозом, рекрутуванням і інфільтрацією лейкоцитів; продук. цитокінів.	
7	β-глюкани	Метаболічне перепрограмування та епігенетичні модифікації. Комбінований вплив на Dectin-1, TLR2, 4, 5 та рецептор комплементу 3.	- Доступність; - технологічна легкість отримання; - економічна привабливість; - епігенетична дія та метаболічне перепрограмування клітин; - ліцензована FDA та ЕМА; - запобігання/лікування надмірної мікроглії.	- Начасі не виявлено суттєвих побічних реакцій; - потреба додаткових медичних досліджень.	- Індукує триметильований гістон H3 за Lys4 (H3K4me3) і H3, ацетильований за Lys27 (H3K27ac) у моноцитах і макрофагах. - Виявляється моноцитами/макрофагами через рецептор Dectin-1, запуск якого активує шлях PI3K (фосфоінозитол-3-кіназа)/АКТ/mTOR (мішень рапаміцину для ссавців)/HIF-1α (фактор, індукований гіпоксією-1α) – індукує метаболічний зсув у бік аеробного гліколізу посилює глутаміноліз, який поповнює цикл трикарбонових кислот, активує шлях синтезу холестерину і блокує ітаконатний шлях. Утворені та накопичені метаболіти (фумарат, сукцинат, мевалонат) – діють як кофактори епігенетичних модифікаторів та підсилювачі тренованого імунітету. - Індукує вироблення підвищеного рівня цитокінів – 1β [IL-1β], IL -32γ, інтерлейкін 6 [IL-6]), а також TNF. Підвищує загальних титр сироваткових імуноглобулінів IgA, IgM, IgG.	[149-157]
8	OMVs	TLR4	- Внутрішня ад'ювантна активність; - можуть виступати носіями вакцини; - доступність.	- Висока вартість; - технологічна важкість отримання; - провокація запальних процесів; - ендотоксичність.	- Підвищує поглинання антигену та індукуює експресію молекул клітинної поверхні, рецепторів і коstimулюючих молекул, що призводить до посиленого виробництва Т-клітин. - Призводить до рекрутингу імунних клітин і стимулювання APC через посилену експресію рецепторів і коstimулюючих молекул – посилює виробництво Т-хелперів (Th1 і Th2), а також клітинну та гуморальну імун. системи. Активує ембріональні клітини нирок через комплекс TLR-2/TLR-1, підвищуючи титр IgG.	[149-157]

Отже, імуномодуляція через націлювання на Toll- подібні рецептори поверхні клітин є основною у створенні антиген-агностичних вакцин нового покоління із застосуванням епігенетичних ад'ювантів для стійкого перепрограмування вродженої імунної системи та стимуляції тривалого і підвищеного стану вродженого захисту від різноманітного спектру патогенів. Такі «універсальні вакцини» можуть мати значний вплив під час пандемії, коли звичайні вакцини, які забезпечують антиген-специфічну імунну відповідь, є недоступними.

Аналізуючи узагальнені результати (табл. №3) з наявних наукових даних щодо плюсів та мінусів актуальних ад'ювантів для розробки вакцин, можна підтвердити висновки про те, що ад'юванти OMVs – потребують раціонального дизайну для виклику оптимальної імунної відповіді. OMV у поєднанні з деякими агоністами TLR, можуть викликати не контрольовані відповіді по типу фактору надмірного запалення у додаток до вже існуючої можливості провокації запальних процесів обумовлених наявністю значної кількості ендотоксинів у складі OMV; виникає потреба постійного контролю вмісту ендотоксинів.

Загалом OMV та EV – мають ряд технологічних проблем у разі комерціалізації їх отримання, обумовлених декількома причинами. Перша – це важкість підтримання бактеріальної мембрани у наслідок крихкості структури, що негативно впливає на їх поглинання АПК клітинами та, відповідно, на подальші процеси антигенної презентації. Виникає потреба застосування додаткового покриття MVs на наночастинки для збільшення стабільності, що ускладнює технологію отримання, у додатку до достатньо високої вартості самих OMV. Друга – це рішення проблеми підбору раціонального піногаснику (через необхідну аерацію при вищій щільності клітин) під час ферментації бактеріального продуценту. Адже більшість піногасників є несумісними з процесами виробництва OMV, а їх поверхнево-активні речовини можуть впливати на цілісність або перешкоджати очищенню OMV [158, 159].

Інші широко відомі та розповсюджені ад'юванти як солі алюмінію – наразі визнані генотоксичними речовинами (потенційні мутагени та канцерогени)

здатними спровокувати незворотні зміни й психічні розлади, погіршувати пам'ять, викликати хвороби Паркінсона та Альцгеймера, ймовірності розвитку атеросклерозу та епілепсії.

Варто зазначити, що алюміній є токсичним металом, який використовується в рідкій формі у складі вакцин, з неприйнятними побічними ефектами при застосування у дуже високих дозах, включаючи ад'ювантний артрит, еозинофілію, стерильні абсцеси, нейротоксичність, алергенність та міофасціальний біль. Нарешті, слабка індукція імунітету слизової, також чинить обмежуючий вплив на розвиток ефективності від вакцинації [160,161].

До мінусів застосування LPS у якості імунопотенціюючих агентів вакцин нового покоління, можна віднести його токсичність, що достатньо ускладнює переклад використання LPS-ад'юванту на клінічний сценарій. Проблеми зі стабільністю, виробництвом і забезпеченням якості, здається, були основними факторами відсутності жодної реєстрації ад'юванта на основі ліпосом для використання людиною [162].

Небажані побічні ефекти, пов'язані з використанням CFA (ад'ювант Фрейнда), включають посилення болю, страждань і захворюваності у щеплених тварин з потенційними серйозними загрозами їх здоров'ю та безпеці. Навіть для досліджень на тваринах наразі існують рекомендації щодо його використання через хворобливу реакцію та можливість пошкодження тканин. Загалом CFA хоча і є потужним, проте має характеристики токсичності для використання людиною (призводить до гранульом, уражень та запалення у місці ін'єкції) за рахунок високого вмісту відпрацьованих масел, що не піддаються біологічному розкладанню, а також його низької якості [163].

Емульсійні ад'юванти — вважаються токсичними для звичайних профілактичних людських вакцин. До частих побічних ефектів емульсій відносять: запальні реакції, гранульоми і виразки в місці введення. Окрім того варто також згадати про неповне формування імунної відповіді після імунізації. За усіх перерахованих вище негативних аргументів щодо використання

емульсійних ад'ювантів у складі новітніх вакцин, їх позитивні якості по тому дешевизни та широкого розповсюдження, є повною мірою нівельовані [164].

У відповідності до результатів попередньо проведених наукових досліджень на мишах, ін'єкції вакциною з ад'ювантом MF59 – стимулюють позаклітинне вивільнення АТФ, інгібування якого місцевими ін'єкціями апірази, можуть послаблювати імунну відповідь [165]. Відтак імунізація мишей MF59 призводить до некроптозу макрофагів лімфатичних вузлів і стимуляції антиген-специфічних CD8 + Т-клітин (присутніх у дуже низькій кількості в дренуючих лімфатичних вузлах, але виявляються з набагато більшою частотою в легенях і печінці). Варто також зазначити, що вакцинація MF59 – призводить до сильної Th2-упередженої імунної відповіді та слабкої індукції Th1-відповіді в організмі людини, що є доцільним за умови бактеріальної природи патогену у вакцині та значним мінусом для вакцинації проти вірусних збудників захворювання [166].

Синтетичні одноланцюгові молекули ДНК в ад'юванті CpG ODN 1018 можуть зменшувати апоптоз активованих лімфоцитів, збільшувати вироблення аутоантитіл і прозапальних цитокінів, а також індукувати TNF- α при багаторазовому введенні в організм господаря або в поєднанні з сублетальними дозами ЛПС. Але, нажаль, такий ланцюг імунологічних реакцій може призвести до підвищеної чутливості господаря до аутоімунних захворювань чи схильності до токсичного шоку. Декілька інших досліджень також показали більш високі рівні болю, набряку, ущільнення, свербіжу, еритеми та системних симптомів, викликаних вакцинами з ад'ювантом CpG ODN 1018. Усі ці ефекти підвищили невизначеність потенційного профілю безпеки ад'ювантів CpG [167].

Загалом, ідеальний ад'ювант не повинен мати неприйнятних побічних ефектів, водіє доведеною безпечністю і стабільністю. Його виробництво повинно бути легким, економічно ефективним і сумісним з широким спектром компонентів вакцини. Тому, зазвичай, потенційна токсичність залишалась найважливішим стримуючим фактором для розробки традиційних ад'ювантів. Таким чином, довгострокова мета має зосереджуватись на виборі оптимальних платформ і ідентифікації ключових вроджених імунних мішеней для

індукції потужних, але безпечних імунних відповідей з урахуванням природи патогену вакцини.

На думку авторів роботи, для створення новітніх вакцин (вакцини проти вірусу герпесу II-го типу), саме вибір β -глюкану, як епігенетичного ад'юванту, є найбільш раціональним з урахування здатності ад'ювантів впливати на імунний фенотип, тим самим дозволяючи виробляти найбільш ефективні режими імунітету для кожного конкретного збудника після вакцинації.

По-перше, епігенетичний статус β -глюкану був неодноразово підтверджений матеріалами попередніх наукових досліджень, згідно з якими вакцини як РАРМР – індукують триметильований гістон H3 за Lys4 (H3K4me3) і H3, ацетильований за Lys27 (H3K27ac) у моноцитах та макрофагах. Дані змінити зберігаються упродовж кількох тижнів після усунення подразників, що призводить до покращення епігенетичного статусу. Проте важливим є саме покращення епігенетичного статусу, котрий індукує посилену експресію генів (пов'язаних з метаболічними, імунними та захисними шляхами господаря), отриманого під час вторинного стимулу тим самим або іншим РАРМР. Таким чином, треновані моноцити/макрофаги виробляють підвищений рівень цитокінів (фактор некрозу пухлини [TNF], інтерлейкін 1 β [IL-1 β] та інтерлейкін 6 [IL-6]) під впливом мікробних сполук. Це створює привабливу можливість націлювання малих молекул на відповідні типи клітин, як імунологічних модуляторів, для перепрограмування епігенетичного ландшафту вродженої імунної пам'яті [168].

β -глюкан також здійснює вплив на імунну систему шляхом зв'язування з рецепторами розпізнавання образів (PRR), такими як лектин Дектин-1 С-типу, рецептор комплементу 3 і Toll-подібні рецептори (TLR); є імуnoreгуляторним лігандом для TLR2 і TLR4. Ці рецептори експресуються переважно на макрофагах, дендритних клітинах (DC) і нейтрофілах. Зв'язування β -глюканів з Дектином-1 посилює вироблення прозапальних цитокінів, індукує фагоцитоз і активує адаптивний імунітет. Окрім того розчинні β -глюкани синергетично діють на Dectin-1A-TLR4, можуть бути використані для запобігання або лікування надмірної активації мікроглії під час хронічних запальних станів [169].

Відтак, до прикладу, невеликі молекули, котрі націлені на моноцити або інші імунні клітини мієлоїдного ряду, можуть бути піддані епігенетичному перепрограмуванню, яке стимулює посилену активацію певних аспектів вродженої імунної відповіді. Корегуємо направленість з урахуванням природи патогену вакцини, у нашому випадку на противірусний стан, який забезпечить підвищену стійкість до вірусу упродовж деякого періоду часу (можливо кілька тижнів або близько того). У такому випадку β -глюкан, як епігенетичний ад'ювант, може бути використаний для імпринтингу посиленого противірусного стану, який забезпечує стійкість проти широкого спектру вірусів у людини. Що з теоретичної точки зору, додатково може бути особливо вигідним під час пандемії (до прикладу пандемія COVID-19) для надання підвищеної антивірусної резистентності упродовж обмеженого періоду (приблизно кілька тижнів) у сприятливій для цього популяції [170].

Зокрема нещодавні дослідження [30,171] демонструють наукові докази індукції епігенетичного імпринтингу вроджених імунних клітин (моноцитів, макрофагів та NK), що призводить до тривалого стану противірусного імунітету та неспецифічного захисту від повторного зараження. Це підвищує перспективу розробки епігенетичних ад'ювантів, які окрім стимуляції надійних Т- і В-клітинних відповідей, забезпечують широкий захист від різноманітних патогенів шляхом тренування вродженої імунної системи [172].

По-друге, β -глюкан, як ад'ювант, впливає на активацію ряду кінче необхідних імунологічних процесів для отримання противірусних вакцин нового покоління:

- посилює продукцію прозапальних цитокінів IL-6, IL-8 і TNF- α в макрофагах TLR-1 – необхідно для регуляції запального процесу (як вродженої ланки імунітету), відповідно пришвидшеного фагоцитозу та подальшого презентування антигенпрезентуючими клітинами антигену В-клітинам для активації адаптативної імунної системи й виробництва антитіл;

- впливає на транскрипцію ключових генів цитокінів – INF- γ та IL-12 та стимулює клітини до секреції IL-2 та INF- γ , що є вкрай важливим при вірусних

захворюваннях. Саме інтерферони необхідні для активації плазмоцитоїдних дендритних клітини з метою вже їх подальшої продукції інтерферонів у більших масштабах для посиленої активації імунної системи. Окрім того інтерферони заважають реплікації вірусів спонукаючи клітини людського організму до уповільнення продукування нових білків;

- підвищує загальний титр імуноглобулінів сироватки крові IgA, IgM, IgG. Де IgA – захищає слизові оболонки (вірус першочергово націлений на захоплення епітеліальних клітин слизових оболонок) та дихальні шляхи (найбільш розповсюджений спосіб потрапляння вірусу в організм людини є повітряно-крапельний шлях), що є важливим при вірусних інфекціях; IgM – ефективний проти вірусів, як потужна рання зброя, здатна уповільнити розвиток інфекції; IgG – продукується у разі наявності великої кількості клітин заражених вірусом та необхідний для попередження проникнення вірусів у ще не заражені клітини людського організму;

- індукує чітку вроджену імунну пам'ять у диференційованих макрофагів, що має вагоме значення також і для альвеолярних макрофагів, котрі в легенях першими зустрічаються з вірусом при його проникненні повітряно-крапельним шляхом;

- лейкоцити, піддані впливу β -глюкану, викликають посилену реакцію на вторинну стимуляцію відповідним патогеном;

- може забезпечувати перехресний захист від ряду інших патогенів за рахунок активації TLR, адже різноманітні ліганди TLR здатні опосередковувати захист від інфекцій спричинених широким спектром мікроорганізмів (які активують різні TLR), включаючи грампозитивні та грамнегативні бактерії, гриби й віруси;

- забезпечує тренований імунітет, індукований агоністичними властивостями β -глюкану до TLR;

- має потенційні Th1-стимулюючі ад'ювантні властивості, що є максимально важливим, оскільки імунітет серотипу Th1 – критичний для контролю вірусів [174, 175].

По-третє, вакцини з використанням β -глюканів у якості ад'ювантів нового покоління можливо застосовувати як перорально, так і парентерально. Ця фармакологічна особливість β -глюканів зумовлює їх широке використання в медичній практиці. Тому імуностимулюючі полісахариди з притаманною біосумісністю та здатністю до біологічного розкладання – вважаються оптимальною стратегією для нових ад'ювантів, що імітують властивості патогенів.

Отже, вакцинація була та залишається на сьогоднішній день одним із найбільш потужних засобів боротьби з інфекційними захворюваннями відомих людству. Завдяки цим ефективним та безпечним засобам, більш ніж за два століття людство змогло викорінити натуральну віспу, усунути поліомієліт у більшій частині світу й значно знизити відсоток смертності та захворюваності. Наразі важливість щеплень добре підкреслила нещодавня пандемія COVID-19 і тому для підготовки до майбутніх пандемій, необхідно досягти подальшого прогресу в дослідженні вакцин. Ефективність же вакцин ґрунтується на основних властивостях виду патогенного матеріалу і внеску ад'ювантів. Тому при їх виробництві слід приділяти найбільшу увагу даним молекулам для отримання більш безпечних та ефективних імунобіологічних препаратів. Дослідження у цій галузі досі тривають і кілька продуктів вже детально вивчаються науковцями для досягнення поставленої мети, адже вибір ад'ювантів є критичним кроком у розробці вакцини чи імунотерапії.

Нині одними з найбільш актуальних імунопотенціюючих агентів для виробництва вакцин нового покоління є агоністи TLR рецепторів (епігенетичні ад'юванти), завдяки своїм привабливим імуностимулюючим властивостям: індукції посиленої активації із залученням імунокомпетентних клітин, антимікробним ефекторним функціям (фагоцитоз, респіраторний вибух, виробництво прозапальних цитокінів та хемокінів), бактеріальному клінексу та виклику перехресного захисту від інфікування клінічно значущими патогенами. Окрім того, застосування епігенетичних ад'ювантів у складі вакцин може мати додатковий позитивний ефект від впливу на «тренований імунітет» та утворення

форми імунної пам'яті у вроджених імунних клітинах через метаболічне та епігенетичне перепрограмування.

Не менш важливо, щоб обраний ад'ювант був безпечним, стабільним, сумісним із широким спектром компонентів та характеризувався найменшою інтенсивністю прийнятних побічних реакцій; ще краще – цілковита їх відсутність. Варто також зауважити, що успішні ад'юванти для вакцин повинні бути легкодоступними, економічно ефективним, мати низьку собівартість у якості гарантії використання у будь-якій кінцевій популяції, для якої потрібна розробка вакцин у конкретно визначений період часу. Нарешті бажано, щоб імунопотенціюючий агент застосовувався лише один раз.

Однак, питання підбору безпечних та ефективних ад'ювантів/їх систем, наразі є дуже широкою областю досліджень, де винайдення нових фармакологічних препаратів, молекул або комбінації допоміжних речовин, які вже використовувались раніше, посідає чільне місце для розвитку імунобіотехнології сьогодення. Саме тому доречним наразі є розроблення нових біотехнологічних підходів для одержання безпечних ад'ювантів.

Розділ 2. ТЕО ВИРОБ-НИЦТВА ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ (ВАКЦИНИ)

2.1. Передумови виробництва імунобіологічного препарату

Станом на сьогоднішній день в імунобіотехнологіях спостерігається помітне зрушення та глобальні зміни стратегій, котрі характеризуються переходом від застосування компонентів та препаратів синтезованих хімічним шляхом у сторону використання сполук природного/мікробного походження або їх аналогів [176].

Мікробний синтез β -глюканів має ряд переваг на противагу їх виділенню з сировини рослинного походження, до прикладу злакових культур, за рахунок можливості цілеспрямованого впливу на необхідний вихід полісахариду, спрощення самої технології його виділення та абстрагування від сезонних змін клімату й пір року. Загалом використання полісахаридів мікробних продуцентів є економічно вигідним завдяки високій продуктивності їх синтезу та застосування достатньо дешевих субстратів для ПС на відміну від хімічно синтезованих ад'ювантів. Окрім того β -глюкани також є стійкими до окисної, температурної та механічної деструкції, що робить їх привабливими з технологічної точки виділення та подальшого зберігання.

Хоча наразі у жодній країні світу поки не налаштовано масштабне отримання β -глюканів у якості вакцинних ад'ювантів, фармацевтичний спектр їх застосування є достатньо широким. Зокрема β -глюкани є основним компонентом біопрепаратів (імуностимуляторів) полісахаридної природи, що мають здатність долати гематоенцефалічний бар'єр та здійснювати активацію імунної системи без її надмірної стимуляції та провокації довготривалих запальних процесів, тим самим попереджуючи небажані наслідки – провокацію розвитку аутоімунних захворювань [177].

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив(ла)	Белемєць Т.О.				РОЗДІЛ 2 ТЕО ВИРОБНИЦТВА ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ (ВАКЦИНИ)	Літ.	Арк.	Акрушів
Консультант								223
Керівник	Красінько В.О.					59		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

Наразі потреба у β -глюканах (на ринку України) задовольняється виключно за рахунок його імпорту, а технологічні лінії з питання виділення та отримання високоочищеної форми – відсутні. Це визначає актуальність розробки економічно вигідних, ресурсоефективних технологій із простою реалізацією та повним циклом виробництва.

Що ж до питання вакцинації ВПГ-2, експерти наразі по-різному оцінюють ринок вакцин. Одна частина «говорить» про цифру – 12...15 млн. доларів США, де 1 % – припадає на частку ринку РФ [178].

За даними спостережень упродовж останніх 24 років (з 1997р.), станом на 2021 рік, в Україні виявлено 92 % дорослих інфікованих ВПГ-1 та 80 % – інфікованих ВПГ-2. Встановлено, що найбільш розповсюдженим в Україні та у світі загалом, є інфікування не ВПГ1/2, а герпесом 4-го типу, тобто вірусом Епштейна-Барра (EBV) – на рівні 98...100 %.

Вірус герпесу щорічно викликає 23 млн. нових випадків інфекційного захворювання. У пацієнтів зі зниженою активністю роботи імунної системи, додаткова наявність у клітинах вірусу генітального герпесу, може спровокувати до важкої, й зачасти, смертельної інфекції ЦНС. При чому попереднє щеплення залишається єдиним доступним та раціональним методом лікування за рахунок специфічної імунізації проти ВПГ-1/2, яке можна вважати найбільш патогенетично виправданим та перспективним. Адже у неактивній формі віруси герпесу взагалі недоступні до лікування – свідомо марна трата часу, фінансів та дискредитація самої ідеї можливості лікування герпесвірусних інфекцій.

У зв'язку з цим в Україні, як і в усьому світі, виникає гостра потреба у розроблені вакцин проти ВПГ-2. Зокрема за рахунок розширення арсеналу імунопотенціюючих агентів полісахаридної природи на території України, що є актуальним питанням сьогодення, без якого отримання вакцин проти ВПГ-2 – у повній мірі неможливо.

2.2. Аналіз фармакологічних властивостей імунобіологічного препарату та β -глюкану, галузей використання та потреби

На сьогоднішній день сімейство герпесвірусів *Herpesviridae* (налічує понад 80 представників, 8 з яких патогенні для людини: герпесвіруси I і II типів – віруси простого герпесу (ВПГ), HSV-1 і HSV-2; герпесвірус III типу – варицелла-зостер вірус (ВЗВ, VZV)) є першопричиною багатьох захворювань людини; поступається лише вірусам грипу та ГРВІ. Інфікування вірусом простого герпесу II-типу, зазвичай, відбувається статевим шляхом, через кров або від матері до дитини під час народження, може проникати через невеликі розриви чи порізи на шкірі разом із генітальними чи оральними виділеннями. Інкубаційний період триває в середньому 1...10 днів, але перші ознаки можуть з'являтися протягом 2...3 тижнів. У групі ризику перебувають люди віком 14..50 років, що пов'язано з активним статевим життям. Тому за висновками експертів ВООЗ, простий герпес є однією з найбільш поширених неконтрольованих інфекцій людини.

Згідно оцінки ВООЗ станом на січень 2022 року, 417 мільйонів людей у віці 15-49 років є інфіковані вірусом ВПГ-2, який викликає захворювання на генітальний герпес. Загалом було виявлено, що більше мільярда людей у віці 15-49 років мали генітальну інфекцію, викликану або ВПГ-1, або ВПГ-2. [179].

Варто також зазначити, що вірусна інфекція ВПГ-2 – значною мірою (у 3...4 рази) збільшує відсоток ризику додаткового зараження на ВІЛ; активна ж форма вірусу у жінок – ускладнює пологи й збільшує вірогідність викидню плоду.

Первинне інфікування ВПГ-1 новонароджених дітей можливе тільки після 6...12 міс. життя, коли починають зникати відповідні захисні антитіла, що могли передаватись з молоком матері до дитини. У подальшому інфікування (проепідемічування) йде досить швидко, зазвичай безсимптомно і серед дітей віком 7 років антитіла IgG до ВПГ-1 виявляють майже у 50 % обстежених.

Нажаль, застосування протівірусної терапії (ВПГ-2), не здатне 100 % запобігти рецидивам захворювання або знищити персистуючий вірус. Саме тому створення ефективних вакцин буде найкращим засобом для зменшення захворюваності, пов'язаної з ВПГ-2. Окрім цього необхідно не лише розширювати асортимент імунобіологічних препаратів, глибше досліджувати

механізм протидії і знищення вірусу, але й підвищувати імунореактивність вакцин за рахунок додавання новітніх ад'ювантів та їх систем [180,181].

Рациональна медикаментозна корекція функціональної активності імунної системи – необхідна міра за великої кількості захворювань та патологічних станів організму людини. За цих умов найбільш доцільним й патогенетично обґрунтованим є використання засобів, які здатні активують саме клітинну ланку імунітету та пов'язані з ним імунокомпетентні клітини мієлопоєзу. Активаторами антигенпрезентуючих клітин можуть виступати речовини з різною хімічною структурою та походженням, до прикладу: віруси, бактерії, ендотоксини. Проте їх використання не завжди є високоефективним та безпечним щодо ускладнень терапії, а з'єднання класу β -1,3/1,6-глюкану і β -1,3(D)-глюкану, навпаки – безпечні та нетоксичні.

Хімічну природу β -глюканів, що необхідно синтезувати, вкрай важливо враховувати при виборі мікробного продуцента та самої технології виділення й очищення полісахариду. Адже β -глюкани у значній мірі різняться між собою своєю тривимірною структурою, молекулярною масою, а відтак, і фізико-хімічними властивостями на кшталт ступеня розчинності у воді. Загалом β -глюкани є полісахаридами мономерів D-глюкози, з'єднаних β -глікозидними зв'язками, якими й обумовлюється їх багатовекторна біологічна активність. Відтак тип, конфігурація та ступінь розгалуженості бічних біополімерів між складовими залишків цукрів, мають вирішальне значення для використання β -глюкану у якості імунопотенціюючого агента при виробництві імунобіологічних препаратів [182,183].

Найбільш активною з біологічної точки зору є (1 $\rightarrow$ 3)/($\rightarrow$ 6) β -D форма (ступінь розгалуження 0,20...0,33). Саме β -1,3/1,6-глюкан характеризується властивостями епігенетичних ад'ювантів полісахаридної природи: індукує «тренований імунітет», а також активує природній й адаптативний імунні захисти (детальний опис ад'ювантної активності наведено у першому розділі кваліфікаційної роботи). Такий тип зв'язку впливає на активацію макрофагів та подальшу продукцію ними цитокінів. При цьому найбільш вираженою

імуностимулюючою дією, як ад'юванта у складі вакцин, характеризується водорозчинна форма β -1,3/1,6-глюкану за молекулярної маси – 130 кДа, що обумовлює підбір технології виділення даного цільового компонента в сторону отримання його водорозчинної формули [83].

Водорозчинна форма β -глюкану має більш упорядковану структуру (індекс кристалічності 4,06) на противагу вихідній нерозчинній формі (індекс кристалічності 2,55). В препаратах водорозчинного β -глюкану, одержаних способом часткової ферментативної деструкції, присутні молекулярні утворення мають вигляд спіралей. Причому у дослідах на тваринах вже встановлена ефективність дії отриманих препаратів β -глюкану як імуностимуляторів. Така сукупність результатів досліджень структури препаратів та їх медико-біологічної оцінки, може бути розцінена як аргумент, який підтверджує взаємозв'язок біологічної дії β -1,3/1,6-глюканів з наявною потрібною спіраллю у їх структурі [184].

Описані вище характеристики отримують своє підтвердження в роботі McCann, F. з командою науковців [185] де в повній мірі аргументовано кореляцію біологічної активності β -глюкану з 1,3/1,6 глікозидними зв'язками (молекула глюкози прив'язана до позицій 1 та 3, а молекула відгалуження, при цьому, зосереджена в позиціях 1 і 6). Тобто, β -1,3-глюкан є зв'язаною гілкою, а β -1,6-глюкан – розгалуженою гілкою, що є надзвичайно значущим фактором первинної структурної варіації полісахариду для проявлення ним епігенетичних та імунопотенціюючих властивостей, а отже і подальшого використання у якості вакцинного ад'юванта. З імунологічної точки зору це пояснюється можливістю специфічних рецепторів на поверхні макрофагів зв'язуватись лише з нерозгалуженою ділянкою молекули (β -1,3-глюканом) для їх активації та можливості подальшої реалізації тригерних механізмів для цілого ряду процесів, котрі є спрямованими на імунний захист організму.

Варто також зауважити, що з'єднання класу β -1,3/1,6-глюкану та β -1,3(D)-глюкану, – безпечні у токсикологічному відношенні (GRAS з класу *generally recognized as safe*, згідно з класифікацією FDA, США, 2001); можуть бути

використані: ентерально, парентерально, а також інтерназально й ректально. Така фармакокінетична особливість β -глюканів обумовлює їх широке застосування у медичній практиці та імунобіотехнологіях, зокрема [186].

На сьогоднішній день до сфер застосування β -глюканів можна віднести: фармацевтичну, імунобіотехнологічну, косметичну, та навіть харчову промисловості (харчова добавка до високожирових, молочних й м'ясних продуктів у якості емульгатору, гелеутворювача, текстуроутворювача, замітника жиру, тощо).

Імуностимулятори на основі β -глюканів мають дріжджове походження (дріжджові полісахариди) з переважним впливом на активацію Т-лімфоцитів і макрофагів; до можливих побічних дій можна віднести суб'єктивні алергічні реакції, артеріальну гіпотензію, подекуди лихоманку. До прикладу на ринку України представленими є біопрепарати вітчизняного та закордонного зразків, отримані із застосуванням продуцентів мікробної природи (*C. albicans*, *A. niger*, *S. cerevisiae*, *S. lucensis*, *S. violaceus*, *B. thuringiensis*), а саме: « β -глюкан», «ОРВІ Актив», «Летинан» та ін. [187,188].

Як результат застосування β -глюканів, з точки зору реакції імунної системи, спостерігається нейтралізація запальних процесів та, за рахунок імуностимулюючої дії, загальна стійкість організму до інфекційних захворювань. Саме завдяки цим характеристикам, даний полісахарид набув широкого розповсюдження у якості складового компоненту/самостійно в імуностимуляторах. Відтак добре відомими є: «Бета-імуно» (для дорослих) – застосовується при хронічних та ГРВІ (цистит, пієлонефрит, рецидивуючий вірус герпесу, бронхіт та ін.), «Вітаглюкан» (сироп для дітей від 3-х років; БАД) – застосовується у складі комплексної терапії у період загострення ГРВІ, незбалансованому харчуванні та зниженому апетиті, надмірних фізичних та психоемоційних навантаженнях, що здійснюють негативний вплив на роботу імунної системи загалом [189].

У харчовій промисловості використання β -глюкану аргументоване його властивостями, як згущувача, жируотримувача, а також вологозв'язувальними

характеристиками (як результат може подовжувати термін придатності продуктів). Застосовується для надання харчовим продуктам приємних органолептичних характеристик: утворення гелів, створення гладкої структуризації, стабілізації жирових емульсій, тощо.

Наразі β -глюкан набув широкого вжитку у якості харчової добавки у м'ясо-молочній та жировій промисловостях. Прикладом є добре відома харчова добавка «Oatrim» – використовується у якості низькокалорійного жирозаміннику здатного імітувати органолептичні характеристики більшості високожирних продуктів [190].

Не виключенням для застосування полісахаридів (β -глюкану) стала й косметична промисловість. Нині β -глюкановий комплекс входить до складу косметичних препаратів для зовнішнього застосування. Це, головним чином, обумовлене його здатністю активізувати захисні імунологічні властивості шкірних покривів за рахунок активації внутрішньоепідермальних макрофагів за імітаційним принципом (більш відомі як клітини Лангерганса). Як результат впливу даних полісахаридів, клітини Лангерганса виділяють фактор ангіогенезу (стимулює формування й зміцнення капілярів) та фактор росту епідермальних клітин (стимулює продукцію колагену та еластину). Варто також згадати про потужні захисні, антиоксидантні, а також зволожуючі (за рахунок активації синтезу гіалуронової кислоти) косметичні властивості β -глюканів [191].

Отже, біологічна активність β -глюканів залежить від ряду факторів (типу та конфігурації глікозидних зв'язків між залишками моносахаридів, розчинності, розгалуженості й конформації молекул, молекулярній масі) та завдяки своїй різноманітності набула широкого використання. Має абсолютно різнопланові сфери застосування завдяки широкому спектру позитивної дії на організм, зокрема імунну систему, що котрий раз доводить значущість β -глюканів вже на фармацевтичному ринку у якості імуностимуляторів та ад'ювантів мікробного походження.

Що ж до питання потреби новітніх вакцин проти ВПГ-2 на ринку України, воно у повній мірі визначається рівнем попиту населення, відсутністю аналогів та

доступного імпортозаміщення. Ці фактори обумовлюють необхідність розроблення високоефективної й водночас не складної у реалізації технології отримання вакцини ін'єкційної форми, до складу якої буде входити β -глюкан, у якості багатовекторного ад'юванта для підвищення її імуногенності.

2.3. Обсяг ринку вакцин та очікувані темпи його розвитку

Першочергово слід згадати компанії-гіганти, що займають провідні позиції на ринку вакцин та імунобіологічних засобів, а саме: Pfizer, Sanofi, Merck, Baxter International, GlaxoSmithKline та ін., при чому половину (50%) цього ринку займає США. Однак наразі виготовлення основної частини вакцин з «Календаря профілактичних щеплень» – проводяться на фармацевтичних підприємствах РФ (ФГУП «НВО «Мікроген»); сюди також відносять: «С.-Петербурзький науково-дослідний інститут вакцин і сироваток та підприємство по виробництву бактерійних препаратів» ФМБА (вакцини проти вірусів герпесу та грипу) [192].

Загально прийнято вважати, що вакцинація – цінна інвестиція у здоров'я громадян країни із позитивною економічною віддачею. При чому вакцинацію рахують важливою для Системи охорони здоров'я, незалежно від виду її переваг (запобігання смерті, збереження років життя, DALY – років життя з поправкою на інвалідність, QALY – набутих років життя із поправкою на якість) про які повідомляється. Наслідки для здоров'я від вакцинації – перетворюються на позитивні економічні результати; своєчасне щеплення у значній мірі може забезпечити економію завдяки запобіганню видаткам на охорону здоров'я, котрі пов'язані із лікуванням захворювань [193].

Наразі є декілька розроблених вакцин проти герпесу (котрі сприяють розвитку клітинної імунної відповіді) на світовому ринку, однак жодна з них не дає гарантій та повного позитивного результату (лише на 80...90%):

➤ **«Сімплірікс»** – застосовується проти генітального герпесу (США); має позитивний вплив тільки на дівчат 10...13 років, але має суттєвий недолік – відсутність ефективності у дорослих людей.

➤ **«Герпевак»** – застосовується проти генітального герпесу (Бельгія), не поставляється в аптеки для продажу; суттєвий недолік – проявлення ефективності тільки для жінок.

➤ **«GEN-003»** – застосовується проти ВПГ-2-типу; дія спрямована на стимуляцію імуноглобулінів сироватки крові для інактивації вірусу; суттєвий недолік – знаходиться на стадії доопрацювання.

➤ **«Chiron»** – застосовується проти ВПГ-2-типу (Британія); препарат на основі двокомпонентних білків та ад'юванта MF-59; відмінна властивість – різний вплив на людину незалежно від статі.

➤ **«BNT163»** – це вакцина-кандидат, розроблена компанією «BioNTech» проти вірусу простого герпесу 2-го типу (генітальний герпес) та потенційно 1-го типу. Препарат створений на основі мРНК, він кодує три глікопротеїни ВПГ-2, які допомагають запобігти проникненню вірусу в клітини та подальшому його поширенню. В даний час BNT163 знаходиться на I етапі клінічної розробки, при цьому перший пацієнт уже отримав дозу у грудні 2022 року.

➤ Також існує 2-ві форми вакцини проти герпесу **«Zoster»**: рекомбінантна вакцина (вона забезпечує кращий і триваліший захист, ніж жива ослаблена вакцина) та жива ослаблена вакцина (більше не доступна для застосування в США).

➤ На ринку присутня **ветеринарна вакцина проти герпесу**, виготовлена з культуральної суспензії лінії клітин нирок собаки, інфікованих вірусом герпесу (штам «F205») [194-196].

До моменту повномасштабної війни на ринку України були представлені ще 2 протигерпетичні вакцини – **«Герповакс»** та **«Вітагерпевак»** (РФ) на основі ліофілізованого інактивованого антигену вірусу I та II (антиген вирощували на лінії ниркових клітин мавпи, котрі у подальшому перещеплювали – «Vero B», дозволені ВООЗ у якості субстрату для виробництва вірусних вакцин), котрі були офіційно зареєстровані у державному реєстрі лікарських засобів.

Новітні доступні вакцини можуть бути вирішенням великої кількості проблем (пов'язаних зі здоров'ям нації) сьогодення. Такі вакцини, в

обов'язковому порядку матимуть вищу вартість (здебільшого через нові та захищені патентами технології та регулюючий нагляд). Однак незважаючи на це, у відповідності до економічного аналізу, вже 37-м нових вакцин у світі визнано економічно вигідними (у Європі використовують граничні значення 20...50 тис. євро за QALY). Тобто такі вакцини забезпечують цінність для здоров'я людей за розумну вартість для платоспроможної частки населення.

Даному стану речей, безперечно, сприяють великі капіталовкладення для здійснення науково-дослідних та дослідно-конструкторських робіт, на що також вплинула світова пандемія COVID-19 спричинена вірусом підроду *Sarbecovirus*, роду *Betacoronavirus* – SARS-CoV-2. Загалом середні капіталовкладення складають – 12,619,2 % від вартості продукції, яка випускається. При цьому ринок полісахаридів, котрі використовуються у медичних цілях складає 11 млн. доларів США (станом на 2019 рік); відповідно до прогнозів, найближчим часом він досягне збільшення прибутку до 2027 року за середнього темпу зростання – 70 % (упродовж зазначеного прогнозованого періоду) [197,198].

Загалом вакцинація на сьогоднішній день розглядається у якості одного із найефективніших профілактичних методів протидії інфекційним захворюванням та входить до гарантованих державних послуг України. Профілактичний перелік щеплень, що є обов'язковими для включення до «Календаря профілактичних щеплень» – приведено у ст. 12 Закону України «Про захист населення від інфекційних хвороб» від 06.04.2000 р. № 1645-III. Згідно прийнятому на загальнодержавному рівні «Календаря профілактичних щеплень», до 44 обов'язкових вакцинацій відносять профілактичні щеплення проти: кашлюку, дифтерії, правця (*Бустрикс™ комб. вакц. д/проф. дифтерії, правця, кашлюку сусп. д/ін. GlaxoSmithKline Biologicals S.A.*), кору, поліомієліту (*J07B F03 Тривалентна інактивована вірусна вакцина проти поліомієліту*), туберкульозу (*BCG VACCINE FREEZE-DRIED, Ліофілізована атенуйована вакцина, ББ-НЦПХ Лтд. Болгарія*) та ін. [199].

Станом на 2020 рік, даний календар у відповідності до затвердженого наказу МОЗ України, був розширений обов'язковою вакцинацією ще від 10 хвороб до

перерахованих раніше (додали гемофільну інфекцію, паротит, гепатит В, краснуху). При чому у 2022 році було заплановане додаткове впровадження вакцинації проти пневмококової інфекції. Варто зазначити, що у жодному із вже прийнятих та підданих на розгляд законопроектів України, не йшло мови про впровадження до «Календаря профілактичних щеплень» обов'язкової вакцинації проти ВПГ-1 або ВПГ-2 [200].

Наразі, згідно АТХ – анатомо-терапевтично-хімічної класифікації, виділяють: вірусні і бактеріальні вакцини, а також вакцини комбінованого патогенного складу. Вірусні вакцини (*група J07B*) поділено на 11 підгруп: антирабічні, протиенцефалітні, проти вірусних гепатитів А і В, проти грипу, ротавірусних інфекцій, проти поліомієліту, папіломавірусів, вітряної віспи та ін. Загалом у державному реєстрі України нараховується 40 найменувань доступних вакцин, але 5 з них використовуються виключно для екстреного застосування (тобто обмежено для профілактики SARS-CoV-2) [201,202].

В Україні порядок відпуску громадянам вакцин та анатоксинів через аптечну мережу визначено *Наказом МОЗ України № 595 (із змінами, внесеними згідно з Наказом МОЗ № 1602 від 06.09.2022 р.)*.

Нині в регіонах нашої країни наявні вакцини для імунопрофілактики населення, у відповідності до чинного «Календаря профілактичних щеплень». При чому поставки вакцин у значній мірі активізувалися упродовж липня-серпня 2022 р., завдяки чому регіони наразі достатньо забезпечені необхідними імунобіологічними препаратами, зокрема вакцинами (в імпорті відсутні вакцини проти ВПГ-1 та ВПГ-2) [203, 204].

Отже, існуюче наразі недостатнє використання імунобіологічних препаратів у розвинених країнах світу, можна розглядати (з соціальної точки зору) як жертву власного успіху самої вакцинації, що призводить до відсутності здорової оцінки людей серйозності хвороб, тяжкості яких можна запобігти методом своєчасної вакцинації та завальної переваги щеплення на противагу масової дезінформації і неосвіченості, котрі несуть за собою страх вакцинації й можливих побічних наслідків. Зрештою, загальна світова спільнота та майбутнє покоління – лише

виграють від докладання зусиль для захисту населення та створення «колективного імунітету». Саме тому абсолютно усі наявні програми вакцинації у світі потребують адекватної підтримки, визнання цінності, економічних вкладень, розширення «Календаря обов'язкових щеплень», розробки новітніх вакцин з можливим перехресним захистом для реалізації повною мірою свого потенціалу.

2.4. Обґрунтування форми випуску імунобіологічного препарату, його первинної та вторинної упаковок

Вакцини – імунобіологічні препарати з бактерій, вірусів або продуктів їх життєдіяльності, які застосовуються для активної імунізації людей і тварин з метою специфічної профілактики та лікування захворювань інфекційної етіології. Термін «вакцина» поєднує різні препарати (живі, інактивовані, субодиничні, рекомбінантні, синтетичні В.) та анатоксини (див. Анатоксин).

Усі існуючі вакцини, за характеристикою діючої речовини, можна поділити на:

- живі атенуйовані вакцини;
- інактивовані (вбиті) вакцини;
- анатоксини;
- білкові вакцини;
- полісахаридні вакцини;
- кон'юговані вакцини.

Однак абсолютно усі перераховані вище види вакцин – відносяться до стерильних парентеральних засобів. Для запропонованої інактивованої вакцини проти ВПГ-2 з β -глюканом у якості ад'юванта (не містить консервантів), запланована форма випуску у вигляді ліофілізованого висушеного порошку для приготування ін'єкційного розчину. Ін'єкція (у вигляді пористої маси білого кольору) – повільна, внутрішньом'язова (у дельтоподібний м'яз); для дітей віком до 5 років – у верхню частину передньобоквої поверхні стегна; введення вакцини у сідничну ділянку є неприпустимим. Варто також зауважити, що зберігання отриманого ін'єкційного розчину (розчиненої вакцини) більше 5 хвилин – суворо заборонено.

Проведення щеплення за використання ін'єкційних розчинів має свої недоліки (здійснення маніпуляцій кваліфікованим фахівцем, психологічний фактор, порушення цілісності шкірних покривів у місці ін'єкції) та переваги (зручність та точність дозування, повна біологічна доступність, повна відсутність негативного впливу секретів та ферментів з боку шлунково-кишкового тракту й печінки, щеплення людей в ослабленому стані й без свідомості) [205].

При виготовлення імунобіологічних препаратів особлива увага приділяється первинній упаковці для розфасовки готової ліофілізованої вакцини, адже вона знаходиться у безпосередньому фізичному контакті з ним. При чому первинне пакування також виконує важливу функцію збереження: якості та властивостей імунобіологічного препарату упродовж обумовленого терміну зберігання, герметичності і стабільності, а також забезпечує зручність у дозуванні й використанні.

Ін'єкційні форми вакцин, зазвичай, пакують або у флакони, або в ампули. І, хоча ампули можуть забезпечувати повну стерильність аж до самого моменту її розкриття (у додаток до можливості зберігання летких та нестабільних сполук), характеризуються суттєвими недоліками у порівнянні із флаконами:

- складність розкриття (передбачає застосування ампульного скарифікатора);
- мають більшу хрупкість;
- можуть бути забрудненні під час відкриття скляним пилом;
- небезпечні для ураження медперсоналу.

Флакон – це споживча тара з плоским або увігнутим дном, корпусом різноманітної форми що різко переходить до горловини, діаметр вінця якої значно менший за діаметр описаного кола корпуса та передбачає закупорювання кришкою, корком. Даний тип первинного пакування застосовується для виробництва стерильних лікарських ін'єкційних засобів (внутрішньом'язево, внутрішньовенно). До недоліків пакування у флакони можна віднести можливість зберігання лише стійких елементів, але на відміну від ампульного пакування, має ряд своїх переваг:

- легкість при відкритті; мінімізація руйнування скла при відкритті;

- відсутність порушення герметичності та стерильності після відбору імунобіологічного засобу з флакону через пробку;
- простота технологічного процесу при закупорці тари з ЛЗ;
- зручність у транспортуванні [206,207].

Важливість раціонального вибору первинного пакування також пов'язана з суворими мікробіологічними нормами та незначною дозою введення; зазвичай доза складає 0,5 мл. Тому існує необхідність чіткого дозування препарату, котра зумовлює внесення кількох доз в одне пакування (флакон). Отже ми можемо побачити, що ампула в даному випадку додатково є непридатною за рахунок неможливості повторної герметизації.

Вторинне пакування для вакцини проти ВПГ-2 у флаконах, доцільно здійснювати у шоу-бокси з подальшим етикетуванням. Пакування пачок із флаконами надалі реалізують у гофровані ящики (групова тара).

Вимоги до фармацевтичного пакування:

- ✓ повинно забезпечити неушкодженість фарм. продукції;
- ✓ має бути зручним при використанні;
- ✓ повинно містити відповідну інформацію в достатній кількості про ЛП (назву, тип ліків, склад, дозування і т. д.);
- ✓ не пропускати променів світла та мати стійкість до мікроорганізмів (бар'єрну);
- ✓ унеможлиблювати непомітне розкриття до його використання споживачем;
- ✓ повинно забезпечувати максимальний час зберігання ЛП.

Варто зазначити, що вакцини як імунобіологічні препарати, відносяться до потенційно небезпечних речовин/об'єктів, утилізація яких регламентується на законодавчому рівні (Закон, що регулює діяльність із знищення (утилізації) лікарських засобів [208]).

Імунобіологічні лікарські засоби, з первинною упаковкою лікарського засобу, яка не втратило цілісність підлягають утилізації:

- ✓ із закінченим терміном придатності;
- ✓ які зберігалися із порушенням холодового ланцюга;

✓ із візуальними характеристиками, що змінилися та не визначені в інструкції виробника (наявність осаду та/або сторонніх домішок, зміна кольору і прозорості), віднесені до медичних відходів категорії В (епідемічно (інфекційно) небезпечні відходи) [209-211].

Виходячи із усього вище сказаного, для випуску вакцини проти ВПГ-2-типу, пропонується обрати саме флакон з медично нейтрального скла призначеного для ін'єкційних розчинів. Адже саме скло є одним із найбільш екологічно чистих матеріалів, яке не взаємодіє із навколишнім середовищем та подрібнюється до кварцового піску у процесі свого руйнування. Вторинна тара для вакцини проти ВПГ-2 – чарункові коробки (шоу-бокси), надалі гофровані ящики.

2.5. Обґрунтування вибору БА та середовища для його культивування

За результатами здійсненого літературного огляду кваліфікаційної роботи, можна дійти до беззаперечного висновку – впровадження біотехнології одержання полісахариду β -глюкану в Україні для подальшого використання у якості імунопотенціюючого агента у складі імунобіологічних препаратів, є актуальною задачею сьогодення.

З біотехнологічної точки зору, даний полісахарид у достатній кількості та необхідному вигляді – β -1,3/1,6 зв'язках, акумулюється в клітинних стінках аскоміцетів, дріжджів та грибів.

В інших джерелах, по типу злакових культур, β -глюкани накопичуються у вигляді β -1,3 (без бічних ланцюгів) або β -1,4 зв'язків. Однак виходячи з кінцевої мети подальшого застосування β -глюкану (ад'юванта для інактивованих вакцин), виділення зі злакових є недоречним, адже виключно тільки β -1,3/1,6 глюкан має науково-доказову базу епігенетичних властивостей (здатний зв'язуватися з рецепторами макрофагів).

Саме тому увага світових вчених прикована до таких мікробіологічних продуцентів β -1,3/1,6 глюканів: актиноміцетів *Streptomyces lucensis* та *Streptomyces violaceus* [212], мікроводоростей *Euglena gracilis* [213], грибів [214], а також дріжджів різних штамів, зокрема дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [215] й так званих «чорних дріжджів» – *Aureobasidium pullulans*. Наразі для задоволення

світового комерційного попиту у β -глюкані, його широко виробляють (для БАДів) шляхом мікробної ферментації мікроорганізмами: *Lasioidiplodia theobromae*, *Botryosphaeria rhodina*, *Ganoderma lucidum*, тощо [216]. Узагальнені дані щодо можливих природніх джерел β -глюканів з різними типами зв'язку, наведені у табл. № 4.

Таблиця № 4 – Узагальнені дані типів β -глюканів з різних природніх джерел [212, 214, 217-220].

Тип будови β -глюкану	Природне джерело
β -1,3-глюкан (лінійний, нерозгалужений, однорідний)	– <i>Alcaligenes faecalis</i> (грамнегативні паличковидні бактерії); – <i>Euglena gracilis</i> (мікро водорості); – <i>Poria cocos</i> (гриби); – <i>Vitis vinifera</i> (виноградна культура).
β -1,3/1,6-глюкан (лінійний з 1,6-зв'язаними β - глікозидними бічними гілками)	– <i>Ganoderma sinense</i> (гриб); – <i>Trametes pubescens</i> (гриб); – <i>Laminaria</i> sp. (водорості; нерозгалужені); – <i>Eisenia bicyclis</i> (водорості; деякі розгалужені) – <i>Claviceps purpuria</i> (паразитичний гриб; глюкан клітинної стінки); – <i>Aureobasidium pullulas</i> (позаклітинний); – <i>Schizophyllum commune</i> (гриб); – <i>Grifola frondosa</i> (глюкан клітинної стінки); – <i>Lentinula edodes</i> (глюкан клітинної стінки);
β -1,3/1,6-глюкан (гілка на гілці)	– <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (глюкан клітинної стінки); – <i>Candida albican</i> (глюкан клітинної стінки); – <i>Candia utilis</i> (глюкан клітинної стінки)
β -1,3/1,4-глюкан (лінійний)	– <i>Qingke</i> (тібетський ячмінь) – β-глюкан злаків: ячмінь, овес, пшениця та жито, ісландський мох, цетрарія острівська, ліхенін.
β -1,3/1,4-глюкан (лінійний з 1,4-зв'язаними бічними гілками)	– <i>Pleurotus ostreatus</i> (глюкан клітинної стінки).

До важливих вимог, котрі висуваються для вибору найбільш національного біологічного агента (БА), можна віднести: висока швидкість росту на ПС, стійкість до несприятливих факторів хімічної й біологічної природи, стабільність фізіолого-біохімічних ознак при культивування, а також стійкість БА при зберіганні.

З-поміж усіх можливих мікробних продуцентів β -глюкану (у вигляді β -1,3/1,6 зв'язків), найбільш раціональними з точки зору кінцевої мети кваліфікаційної

роботи – розроблення технології отримання вакцини проти ВПГ-2 з підбором ад'юванта для підвищення її імуногенності, – це віддача прерогативи саме дріжджам або міцеліальним грибам за рахунок порівняно високого вмісту β -глюкану потрібної будови та простоти складу поживного середовища й технології його виділення. Важливим фактором при виборі продуцента є здатності до накопичення достатньої кількості біомаси на середовищі визначеного складу, адже характер синтезу накопичення внутрішньоклітинних полісахаридів відповідає характеру накопичення біомаси.

Одним із можливих продуцентів β -глюкану у розчиненій формі є гриб *Trametes pubescens* за рахунок вмісту імуномодуючих полісахаридів; поширений на територіях: Європи, Азії, Далекого сходу та Північної Америки. Згідно своєї морфології, даний гриб у плодовому тілі та міцелії вміщує відносно малу кількість жирів за значної кількості вуглеводів, а саме розчинних цукрів – 10...15 %. Моносахаридний склад *T. Pubescens* – представлений глюкозою із 35 % вмістом 1,3-глікозидних зв'язків, що дозволяє характеризувати полісахариди клітинної стінки, як β -1,3-глюкани – група імуномодуючих полісахаридів.

За своїм полісахаридним складом *Trametes pubescens* у клітинній стінці вміщує 2...2,5 % β -1,3-глюканів від ваги сухої біомаси, при чому характер синтезу внутрішньоклітинних полісахаридів відповідає характеру накопичення біомаси штамом-продуцентом. Субстанція сухої біомаси *T. Pubescens* характеризується 40...50 % загального білка, 25...30 % вуглеводів серед яких 1...4 % β -глюкани. Загалом саме β -глюкан є основним діючим компонентом хімічного складу міцеліальної біомаси, котрий обумовлює біологічну активність *T. Pubescens*. [221, 222].

Зокрема імуномодуюча дія полісахаридів виділених з грибів *Trametes pubescens*, була досліджена в роботі [223]. Біоактивний полісахарид із основою 1,3- α -d-глюкопіранози та 1,4- β -d-глюкопіранози (при молярному співвідношенні 1:4), був отриманий методом спиртового осадження та хроматографічного розділення. Подальші результати здійснених наукових досліджень підтверджують сприятливу імунну активність за рахунок стимуляції макрофагів до виділення NO

та відповідних цитокінів, які були тісно пов'язані з активацією TLR4 виділеним полісахаридом.

На сьогоднішній день вітчизняними вченими [224] здійснено апробацію схеми виділення полісахариду із використанням макроскопічних грибів на основі послідовного екстрагування сировини різними хімічними реагентами (з підвищеною температурою) задля розщеплення термолабільних зв'язків (між біополімерами). Надалі висушену масу грибів *P. Ostreatus* знежирювали хлороформом й отриманий залишок висушували в апараті Сокслета. Після усі спирторозчинні сполуки видаляли екстрагуванням із застосуванням 70 % розчину C_2H_5OH та подальшою додатковою екстракцією водою до отримання виходу масової частки (м.ч.) вуглеводної складової від вмісту сухих речовин (в об'єднаній водорозчинній фракції) у кількості 52,7 %. Наявні домішки у складі прибирали завдяки підкисленню водного екстракту $CH_3 COOH$ до pH 5,0. Такий прийом дозволить збільшити м.ч. вуглеводів у супернатанті у 1,3 рази.

Цікавими працями є роботи: Yadav, D., зі співавторами [225], де описано процес виділення біоактивних компонентів із плодового тіла *T. Pubescens* із зазначенням користі для здоров'я отриманих полісахаридів; робота [226], в якій описано біологічний та оздоровчий потенціали β -глюканів виділених саме з грибів для лікування цивілізаційних та вірусних захворювань, з особливим акцентом на COVID-19 для належної підтримки імунної системи та протидії можливим ускладненням.

Різнноманітні дослідження показали, що *Saccharomyces cerevisiae* є одними із багатьох видів дріжджів, що здатні продукувати 30...85 % β -глюкану, котрий у подальшому придатний до використання навіть для лікування гіперхолестеринемії, оскільки не має доказових побічних ефектів. Даний полісахарид є ендометаболітом, що накопичується у клітинній стінці дріжджів (служать для зміцнення клітинної структури та діють як харчовий резерв) у вигляді β -1,3/1,6 зв'язків; ступінь розгалуження варіюється у діапазоні 0,03...0,25, що додатково є фактом належного застосування даного продуцента в медичних цілях [227].

Варта зауважити, що β -глюкан синтезується β -глюкансинтетазою. Даний фермент каталізує полімеризацію β -глюкану із використанням уридиндифосфату (UDP)-глюкози, як субстрату. β -глюканаза розщеплює β -глюкан, у результаті чого рівень β -глюканази зростає, коли середовище виснажується глюкозою або коли швидкість росту клітин знижується через обмежену концентрацію глюкози. Зокрема, активність β -глюканази тісно пов'язана з клітинним морфогенезом: розширенням клітинної стінки під час росту та брунькування, поділом клітини, утворенням кон'югаційних трубок й злиттям стінок під час спарювання клітин, вивільненням аскоспор із асків, а також автолізом клітини [228].

Зокрема науковцями на чолі з Pengkumsri N., [229] було досліджено 10 перспективних штамів дріжджів *S. Cerevisiae* з метою скринінгу штаму з найбільшим вмістом β -глюкану в клітинній стінці за умови культивування на поживному середовищі з ідентичним складом компонентів. У подальшому також були проведені дослідження з питання їх імуномодельючої дії на лабораторних мишах. Згідно отриманих результатів, полісахарид β -глюкан виділений з клітинної стінки штаму *S. cerevisiae* НІІ31 – провокує зміну експресії пептидів та білків (цитокінів). При чому вихід β -глюкану за умови культивування десяти штамів на ідентичному ПС зі споживанням глюкози у якості джерела вуглецю, складав: *S. Cerevisiae* TISTR5278 – $40,07 \pm 3,94$ %, *S. Cerevisiae* TISTR5059 – $41,24 \pm 0,31$ %, *S. Cerevisiae* НІІ31 – $41,69 \pm 3,96$ %.

У літературі закордонних та вітчизняних вчених у відкритому доступі вказані раціональні умови культивування дріжджів, де у повному обсязі вказано склад вісімнадцяти ПС (з варіативним джерелом вуглецю) для накопичення максимального вмісту полісахариду. У патентах й наукових статтях – приведено велика кількість поетапної інформації щодо виділення полісахаридів з дріжджової клітини із застосуванням різноманітних методів, котрі дозволяють отримати на порядок збільшену концентрацію β -глюкану [230].

Зокрема шляхи підвищення синтезу полісахариду з клітин різноманітних мікроорганізмів-продуцентів (*S. violaceus*, *S. lucensis*, *A. niger*) приведені у

науковій статті [231], де підвищення синтезу β -глюкану досягалось шляхом варіювання складу та кількості компонентів поживного середовища.

Схожою є робота [232] де порівнювали потенціал до виробництва β -глюкану мікроорганізмами: *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Xanthomonas campestris* та *Bacillus natto*. Зазначені мікроорганізми культивували у зануреному стані в дріжджовому глюкозному бульйоні (YG) упродовж 120 год., за температури 30 °C та швидкістю обертів мішалки 200 об/хв. Під час росту культури досліджували: загальну популяцію (методом оптичної щільності), pH та вміст глюкози у ростовому середовищі. Екстрагування β -глюкану здійснювали за рахунок кислотно-лужних методів з подальшим вимірюванням ваги. Отримані результати засвідчують, що усі обрані для дослідження мікроорганізми є перспективними для виробництва β -глюканів за зазначених вище умов культивування, при чому найбільший вихід β -глюкану продемонстрував *B. natto* (20,38%) з кількістю β -глюканів $1,345 \pm 0,08$ мг і діаметром глобули 600 мкм. На другому місці з кількістю β -глюканів $3,945 \pm 0,05$ мг зазначають *S. cerevisiae* та вагою клітини – $29,445 \pm 0,02$ мг.

Варто зауважити, що біологічна активність β -глюкану (імуностимулююча, протипухлинна, антибактеріальна), як каркасного полісахариду (не розчинного у воді), є можливою лише за умови підвищення ступеня його розчинності. При цьому під «розчинним β -глюканом» (молекулярна маса 130 кДа) розуміють його водорозчинні фрагменти (одержують частковою фрагментацією молекул) й різні похідні складу. У зв'язку з цим, актуальними є методи одержання полісахаридів саме із підвищеним ступенем їх розчинності за використання біотехнологічної модифікації [233].

Іншими науковцями [234] досліджено варіацію кількості отриманого розчиненого β -глюкану та стійкість до Glucanex ® 200G під час безперервного та періодичного культивування *S. cerevisiae*. Під час серійного культивування дріжджів *S. cerevisiae* було виявлено, що вміст розчинного β -глюкану та стійкість до β -глюканази були вищими на ранній стаціонарній фазі росту. При

безперервному культивуванні, вміст розчинного β -глюкану та стійкість до β -глюканази – вищі при найменшій швидкості розведення.

Відомою також є робота з описом технологічної схеми виробництва препаратів β -глюкану (водорозчинного, структурного та біомодифікованого) з дріжджів *S. cerevisiae*. Відтак авторами статі описано метод отримання β -глюкану з використанням чисельного ряду постадійних операцій. Дріжджові клітини обробляли розчинами кислот і лугів з метою деструкції їх клітинних стінок та надалі автоклаували. β -глюкан, що при цьому отримували (містив 90,3 % полісахаридної складової), переводили у розчинну форму за рахунок використання ферментного препарату з ендо1,3- β -глюконазною активністю при встановлених параметрах. Надалі вміст вуглеводів визначали антроновим методом, а способом гель-хроматографії (колонка з сефадексом G50) – розподіл продуктів гідролізу. Згідно отриманих результатів, найвищий вихід розчиненої форми β -глюкану – 50 %, спостерігається за 24-годинної обробки та параметрах ферментолізу 0,25 мг/см³ (конц. ферменту) відношенні E : S = 1 : 15, час процесу 72 год [235].

Цікавими з біотехнологічної точки зору є також дослідження [236], в яких здійснювали порівняльний аналіз різних методів екстракції β -глюкану з 10 штамів дріжджів *S. cerevisiae* з їх високим вмістом та подальшим ІЧ-Фур'є аналізом. Клітини дріжджів були піддані чотирьом різним кислотно-лужним екстракціям, які показали що комбінація екстракції сильною основою (NaOH) і слабкою кислотою (CH₃COOH) – відновили високий вміст глюканів та високе співвідношення полісахаридів, білків, ліпідів. Екстракція на основі набору виявила, що штам *S. cerevisiae* НІІ31 – демонструє високий вміст як загального глюкану, так і β -глюкану.

Надалі імуномодельюючий ефект отриманого β -глюкану був оцінений з використанням лабораторних мишей. Як результат можна припустити, що низька доза β -глюкану – індукує експресію вибраного прозапального (IL-17, IFN- γ) та істотно протизапального цитокінів (IL-10); відносно висока доза була потрібна для зміни експресії IL-6 і TGF- β . Загалом, це дослідження демонструють що β -

глюкан, екстрагований з клітин *S. cerevisiae* НІЗ1, – змінює експресію досліджуваних цитокінів, які надалі можна використовувати у якості потужного імуномодулятора у фармацевтичних продуктах.

Авторами статті [237], було детально описано один із методів екстракції β -глюкану. А саме: інкубовану клітинну біомасу збирали центрифугуванням зі швидкістю 7500 об/хв упродовж 10 хв при 4 °С. Потім клітини автолізували шляхом додавання 15 % клітинної біомаси в дистильовану воду при рН 5,0 (відрегульований за допомогою 1,0 М НСІ), надалі інкубували при температурі 50 °С упродовж 48 год., при швидкості перемішування 120 об/хв. Після цього була додаткова стадія інкубації за температури у 80 °С упродовж 15 хв. на водяній бані. Після чого зразки центрифугували зі швидкістю 7500 об/хв при 4 °С упродовж 10 хв.

Нарешті, отримані гранули сушили в печі за температури 60 °С. Автолізовані клітини змішували з 5 мл 1,0 М NaOH і потім інкубували 2 год. при 80 °С з перемішуванням. Згодом клітини центрифугували 25 хв. зі швидкістю 6000 g при 4 °С. Отриманий осад розчиняли в 5 мл 1,0 М CH₃COOH і повторно інкубували 2 год. при 80 °С з мішалкою. Потім осад знову центрифугували 25 хв. зі швидкістю 6000 g при температурі 4 °С. Його тричі промивали стерильною водою та ліофілізували. Отримані зразки розтирали за допомогою ступки до отримання дрібного порошку та зберігали при температурі 20 °С.

Інший метод ізоляції β -глюкану з дріжджів *S. cerevisiae* приведений у роботі [238]. Науковцями пропонується використовувати новий недеградуєчий процес виділення, що включає етапи м'якої екстракції та ферментативну обробку без екстремальних значень рН. Етапи процесу включають: нешкідливу обробку водою, ферментами та органічними розчинниками, що дозволяє уникнути деградації ланцюга та призвести до збереження нативної структури глюкану. Як результат, залежно від якості використовуваних дріжджових клітинних стінок, отримують 1,3- β -d-глюкан з чистотою до 92 %, виходом 87 % й цінним побічним продуктом – маннопротеїном, котрий також відзначається корисними властивостями.

Отже, виходячи з усіх вищенаведених аргументів, зокрема з урахуванням найбільш раціональної технології виділення, обираємо до більш детального розгляду трьох доцільних продуцентів (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR5059, *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1, *Trametes pubescens* 923-2), а узагальнені дані щодо особливостей отримання ад'юванта приводимо у табл. № 5.

Таблиця № 5 – Узагальнені дані особливостей отримання ад'юванта β-глюкану на суміші ростових субстратів для вакцини проти ВПГ-2

Склад ПС, г/л	Склад ПС, г/л	Концентрація β-глюкану у біомасі, г/л	Тривалість процесу культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Джерело літератури
Saccharomyces cerevisiae TISTR5059					
Saccharomyces cerevisiae TISTR5059	Глюкоза – 15;	3,0	48	n = 200 об/хв; t = 30...32 °C; з аерацією 0,8 дм³/хв.	[229]
	дріжд. екстракт – 0,5;				
	KH₂PO₄ – 3,18;				
	K₂HPO₄ – 5,2;				
	MgSO₄ – 0,12;				
	NH₄Cl – 0,54.				
Trametes pubescens 923-2					
Trametes pubescens 923-2	NH₄NO₃ – 3;	1,1	40	t = 27...28 °C; pH = 5,8...6,2%; n = 120 об/хв; з аерацією 1 м³ / м³·хв.	[239]
	KH₂PO₄ – 1,2;				
	Меляса (бурякова) – 30;				
	Сечовина – 0,7.				
Saccharomyces cerevisiae НІІ31					
Saccharomyces cerevisiae НІІ31	Глюкоза – 15;	3,5	48	n = 200 об/хв; t = 30...32 °C; з аерацією 0,8 дм³/хв.	[236]
	дріжд. екстракт – 0,5;				
	KH₂PO₄ – 3,18;				
	K₂HPO₄ – 5,2;				
	MgSO₄ – 0,12;				
	NH₄Cl – 0,54.				

Згідно даних наведених у таблиці № 4, мінімальна тривалість культивування (40 год) є характерною для грибів *Trametes pubescens* 923-2. Порівняно менша тривалість культивування напряду впливає на економічність біосинтезу, адже дає змогу скоротити витрати ресурсів енергоносіїв та зменшити об'єм робочої сили. Однак культура *T. pubescens* 923-2, при цьому, відзначається майже у 3 рази меншою концентрацією β -глюкану (1, 1 г/л) на противагу двом іншим дріжджовим продуцентам. Зокрема концентрація β -глюкану для *Saccharomyces cerevisiae* НІІ31 складає 3,5 г/л. Склад поживного середовища усіх обраних біологічних агентів є відносно простим за своїми компонентами; особливості здійснення процесу культивування – наближені.

Проте представлена порівняльна характеристика технологічного процесу є не повною. Саме тому наступним етапом варто порівняти вартість ПС для культивування з метою отримання більшого розуміння їх економічної привабливості. Дані наведено у табл. № 6.

Таблиця № 6 – Вартість компонентів ПС для культивування
продуцентів β -глюкану

Продуцент	Компонент ПС, г/л	Ціна ком-та ПС, грн/кг	Вартість ком-та (грн) для приготування 1 л ПС	Джерело інформації
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR5059	Глюкоза – 15;	30	0,45	1
	дріжд. екстракт – 0,5;	1100	0,55	2
	KH ₂ PO ₄ – 3,18;	120	0,38	3
	K ₂ HPO ₄ – 5,2;	150	0,78	3
	NH ₄ Cl – 0,54;	113,40	0,06	5
	MgSO ₄ – 0,12.	14,80	0,001	4
Розрахована вартість ПС на 1л – 2,2 грн				
<i>Trametes pubescens</i> 923-2	NH ₄ NO ₃ – 3;	32	0,096	6
	KH ₂ PO ₄ – 1,2;	150	0,18	3
	Меляса (бурякова) – 30;	39	1,17	7
	Сечовина – 0,7.	29	0,02	8
Розрахована вартість ПС на 1л – 1,46 $\approx$ 1,5 грн				

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> НП31	Глюкоза – 15;	30	0,45	1
	дріжд. екстракт – 0,5;	1100	0,55	2
	KH ₂ PO ₄ – 3,18;	120	0,38	3
	K ₂ HPO ₄ – 5,2;	150	0,78	3
	MgSO ₄ – 0,12;	14,80	0,001	4
	NH ₄ Cl – 0,54.	113,40	0,06	5
	Розрахована вартість ПС на 1л – 2,2 грн			

Примітка.* – Ціни наведено станом на грудень 2023 р.

1. <https://prom.ua/p1292861578glyukozapishevayameshkah.html>;
2. <https://prom.ua/p1086437845ekstraktdrozhzhej.html>;
3. <https://prom.ua/p818241697kalijfosfornokislyjzameschennyj.html>;
4. <https://prom.ua/p618017953sulfatmagniya.html>;
5. <https://prom.ua/p151427647ammonijhloristyjhlorid.html>;
6. <https://prom.ua/ua/p546504983-amiachnaya-selitra-nitrat.html>;
7. [https://prom.ua/ua/p1300558364-patoka-melassa-sveklovichnaya.html?&primelead=MC44NQ](https://prom.ua/ua/p1300558364-patoka-melassa-sveklovichnaya.html?&primelead=MC44NQ;);
8. <https://prom.ua/ua/p1654617204-karbamid-mochevina-n462.html>.

Таким чином, бульйон з дріжджовим екстрактом та глюкозою (бульйон YG), що необхідний для культивування двох обраних штамів дріжджів *S. cerevisiae* TISTR5059 та *S. cerevisiae* НП31 є ідентичним та достатньо економічно вигідним з вартістю у 2,2 грн. за 1 л. Однак при цьому на 68 % дорожчим за ПС для грибів *Trametes pubescens* 923-2.

З урахуванням попередніх критеріїв порівняння продуцентів полісахариду- β -глюкану, для отримання ще більш точного аналізу доречним є визначення важливого показника – умовної вартості 1 г β -1,3/1,6-глюкану приведенного у табл. № 7.

Таблиця № 7 – Розрахунок умовної вартості 1 г β -глюкану синтезованого на ростовому субстраті

Біологічний агент	Концентрація β -глюкану, г/л	Тривалість процесу культивування, год	К-ть утвореного β -глюкану, за годину, г/год	Вартість 1 л ПС, грн/л	Умовна вартість 1г β -глюкану, грн/л
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR5059	3	48	0,06	2,2	0,6
<i>Trametes pubescens</i> 923-2	1,1	40	0,02	1,5	1,36
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> НП31	3,5	48	0,07	2,2	0,6

Отже, отримавши різноплановий аналіз трьох обраних продуцентів полісахариду β -глюкану, як ад'юванта для отримання інактивованих вакцин проти ВПГ-2, можна впевнено стверджувати, що штам *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 є найбільш раціональним для застосування з наведеною метою. Адже *S. cerevisiae* НІЗ1 характеризується: найбільшою концентрацією β -глюкану – 3, 5 г/л, простотою складу поживного середовища та доступністю до закупки його компонентів на території України, економічною привабливістю відповідно до умовної вартості 1 г полісахариду – 0,6 грн/л, що є важливим для забезпечення продуктивного біологічного процесу.

Додатковими аргументами для вибору *S. cerevisiae* НІЗ1 у якості продуцента слугують: повне розшифрування геному, доступні дані щодо оптимальних умови культивування та складу ПС для накопичення максимальної кількості цільового продукту, наявність у наукових джерелах поетапної інформації технологічного процесу виділення β -глюкану.

Розрахуємо вміст джерела вуглецю в ПС для здійснення вуглецевого живлення продуцента *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 для синтезу β -глюкану

Для культивування дріжджів штаму *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 було обрано ПС наступного складу, г/л: Глюкоза – 15; K_2HPO_4 – 5,2; KH_2PO_4 – 3,18; NH_4Cl – 0,54; $MgSO_4$ – 0,12; дріжджовий екстракт – 0,5.

Отже, як видно із складу компонентів поживного середовища, у якості джерела вуглецю (C) для здійснення свого живлення продуцент буде використовувати глюкозу ($C_6H_{12}O_6$). Тому надалі розрахуємо яка його кількість потрібна для забезпечення синтезу продуцентом 3,5 г/л β -глюкану. Для цього нам необхідно врахувати молекулярну масу β -глюкану – 162 г/моль, яка вміщує 72 г вуглецю. Відповідно за пропорцією дізнаємось вміст вуглецю у 3,5 г β -глюкану, а саме:

$$X_1 = (3,5 \times 72) / 3162 = 1,55 \text{ г (C) для } 3,5 \text{ г } \beta\text{-глюкану.}$$

Тепер знайдемо у якій кількості глюкози (г) вміщується 1,55 г вуглецю. Складаємо пропорцію знаючи, що у 180 г глюкози міститься 72 г вуглецю, розрахуємо:

$$X_2 = (180 \times 1,5) / 72 = 3,75 \text{ г (C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{) для 1,5 г (C).}$$

Важливо врахувати, що 40 % $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (за умови вирощування мікроорганізмів на вуглеводах) в обов'язковому порядку буде йти на окислювання CO_2 для отримання енергії необхідної конструктивному метаболізму. У зв'язку з цим здійснюємо перерахунок на вміст $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ у ПС з метою нівелювання витрат у 40 % (1,5 г $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$): $3,75 + 1,5 = 5,25$ г/л.

Потреба **вуглецевого живлення для синтезу біомаси** розраховується виходячи з того, що самого вуглецю у біомасі 50 %, звідси у 7 г біомаси – 3,5 г (C). Знаходимо у якій кількості глюкози міститься 3,5 г (C), знову ж таки, використовуючи пропорцію:

$$X_3 = (3,5 \times 180) / 72 = 8,75 \text{ г (C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{) для 3,5 г (C).}$$

Врахуємо втрати субстрату у кількості – 40 % (3,5 г) на «холосте окислення», щоб отримати 7 г/л біомаси варто внести: $8,75 + 3,5 = 12,25$ г/л ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Отже, загальний вміст глюкози в середовищі, який необхідний для синтезу біомаси у кількості – 7 г/л, а також β -глюкану – 3,5 г/л, складає: $8,75 + 12,25 = 21$ г/л.

З розрахунку складу ПС маємо досить бідне ПС на кількісний вміст вуглецевого джерела, тому доцільним буде збільшення кількості внесеної глюкози до розрахованих – 21 г/л. Джерелом азотного живлення тут буде виступати дріжджовий екстракт, адже він вміщує пептиди, амінокислоти, нуклеотиди; може виступати як джерело азотного живлення у поєднання з NH_4Cl й у якості додаткового фактору росту.

Надалі потребу для синтезу біомаси у **кількості азоту** розраховуємо з урахуванням його вмісту у біомасі – 10 %, маємо – 0,7 г для 7 г/л біомаси.

Враховуючи, що у складі ПС немає компонента – **джерела нітрогену**, перерахунок для визначення його кількості здійснюємо по біомасі: $(7 \times 0,1) = 0,7$ г (N). Слід надалі дізнатись у скількох грамах солі NH_4Cl міститься 0,7 г нітрогену. Знаючи, що молекулярна маса NH_4Cl – 53, 5 г/моль, яка при цьому містить 14 г нітрогену, складаємо пропорцію:

$$X_4 = (53,5 \times 0,7) / 14 = 2,67 \text{ г} \approx 2,7 \text{ г (NH}_4\text{Cl) для 0,7 г (N).}$$

Варто зауважити, що для культивування дріжджів *S. Cerevisiae* необхідно не менше 0,14 г (NH₄) на 1 л поживного середовища. При цьому у складі вище наведеного поживного середовища для культивування *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 маємо лише 0,54 г. У даному випадку така суттєва нестача амонійного азоту пов'язана зі специфікою синтезу β-глюкану – «азотне голодування» призводитиме до збільшення виходу кінцевого продукту.

**Обґрунтування вибору типу ферментера та способу культивування
Saccharomyces cerevisiae НІЗ1 для отримання полісахариду β-глюкану**

Обраний продуцент *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 для отримання ад'юванта β-глюкану по відношенню до:

- оптимальної температури культивування є **мезофілом** ($t = 30^{\circ}\text{C}$);
- оптимального значення рН є **нейтрофілом** ($\text{pH} = 5,0$);
- по відношенню до кисню є **факультативним анаеробом**.

Виходячи із наведених вище характеристик продуцента, доцільним є:

➤ по-перше, **забезпечити асептичні умови біосинтезу** з метою унеможливлення сторонньої контамінації (мезофільними та нейтрофільними мікроорганізмами); доцільним є культивування продуцента **глибинним способом** (не потребує великих площ, громіздкого обладнання, за потреби об'єм ферментера можна у подальшому збільшити за рахунок його висоти); контамінація у ферментері попереджається за допомогою створення надлишкового тиску;

➤ по-друге, основна частина синтезу полісахариду β-глюкану відбувається у **стаціонарній фазі росту**, тому раціональним є культивування у періодичній системі;

➤ по-третє, для інтенсифікації накопичення біомаси, **доцільними є аераційні умови**. У зв'язку з цим ферментер повинен бути оснащений барботером для подачі аераційного повітря. Аргументується дане технологічне рішення тим, що *Saccharomyces cerevisiae* є нездатними синтезувати свої клітинні структури за умови анаеробіозу, адже у *S. cerevisiae* – відсутній «Ефект Пастера», тобто аерація

дріжджового бульйону – прискорює ріст дріжджів, а анаеробні умови культивування – призводять для зменшення швидкості росту клітин;

➤ по-четверте, необхідно провести попередню стерилізацію обладнання, аераційного повітря, (піногасників не використовується, адже у ПС немає компонентів, що сприятимуть піноутворенню) й усіх інших компонентів, котрі потраплятимуть у ферментер під час культивування;

➤ по-п'яте, доцільним є оснащення ферментера механічним перемішуючим пристроєм з метою забезпечення високої інтенсивності кисню та масообмінних процесів (нормальною умовою розвитку *S. Cerevisiae* є енергійне перемішування під час вирощування культури). Враховуючи, що дана культура дріжджів не має додаткових факторів вибору, по типу наявності міцелію та ін., є невибагливою до вибору перемішуючого пристрою, пропонуємо використовувати лопатеву мішалку для перемішування культуральної рідини за усім об'ємом ферментера. Окрім того, ферментер в обов'язковому порядку повинен бути оснащеним нагрівальними елементами для підтримання оптимальної температури культивування продуцента, а також рН-датчиком та термодатчиком.

Підсумовуючи усе вище зазначене, обраний ферментер повинен бути оснащений:

- ✓ датчиками для вимірювання: температури, рН, розчинного кисню (процес культивування проводиться повністю автоматично);
- ✓ нагрівальним пристроєм (нагрівання може проводитись електрично або за використання пари);
- ✓ мішалкою для забезпечення ефективних масообмінних процесів (лопатевого типу);
- ✓ барботером у нижній частині ферментера для подачі аераційного повітря.

2.6. Розрахунки потреб у субстанції для випуску імунобіологічного препарату, річної кількості необхідної культуральної рідини, об'єму ферментеру та кількості виробничих циклів

Для початку розрахуємо річну потужність виробництва ЛЗ та кількості серій на рік.

Станом на сьогоднішній день, майже 90% населення світу є носіями вірусу простого герпесу II-го типу без наявних видимих проявів анамнезу захворювання, що в першу чергу пов'язане із персистенцією вірусу у клітині та його латентним станом [240].

Однак, доцільним буде проведення розрахунків річної потреби потужності виробництва готового імунобіологічного препарату саме для задоволення потреб населення України. У відповідності до офіційних статистичних даних, населення України становить 41,6 млн людей (станом на 01.01.2021 рік) [241]

Високий відсоток інфікованих осіб (до 95 %) та хворих – дають підстави стверджувати про епідемічне поширення вірусу генітального герпесу (ГГ) світового населення. При чому кількість зареєстрованих випадків ГГ – значною мірою зросла до початку XXI століття на противагу офіційній статистиці для 80-х років минулого століття.

Для Європейських країн цей показник складає 7 % (з урахуванням хворих на відкриту форму вірусу простого герпесу II-го типу та носіїв з латентною формою вірусу). Сама ж частка ідентифікації випадків захворювання характеризується значною варіацією, корелюючи з такими чинниками, як: вік, характеру сексуальної активності за життя, соціально-культурного рівня населення та його економічної спроможності, тощо) [242].

Враховуючи представлені вище статистичні дані, можемо вирахувати наближене теоретичне значення щорічно зареєстрованих хворих в Україні на ГГ, а саме: $(41\ 600\ 000 \times 7\%) / 100 = 2\ 912\ 000$ (к-ть реєстру хворих вірусом простого герпесу II-го типу в Україні).

Подальші розрахунки потреби (у вакцині проти ВПГ-2) доцільно проводити з урахуванням ринку вакцин проти ВПГ-2 в останнє офіційно зареєстрованих в Україні: наявності лише двох, певною мірою дієвих, імунобіологічних препаратів. У такому випадку **потреба складатиме 30%**, з чого впливає **необхідність отримання вакцинного антигену** з допомогою культивування мікроорганізмів: $(2\ 912\ 000 \times 30\%) / 100 = 873\ 600$ (потенційних споживачів, котрі придбають наш вакцинний препарат з β -глюканом).

Враховуючи що інактивована вакцина з епігенетичним ад'ювантом знаходиться на стадії доклінічних досліджень, курс вакцинації доцільно приймати у відповідності із зазначеного на період дослідження. Тоді курс вакцинації на одну людину передбачає застосування **1 мл суспензії, котра вміщує 50 мкг β-глюкану**, з проведенням обов'язкової ревакцинації через пів року у кількості 50 мкг β-глюкану. Разом **кількість β-глюкану на одну людину складає 100 мкг** [243].

Надалі розраховуємо необхідну кількість β-глюкану з урахуванням кількості хворих вірусом герпесу в Україні: $873\,600 \times 100 \text{ мкг} = 87360000 \text{ мкг}$ або **873,6 г β-глюкану**.

Вміст β-глюкану в одній дозі складає 50 мкг. Таким чином кількість доз на рік становитиме $87360000 / 50 = 1\,747\,200$ доз (флаконів).

Враховуючи продуктивність машини із розливу й закупорки флаконів у 2470 флаконів/годину та часу її роботи у 12 годин, за один цикл наповнення матимемо: $2470 \times 12 = 29\,640$ флаконів [244].

У раніше обрану вторинну тару (шоу-бокс) вміщується 20 скляних флаконів, розраховуємо кількість пачок: $29\,640 / 20 = 1482$ пачок. В подальшому пачки вкладатимуть у групову тару – **78 пачок**; з чого отримуємо **19 наповнених гофронових ящиків за серію** роботи пакувальної машини.

Знаходимо кількість серій на рік: $1\,747\,200 / 29\,640 = 59$ серій.

Надалі проведемо розрахунок річної потужності виробництва субстанцій, об'єму ферментера й кількості виробничих циклів.

Задля забезпечення 30 % хворого населення України розробленою ліофілізованою інактивованою вакциною проти ВПГ-2 з β-глюканом (у якості ад'юванта для підвищення імуногенності), необхідно отримати 873,6 г або 873 600 мг ад'юванта. З урахуванням продукції **обраного продуцента *Saccharomyces cerevisiae* НІІ31** β-глюкану у концентрації – 3,5 г/л або 35000 мг/л в культуральній рідині (КР), можемо розрахувати необхідну кількість культуральної рідини для отримання 873,6 г полісахариду.

Складаємо пропорцію: $3,5 \text{ г} - 1 \text{ л (КР)}$

$$873,6 \text{ г} - X$$

$X = (873,6 \times 1) / 3,5 = 24,96 \text{ л}$ культуральної рідини $\approx 25 \text{ л}$ культуральної рідини.

Враховуємо суму втрат отриманих за рахунок виділення та подальшого очищення субстанції для отримання готового імунобіологічного препарату у кількості 70 %, адже маємо справу з очищеною та стабільною вакциною для використання в медичних цілях. Тому розраховуємо необхідну кількість культуральної рідини з урахуванням втрат: $V_{\text{кр}} = 25 / 1 - 0,7 = 83,3 \text{ л}$.

Моделюємо узагальнену схему:

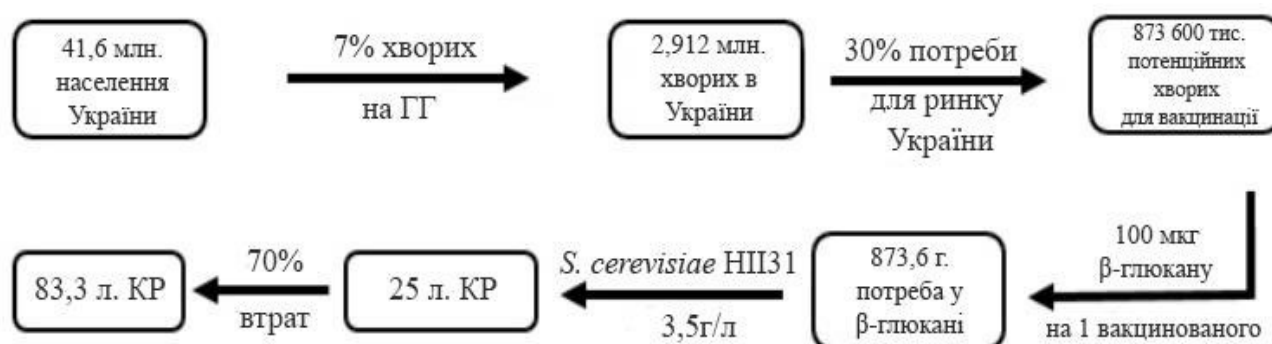


Рисунок 2 – Узагальнена схема розрахунку кількості культуральної рідини для біосинтезу β -глюкану *Saccharomyces cerevisiae* HPI31

Знайдемо, яку кількість КР ми зможемо отримати за цикл ферментації для подальшого розрахунку відповідної кількості стадій приготуванням посівного матеріалу (ПС).

1. З цією метою приймемо кількість робочих трудоднів $T_{\text{рд}} = 42$ (6 тижнів), тоді розрахуємо кількість продукту на добу:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{гп}} / T_{\text{тд}} = 83,3 \text{ л} / 42 \text{ дні} = 1,98 \text{ л/добу} \approx 2 \text{ л/добу}.$$

2. Надалі кількість продукту за один цикл ($V_{\text{кр}}$), з урахуванням коефіцієнту запасу ($K_1 = 1,1 \dots 1,5$), що враховує можливість нестерильних операцій, а також цикл роботи ферментера $T_{\text{цф}}$, який включає в себе тривалість виробничого біосинтезу для обраного продуцента (48 год), а також час необхідний для підготовки ферментера до початку роботи (10,5 год: де на здійснення миття й технічного огляду (2 год), подальшу перевірку ферментара на герметичність (2

год), здійснення стерилізації (2 год), обов'язкового охолодження (1,5 год), завантаження ПС (1,5 год), а також засів необхідною культурою БА (0,5 год), вивантаження КР (1 год)), становитиме:

$$V_{кр} = (K_1 \cdot V_d \cdot T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 2 \times 58,5) / 24 = 5,36 \text{ л.}$$

3. Звідси розраховуємо кількість циклів для ферментації:

$$N_{цк} = V_{гп} / V_{цк} = 83,3 / 5,36 = 15,5 \approx 16 \text{ циклів.}$$

Наступним розрахуємо кількість стадій підготовки ПС:

Щоб отримати за один цикл $V_{кр} = 5,36 \text{ л.}$, в обов'язковому порядку треба врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря – 10%. Звідси кількість ПС та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом в самому ферментері складатимуть:

$$V_{роб} = V_{кр} / (1 - E_f) = 5,36 / (1 - 0,1) = 5,95 \text{ л} \approx 6 \text{ л,}$$

де E_f – втрати культуральної рідини під час біосинтезу.

З урахуванням коефіцієнту заповнення ($K_{зап} = 0,6$), розрахуємо можливий геометричний об'єм ферментера ($V_{ф}$):

$$V_{ф} = V_{роб} / K_{зап} = 6 / 0,6 = 10 \text{ л.}$$

Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер $V_{сф} = 10 \text{ л}$ й уточнюємо, прийнятий нами раніше, коефіцієнт заповнення:

$$K_{зап} = V_{роб} / V_{сф} = 6 / 10 = 0,6.$$

Проводимо уточнення коефіцієнту заповнення ферментеру в межах (0,5...0,6), тому геометричний об'єм ферментера є вірно обраним. Кількість посівного матеріалу (доза) складатиме – 10 % від об'єму самого ПС.

Звідси кількість ПС у самому ферментері становитиме з урахуванням $X_{вф}$ – дози посівного матеріалу для ферментера:

$$V_{пс} = V_{роб} / (1 + X_{вф}) = 6 / (1 + 0,1) = 5,4 \text{ л.}$$

Тоді кількість посівного матеріалу складатиме:

$$V_{пм} = V_{роб} - V_{пс} = 6 - 5,4 = 0,6 \text{ л.}$$

Кількість інокуляту для засіву малого ферментера можна одержати культивуванням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* НІІ31 у колбах на качалці. З цією метою використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{колб} = 750 \text{ мл}$ та

коефіцієнтом заповнення $K_{зк} = 0,2$. Звідси отримаємо необхідну кількість колб для посівного матеріалу:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм}} / (V_{\text{колб}} \times K_{зк}) = 600 / (750 \times 0,2) = 4 \text{ качалочні колби.}$$

Кількість ПС для вирощування самого інокуляту у колбах на качалці становитиме:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{к}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 0,6 / (1 + 0,1) = 0,54 \text{ л.}$$

Тоді кількість посівного матеріалу з пробірок, відповідно складає:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{к}} - V_{\text{пск}} = 0,6 - 0,5 = 0,1 \text{ л} = 100 \text{ мл.}$$

Отже, за отриманими результатами проведених розрахунків, для біосинтезу полісахариду β -глюкану (ад'юванта) з використанням у якості продуцента – *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1 (тривалість культивування – 48 год., концентрація β -глюкану в біомасі – 3,5 г/л), приймемо для встановлення один ферментер з об'ємом 10 л.

Загалом процес біосинтезу β -глюкану здійснюватиметься у 2 стадії:

1. Вирощування посівного матеріалу у лабораторії (пробірки зі скошеним агаризованим ПС) та подальше отримання інокуляту на ПС в 4 колбах на качалці, об'ємом 750 мл;
2. виробничий біосинтез полісахариду у ферментері об'ємом 10 л.

РОЗДІЛ 3. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ β-ГЛЮКАНУ

Основні методи виділення β-глюкану

Полісахарид β-глюкану накопичується у клітинній стінці продуцента – *Saccharomyces cerevisiae* НІЗ1, що повною мірою обумовлює специфіку його виділення. Додатково, крім характеристики самого продуцента, вибір методу виділення обумовлено: типу полісахариду-β-глюкану, сфери подальшого застосування, а відтак й ступеня чистоти продукту. Якщо мова йде про одержання продукту з невисоким ступенем очистки, отримана культуральної рідини підлягає сушінню у повному обсязі без попереднього етапу очистки та виділення. Незв'язані та неочищені полісахариди можуть бути виділені методами фільтрації або центрифугуванням. Що ж до очищеної та зв'язної форми полісахаридів, раціональним буде використання операцій висушування або змішування з водовмісними неполярними розчинниками: етанол, ізопропіловий спирт або ацетон, котрі дають змогу відділити більш очищений β-глюкан без зайвої кількості зв'язаної води.

Експериментально доведено, що додавання електролітів – зменшує втрати полісахаридів під час процесу виділення. Варто також зауважити, що використання розчинників з можливістю їх відновлення – значною мірою зменшує грошові затрати на очищення. При цьому задля отримання високоочищених полісахаридів, утворений осад після додавання розчинника, додатково змішують, змішують з дистильованою водою та надалі висушують.

З-поміж існуючих методів одержання β-глюкану, виділяємо три найбільш доцільні та здійснюємо порівняльний аналіз із застосуванням табл. № 8 [245, 246].

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив(ла)	Белемєць Т.О.				РОЗДІЛ 3 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ β-ГЛЮКАНУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консультант								223
Керівник	Красінько В.О.					94		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

Таблиця № 8 – Характеристика основних методів виділення та очищення
β-глюкану

№ п/п	Суть методу	Переваги методу	Недоліки методу
1	Додавання рівних об'ємів етанолу чи ізопропанолу, при температурі 5°C. Витримання 8 годин. Відділення осаду і висушування.	- Простота реалізації методу	- Довготривалість процесу виділення; - не забезпечує відділення баластних речовин.
2	Додавання CaCl_2 і відділення оксалату кальцію. Додавання двох об'ємів етанолу чи ізопропанолу. Відділення осаду та висушування.	- β-глюкан більш високого ступеню чистоти; - короткий час експозиції процесу виділення.	- Складність реалізації, використання органічних розчинників, що є економічно невигідно в масштабах виробництва.
3	Додавання CaCl_2 і відділення оксалату кальцію. Доведення рН до значення 12,0 за допомогою NaOH. Відділення осаду та висушування	- Використання гідроксиду натрію зменшує економічні витрати на реалізацію методу; - екологічно безпечний метод.	- Необхідність проведення трьох етапів центрифугування

Аналізуючи дані, представлені у таблиці № 8, видно, що перші початкові операції схожі в усіх трьох представлених методах: культуральна рідина нейтралізується додаванням розчину лугу (NaOH), після чого одержаний розчин нагрівають при температурі 80 °C, упродовж 30 хв., центрифугують за 2 400 об/хв, 2 год.

Перший метод полягає у тому, що супернатант охолоджують до температури 5 °C й осаджують додаванням еквівалентних об'ємів $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (96 %) чи $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$. Потім розчин витримують при заданій температурі 8 год. з метою завершення осадження полісахариду. Для одержання полісахариду більш високого класу чистоти, надалі проводять повторне осадження $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (96 %). Після повного осадження β-глюкану, усю систему (осад й розчин) – витримують при температурі 55 °C, упродовж 8 год. та за допомогою сублімаційної сушки одержують вже готовий продукт.

Проте даний метод характеризується своїми недоліками та перевагами. З-поміж **переваг** даного методу, можна виділити його простоту і доступність, оскільки для осадження цільового продукту використовують лише один реагент. До **недоліків**: відсутність відділення баластних речовин (у відповідності до мети кваліфікаційної роботи є вагомим) – оксалату (погіршує якість готового продукту та ускладнює цільове використання β -глюкану), пролонгованість тривалості процесу виділення, конструкція сублімаційної сушки, яку використовують для одержання товарної форми β -глюкану у цьому методі, є досить складною та економічно затратною.

Другий метод базується на застосуванні двовалентних катіонів (магній, мідь, кальцій, кобальт, залізо та нікель) у комплексі з органічним розчинником. Частіше за все застосовують CaCl_2 (2 %) на 1 л супернатанту. Саме його додавання здатне призводити до утворення нерозчинного осаду солі CaC_2O_4 (оксалату кальцію), який надалі потрібно додатково виділяти центрифугуванням чи фільтрацією. Водорозчинний органічний розчинник, такий як $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ чи $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ додають у кількості 20...40 % у відношенні до об'єму супернатанту. Осад виділяють за допомогою центрифугування.

До **переваг** методу, у порівнянні з першим, можна віднести виділення більш очищеного β -глюкану й відсутність пролонгації часу виділення; **недоліки**: складність, проведення 3-х поступових етапів центрифугування й використання декількох реагентів для виділення. Відповідно даний метод є більш дороговартісним у своїй реалізації за рахунок високих економічних затрат на органічні розчинники.

Суть **третього методу** полягає у додаванні CaCl_2 (2 %) на 1 л супернатанту, з подальшим залуженням рН використовуючи NaOH задля виділення полісахариду- β -глюкану. Додавання CaCl_2 призводить до утворення нерозчинного осаду CaC_2O_4 (як і в другому методі), який успішно відділяють центрифугуванням. Після рН розчину доводять до значення 12,0. Останніми етапами є подальше центрифугування та сушіння виділеного полісахариду.

Перевагами третього методу є відносна простота його застосування та економічна привабливість. Першочергово це обумовлено відсутністю необхідності використання дорогих розчинників (з урахуванням необхідної кількості розчинника задля виділення β -глюкану). Варто також зауважити: використання розчинників може негативно впливати на фізичний стан та здоро'я персоналу, який з ними працює. Не останню роль відіграє проблема знешкодження відходів – утилізація стічних вод. Справа в тому, що використані у біотехнологічних процесах розчинники в складі стічних вод – сприяють погіршенню екологічної ситуації довкілля, а також інгібують ріст мікрофлори необхідної для очистки стічних вод (сприяти деградації активного мулу) [247-249].

Обґрунтування вибору способу відділення біомаси

По закінченню ферментаційних процесів, отримана культуральна рідина вміщує в собі не лише клітинні стінки продуцента необхідний цільовий компонент, але й продукти метаболізму та залишки ПС.

Відділення та очищення β -глюкану включає такі етапи:

- попередня обробка культуральної рідини (нейтралізація до рН 4,5, та нагрівання $t = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T = 30$ хв. для інактивації глюканази);
- відділення біомаси центрифугуванням (горизонтальна центрифуга безперервної дії зі шнековим вивантаженням осаду);
- осадження (CaCl_2 конц. 2 %) та відділення отриманого нерозчинного осаду CaC_2O_4 від супернатанту – центрифугуванням (горизонтальна центрифуга із шнековим вивантаженням осаду);
- осадження β -глюкану за рахунок зміни рН до 12,0, титрувальний агент – NaOH (6 %) у кількості 2 мл на 1 літр супернатанту;
- відділення β -глюкану методом центрифугування за використання фільтруючої центрифуги періодичної дії з ножовим вивантаженням осаду;
- висушування полісахариду- β -глюкану за використання конвективної сушарки розпилювального типу;

- додатково етап розведення та нейтралізації осаду β -глюкану.

Тобто, щоб почати роботу з виділення ЦП (у нашому випадку – полісахариду), необхідно відділити клітини біомаси від основного розчину. Перш за все необхідно провести нейтралізацію культуральної рідини розчином NaOH, адже під час культивування продуцента β -глюкану рН середовища доводять до значення 4,5, що сприяє синтезу ЦП та знаходиться в межах оптимальних значень для росту даного мікроорганізму. Але при цьому низьке значення рН:

- ускладнює процес виділення;
- інгібує процес відділення оксалату;
- може негативно вплинути на якість готового продукту.

У зв'язку з перерахованими вище причинами, маємо потребу довести значення рН до нейтрального; з цією метою використовують розчин NaOH.

По закінченню нейтралізації необхідно нагріти культуральну рідину до температури 80 °C і витримувати 30 хв. Цей процес проводять з метою інактивації ферментів, котрі здатні призвести до деградації полісахариду β -глюкан. Адже загально відомо, що полісахарид- β -глюкан швидко розчиняється під дією глюканази до глюкози і гентобіози. А підтримання температури на рівні саме 80 °C сприяє збереженню реологічних властивостей полісахариду [250].

Відділення біомаси, згідно обраного методу, можна проводити застосовуючи три різні методи, а саме: фільтрація, центрифугування та відстоювання. Тому надалі доречним є більш детально розглянути кожен із них та обрати найбільш раціональних із урахуванням кінцевої мети кваліфікаційної роботи.

Фільтрування

Однієї з найбільш вагомих характеристик даного технологічного процесу є показники його швидкості (можна визначити за кількістю фільтрату, який отримують з одиниці поверхні (фільтруючої) у одиницю часу), котрій характеризується прямопропорційною залежністю від різниці тиску з двох боків фільтрувальної перегородки, а також оберненопропорційною залежністю від гідравлічного опору перегородки з шаром осаду, що здатен на ній накопичуватись.

Варто враховувати, що культуральна рідина, яка містить полісахарид β -глюкан, продукти метаболізму й біомасу продуцента, має підвищену в'язкість. Дане внутрішнє тертя, очікувано, призведе до закупорки самих перегородок фільтрувального матеріалу, тим самим провокуватиме накопичення осаду на перегородці. Як наслідок: матимемо збільшення гідравлічного опору та зниження швидкості фільтрації.

З метою підвищення продуктивності устаткування фільтрації, а також зниження витрат ручної праці, можна використовувати вакуум-фільтри. Вони представляють барабан, занурений нижньою частиною у ємність, куди безперервно поступає культуральна рідина. Поверхня барабана вакуум-фільтру є перфорованою та обтягнутою фільтруючою тканиною; барабан, при цьому, є розділений спеціальними перегородками на відповідні секції.

Враховуючи специфіку обраного у кваліфікаційній роботі продуцента, застосування таких фільтрів є недоцільним. Адже утворений осад матиме великий питомий опір, а навіть дуже тонкий його шар (залишається після зрізання ножом) – провокуватиме досить різке зниження швидкості фільтрування.

Зважаючи на фізико-хімічні характеристики ЦП, застосування вакуум-фільтрів призведе до пролонгації процесу відділення біомаси та погіршить якість самого процесу, а отже й результату [215].

Відстоювання

Детальний розгляд процесу відстоювання у якості можливого варіанта відділення біомаси є недоцільним. Адже сам процес – довготривалий й неефективний, оскільки не може забезпечити повноцінного відділення біомаси. Тому його використання у масштабах промислового виробництва полісахариду (β -глюкану) не є вигідним; у нашому випадку необхідно повністю відділити біомасу від цільового продукту.

Центрифугування

Найбільш поширеним способом розділення неоднорідних систем під дією відцентрових сил є центрифугування (або фугування) у машинах-центрифугах. Центрифугування за своєю суттю – процес відстоювання та фільтрування у полі

відцентрових сил. Відцентрові сили, що розвиваються під час центрифугування, сильніше діють на рідку систему ніж сили тяжіння й тиску.

Основна частина машини-центрифуги – барабан (корзина) з суцільними чи дірчастими стінками, що обертається з великою швидкістю на вертикальному або горизонтальному валу [251].

Центрифуги класифікують за чинником розділення, режимом роботи, а також способом вивантаження осаду.

Механічне вивантаження осаду – це найбільш значуща умова безперервної роботи центрифуг. У зв'язку з цим саме спосіб розвантаження центрифуги є вагомою характеристикою їх класифікації [251, 252]. Класифікація центрифуг наведена на рис. № 3 та № 4, відповідно.



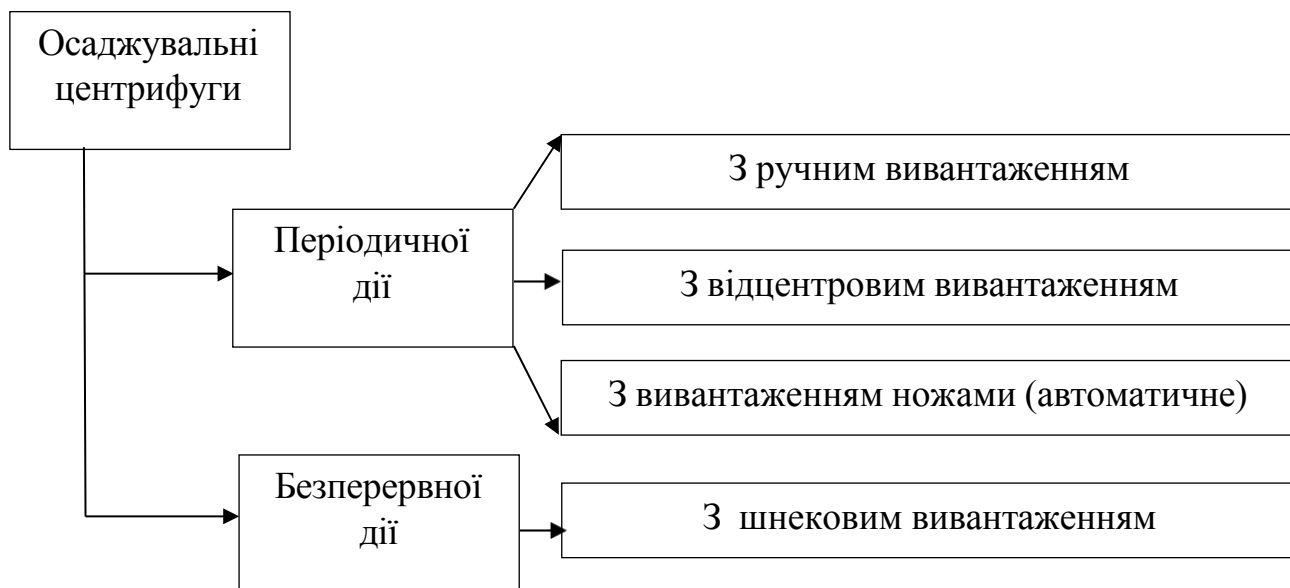


Рисунок № 3 – Класифікація нормальних центрифуг ($\Phi < 3500$)

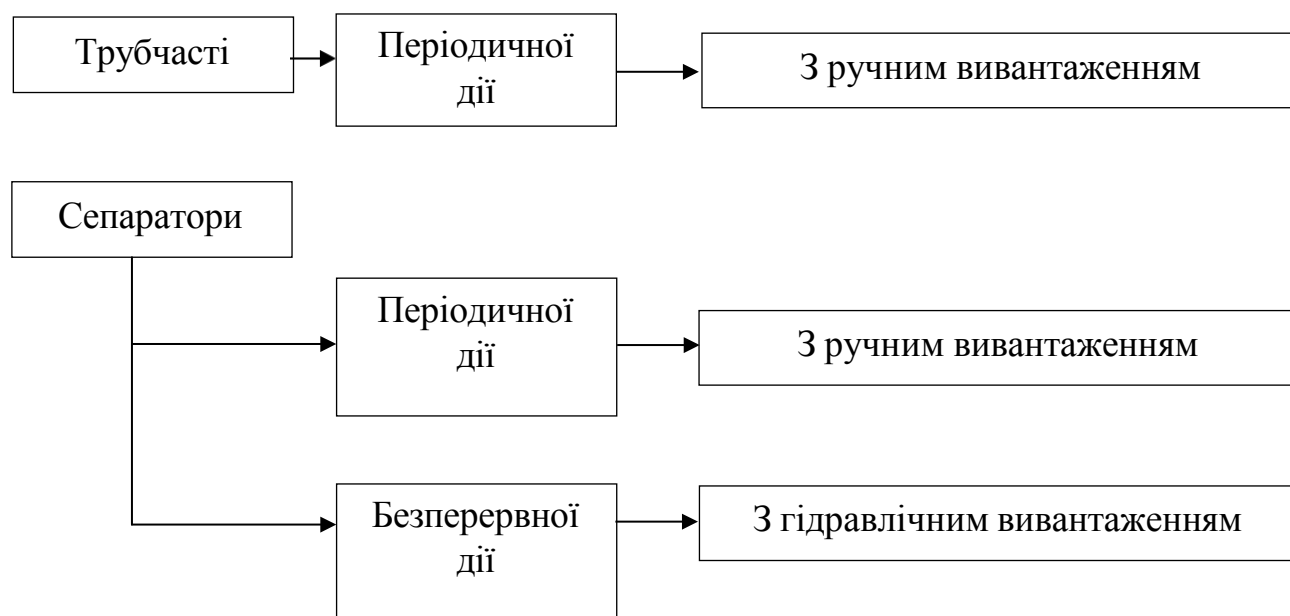


Рисунок № 4 – Класифікація надцентрифуг ($\Phi > 3500$)

Отже, виходячи із усього вище сказано, відділення біомаси доцільно здійснювати методом центрифугування; центрифуга безперервної дії із шнековим видаленням осаду рис. № 5.

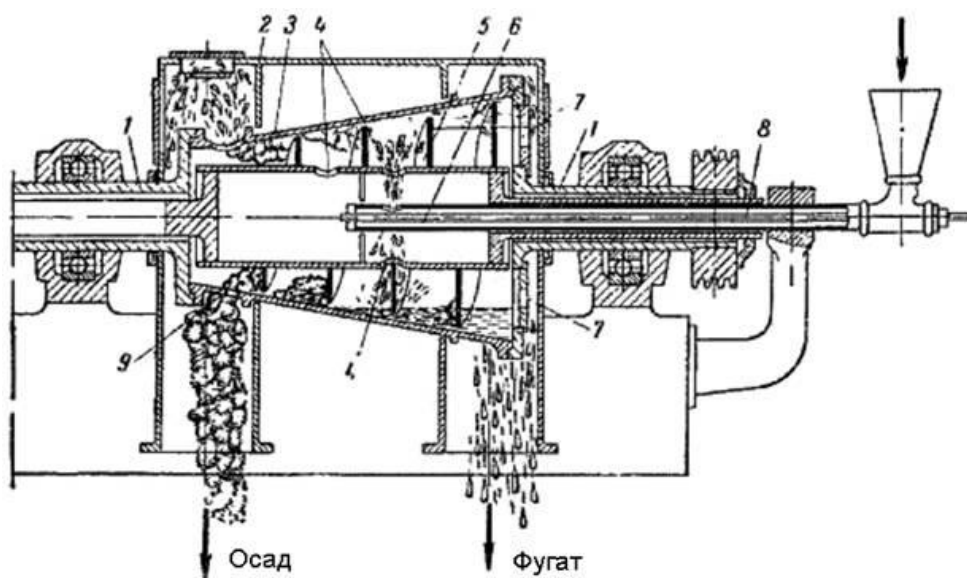


Рисунок № 5 – Горизонтальна центрифуга безперервної дії зі шнековим вивантаженням:

1 – порожниста цапфа; 2 – кожух; 3 – барабан; 4 – отвори для суспензії; 5 – барабан-шнек; 6 – труба для подачі суспензії; 7 – вікно для фугату; 8 – труба для подачі промивної води; 9 – вікно для вивантаження осаду

Режим роботи центрифуги можна регулювати за рахунок: зміни тривалості відстоювання, зміни тривалості осушення отриманого осаду (регулюючи відкриття вікон), а також змінюючи кількість робочих обертів барабана й шнека.

Перевагами горизонтальної центрифуги безперервної дії зі шнековим вивантаженням є: висока ступінь продуктивності, придатність для розділення суспензій з високим вмістом твердих, а також в'язких речовин (є доцільним адже маємо справу з в'язкою фазою культуральної рідини). Використання саме центрифуги осаджуваного типу дозволяє отримати ряд переваг, зокрема у прискоренні процесу відділення біомаси. Також зазначимо, що даний тип центрифуг доцільно застосовувати для розподілу складних систем, якою і є культуральна рідина, що містить β -глюкан [251-253].

Узагальнена інформація щодо методів відділення біомаси відображена у табл. № 9.

Таблиця № 9 – Узагальнена характеристика методів відділення біомаси

№ п/п	Метод	Доцільність використання з метою відділення біомаси
1	Фільтрування	Довготривалість процесу; з урахуванням морфологічних характеристик БА матимемо низьку швидкість фільтрування
2	Відстоювання	Здійснення процесу є доволі довготривалим із подальшою сумнівною якістю одержаного результату
3	Центрифугування	Характеризується високою продуктивністю; має придатність для розділення суспензій із високим вмістом твердих/в'язких речовин. Застосування даного методу є доцільним для відділення грибної біомаси

Отже, аналізуючи узагальнену інформацію, щодо характеристик методів відділення біомаси наведену у табл. № 9, а також беручи до уваги мету роботи й урахування фізико-хімічних характеристик культуральної рідини, для відділення біомаси обираємо метод центрифугування; горизонтальну центрифугу безперервної дії з шнековим вивантаженням осаду.

Обґрунтування способу осадження та відділення оксалату

У процесі метаболізму та асиміляції джерела вуглецю (глюкози) обраним продуцентом, у середовищі культивування накопичується значна кількість вторинного метаболіту (екзометаболіту) – оксалату.

Загальновідомо, що вторинні метаболіти не можуть синтезуватись у чистому вигляді, а здатні накопичуються лише у комплексі сполук. І саме вилучення ЦП із такого комплексу є важливим місцем у технологічному процесі виділення полісахариду.

Оксалат – основний побічний продукт синтезу β -глюкану. Вченими було встановлено, що оксалат може синтезуватись одразу за декількома метаболічними шляхами, до прикладу: окиснення гліюксалату до оксалату, а також гідролітичне розщеплення оксалоацетату (у циклі трикарбонових кислот) [245, 246].

За рахунок того, що оксалат є баластною речовиною, його спорідненість з двовалентними катіонами надає змогу цій речовині утворювати нерозчинні осад. Важливим є те, що накопичення оксалату у супернатанті – ускладнює здійснення

процесу осадження β -глюкану – деяка кількість β -глюкану не перейде з розчину в осад на етапі залужнення супернатанту. Зрозумілим є те, що значна концентрація нерозчинних солей оксалату у готовому продукті, призведе до погіршення його фізико-хімічних властивостей (до прикладу: однорідність структури, здатність утворювати всевдопластичні розчини). Як результат – проблеми під час цільового використання β -глюкану, адже неоднорідну систему буде важко у подальшому суспендувати у бітумній емульсії з метою утворення однорідної системи.

Осадження оксалату

Експериментально доведено, що зниження рН до рівня 4,5 є не лише необхідною умовою для росту мікроорганізму-продуценту, синтезу полісахариду, а й також сприяє активації ферменту – *оксалатдекарбоксилази*, який розщеплює оксалат на форміат і вуглекислий газ.

З метою видалення із супернатанту оксалату доцільно використати CaCl_2 (2 %) по відношенню до об'єму супернатанту. Дана сполука утворює з оксалатом нерозчинний осад (CaC_2O_4), який легко відділяється від супернатанту [246].

Відділення оксалату кальцію

Видалення нерозчинного осаду CaC_2O_4 , з технологічної точки зору процесу, можна здійснити операціями як фільтрування або центрифугування. Доцільним є використання горизонтальної центрифуги із шнековим вивантаженням осаду, оскільки їй притаманні наступні особливості [251-253]:

- відносно невелика тривалість процесу центрифугування;
- простота конструкції центрифуги;
- якісне видалення твердої фази (нерозчинного осаду CaC_2O_4);
- безперервна робота апарату;
- механічне вивантаження осаду.

Окрім того, застосування даного типу центрифуг дозволить значною мірою здешевити процес центрифугування, адже даний тип центрифуги є відносно недорогим (порівняно з іншими типами центрифуг).

Фільтрування – менш вигідний метод для відділення CaC_2O_4 , оскільки характеризується більш тривалим процесом операції ніж центрифугування, що

пояснюється здатністю β -глюкану, який міститься в супернатанті у розчиненому вигляді, утворювати *псевдопластичний розчин*. Також враховуємо, що супернатант, який вміщує полісахарид, – це складна дисперсна система, що може містити баластні речовини та тим самим обумовлювати гальмування процесу фільтрування. Зважаючи на це, ефективність відділення оксалату у разі використання фільтрування, є у достатній мірі сумнівною.

Підсумуємо: осадження оксалату раціонально здійснювати шляхом внесення у супернатант CaCl_2 та у подальшому відділяти утворений нерозчинний осад солей CaC_2O_4 методом центрифугування (центрифуга осаджувального типу із шнековим вивантаженням осаду).

Обґрунтування методу осадження β -глюкану

Основним методом виділення β -глюкану є осадження.

Осадження – складний процес, суть – випадання розчиненої речовини в осад за рахунок додавання певних реагентів або зміни фіз-хім. параметрів.

Доцільність використання даного методу для виділення β -глюкану пояснюється наступними його особливостями [215, 253]:

- дає змогу (порівняно з іншими методами виділення) одержати цільовий продукт з найменшою кількістю втрат;
- можливість отримати саме β -1,3/1,6-глюкану з високим ступенем розчинності;
- значний вихід полісахаридів (за умови використання органічних розчинників);
- процес є відносно не довготривалим;
- використання простого, відносно до апаратурного оформлення й технологічних характеристик, обладнання (відсутність потреби використання специфічного обладнання, наприклад як у випадку з екстракцією);
- економічна привабливість.

Найчастіше полісахариди одержують шляхом осадження органічними розчинниками, такими як етиловий спирт (96 %), ізопропіловий спирт, ацетон. Експериментальним шляхом було доведено, що за допомогою органічних

розчинників спостерігається значний вихід полісахаридів, а застосовані методи не є складними [245, 246].

Проте, наразі існує низка проблем, що можуть обмежувати використання розчинників, як єдиного універсального методу.

По-перше, дороговизна реагентів (наприклад, 1 л. ізопропілового спирту коштує 31,60 грн). До прикладу, за методом № 1, необхідно використовувати великі об'єми реагенту (еквівалентно об'єму культуральної рідини або ж у двічі більше). З урахуванням виходу культуральної рідини у 84,3 л. (з урахуванням втрат), матимемо потребу у великому об'ємі органічного розчинника (навіть з урахуванням втрат культуральної рідини під час підготовчих етап – відділення біомаси).

Варто також враховувати, що за умови проведення неякісного проведення першого осадження, виникає необхідність додаткового циклу (двоступінчастий процес осадження), що у свою чергу призведе до додаткових економічних затрат [254, 255].

По-друге, усі розчинники є вогнебезпечними та отруйними речовинами; тяжкість впливу розчинників на здоров'я персоналу напряду залежить від їх хімічної будови. Зокрема ацетон, етанол, ізопропіловий спирт – можуть впливати на всі системи організму, подразнювати слизові оболонки, призводити до хімічних опіків та алергічних проявів на шкірі. Зокрема опіків внутрішніх органів, а за постійного вдихання їх парів – викликати гострі та хронічні запалення дихальної системи. У зв'язку з цим увесь персонал задіяний у виробництві, повинен мати особисті засоби індивідуального захист за умови контакту з розчинниками.

По-третє, наразі актуальною у світовій практиці є проблема утилізації відходів виробництва за умови використання органічних розчинників. Тому деякі підприємства звертаються за допомогою до спеціалізованих компаній з цією метою. Важливо, що утилізація стічних вод повинна бути безвідходною та безпечною як для людини, так і для навколишнього середовища. Органічні

розчинники – токсичні, активні, а більшість з них пожежо- та вибухонебезпечні; їх випари (леткі речовини) завдавати значної шкоди екосистемі у цілому.

Тому, актуальним рішенням є *виділення β -глюкану завдяки зміні фізико-хімічних параметрів*, а саме на зміні рН, що призводить до осадження полісахариду без застосування органічних розчинників. Для цього обирають розчин лугу NaOH (6 %), яким надалі доводять кислотність до рН = 12,0.

Зміну розчинності можна досягнути або шляхом підтримання сталості іонної сили розчину, або ж шляхом варіювання значень температури чи рН. Зміна рН привертає увагу як промисловий метод осадження, оскільки вартість реагентів в цьому випадку невелика. Враховуючи, що розчин NaOH (6 %) використовується лише як титрувальний агент (для доведення рН у задані межі), витрати цього розчину будуть не такими значними, у порівнянні з використанням органічних розчинників (2 мл титрувального агента на 1 літр супернатанту). Тому економічні затрати будуть меншими у порівнянні з іншими приведеними двома методами осадження [246, 215].

Зважаючи на структуру цільового продукту, і те що β -глюкан є нейтральним полісахаридом, використання солей – недоцільно, оскільки при додаванні солей до супернатанту не спостерігатиметься зміна розчинності β -глюкану, а отже, полісахарид не осяде, а його виділення подальшим центрифугуванням стане неможливим. Для більш наочного розуміння плюсів та мінусів усіх методів осадження β -глюкану – формуємо табл. № 10.

Проаналізувавши інформацію представлену у табл. № 10, найбільш раціональним є вибір осадження з допомогою високих значень рН.

Обґрунтування методу відділення осаду β -глюкану

Для відділення утвореного осаду β -глюкану від розчину, необхідним є повторне проведення процесу центрифугування.

Таблиця № 10 – Способи осадження β -глюкану

№ п/п	Спосіб	Стисла характеристика (переваги, недоліки)
1	Осадження за використання орг. розчинників	- Економічно не вигідно в масштабах промислового виробництва; - можуть негативно впливати на самопочуття персоналу, задіяного на виробництві; - проблема утилізації відходів при використанні органічних розчинників.
2	Осадження за рахунок зміни фіз-хім. параметрів (pH=12,0)	- Економічно вигідно, оскільки кількість використовуваного реагента – невисока, порівняно з іншими методами - екологічно безпечний спосіб осадження β-глюкан.
3	Осадження за допомогою солей	- Зважаючи на хімічні властивості β-глюкану, використання даного способу є неефективним (зміна розчинності не спостерігатиметься і полісахарид не осяде)

Отримання полісахариду- β -глюкану із застосуванням методу фільтрації, не є раціональним за рахунок пролонгації процесу фільтрування, яке може призвести до втрати полісахаридом в'язкості, стійкості до фізичних факторів та деяких інших специфічних фізико-хімічних властивостей.

Центрифугування, у цьому випадку, є більш якісним та швидшим методом повного відділення осаду β -глюкану, а також забезпечує більш повне очищення полісахариду від баластних речовин, котрі можливо можуть бути присутніми у супернатанті.

Використання центрифуг осаджувального типу можливе, проте дане обладнання не забезпечує повного відділення осаду від фугату. Під час центрифугування фугат може незначною мірою забруднюватись осадом, і якщо використовувати цей тип обладнання, то значна частина β -глюкану вийде з апарату разом із фугатом, тобто втрати під час процесу його відділення, будуть значними.

Для відділення β -глюкану доцільніше використати фільтруючу центрифугу періодичної дії з ножовим вивантаженням осаду. **Переваги** – повна автоматизація процесу, висока ефективність розділення фугату й промивка осаду, а також

усунення непродуктивних витрат часу та енергії, що пов'язані із зупинкою або гальмуванням барабана для розвантаження. **Недоліки** – подрібнення осаду під час знімання його ножем.

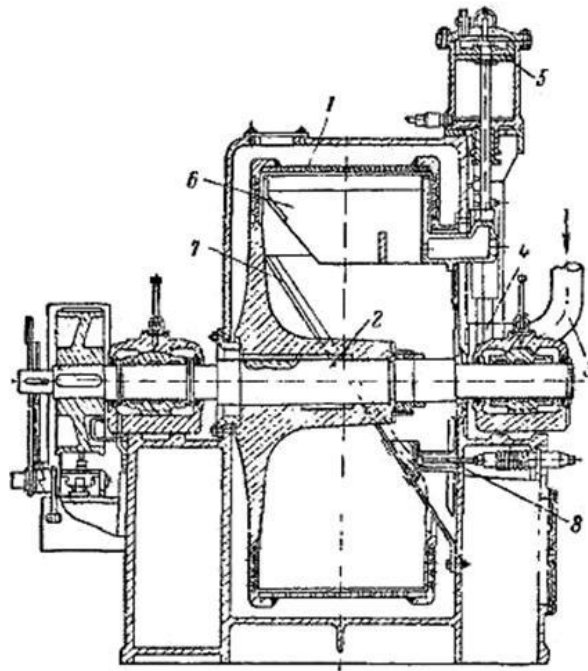


Рисунок № 5 – Фільтруюча горизонтальна центрифуга з автоматичним вивантаженням осаду:

1 – барабан; 2 – горизонтальний вал; 3 – труба для подачі суспензії;
4 – клапан; 5 – масляний циліндр; 6 – ніж; 7 – жолоб; 8 – пневматичний молоток.

Основними перевагами таких центрифуг є:

- універсальність, можливість обробки широкого діапазону суспензій;
- невибагливість та простота в експлуатації (надійна конструкція);
- можливість вбудовування в автоматичні системи очищення, всі стадії процесу відділення твердої фази і фільтрації можуть проходити в автоматичному режимі з заданими параметрами, при цьому забезпечується постійна швидкість обертання ротора;
- безпечність застосування у вибухонебезпечних приміщеннях та за підвищеної вологості;
- забезпечення високої якості очищення твердої фракції;
- висока продуктивність [256];

Отже, для відділення осаду β -глюкану з супернатанту, доцільно використовувати метод центрифугування із застосуванням фільтруючої центрифуги з ножовим (автоматичним) вивантаження осаду.

Обґрунтування процесу висушування β -глюкану

За потреби процес сушіння використовують у якості проміжного процесу для одержання препаратів із високим ступенем очищення.

Існує декілька різних методів сушки в залежності від: напрямку руху матеріалу сушіння та сушильного агента, виду сушильного агента, виду об'єкта сушіння, режиму роботи, а також конструктивних особливостей.

β -глюкан, відповідно до АНД, повинен мати вологість – 2% (вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{\text{гп}}$ не менше 98 %). Тому етап сушіння є дуже важливим [257, 258].

Порівняльна характеристика сушарок біотехнологічних виробництв – відображена у табл. № 10.

Проаналізувавши таблицю 2.5, можна зробити наступні висновки:

Зважаючи на потужність виробництва β -глюкан (873,6 г/рік), економічно недоцільним є використання саме контактної сушки. Окрім того за використання даного типу сушарок, важко досягнути необхідного відсоткового вмісту сухих речовин [256, 257].

Використання сублімаційної сушки (принцип роботи цієї сушки полягає в тому, що попередньо заморожений цільовий продукт підігрівається, створюється вакуум і матеріал висушується при температурі 15 °С; відбувається перехід з твердої фази продукту одразу у суху, минуючи рідку фазу, при цьому) за теплоенергетичними показниками є вигідним, але витрати на побудову цієї сушарки є економічно недоцільними для виробництва β -глюкану. Цей вид сушарок використовують для сушіння термолабільних сполук у набагато більших об'ємних потребах, ніж вони є доцільними для полісахариду [215].

У сушарці з киплячим шаром матеріал укладений на решітку, через яку продувається сушильний агент зі швидкістю, котра є необхідною для створення киплячого шару. У цій сушарці, для усунення нерівномірності сушіння,

застосовується спрямований рух матеріалу уздовж утримуючої його решітки. Для цього подача сирого матеріалу проводиться у верхню частину з одного боку сушарки, а видалення сухого матеріалу – з нижньої, з протилежного боку установки.

Для матеріалів, малочутливих до нагрівання, застосовуються дво- і трисекційні східчасто-протиточні сушарки з киплячим шаром. **Переваги:** інтенсивність сушіння, здійснення процесу за високих температур, висока ступінь використання тепла сушильного агента, можливість автоматичного регулювання параметрів процесу. **Недоліки:** великі витрати електроенергії для створення значних тисків необхідних для кипіння шару, а також подрібнення частинок матеріалу у сушарці [240, 256].

Таблиця № 10 – Порівняльна характеристика основних видів сушарок

№ п/п	Вид сушарки	Стисла характеристика	Переваги	Недоліки
1	Контактна	Нагрів шляхом безпосереднього контакту з нагрітими матеріалами	Простота та доступність апаратурного оформлення. Економічні затрати на використання даної сушарки мінімальні	Можливість використання лише для малотоннажних виробництв. Відносно низька ефективність висушування, оскільки досягти необхідного значення вмісту вологи в готовому продукті практично неможливо
2	Сублімаційна	Попередньо заморожений цільовий продукт підігрівається, створюється вакуум і матеріал висушується при температурі 15 °С	За теплоенергетичними показниками використання даної сушарки є вигідним	Значні економічні затрати на апаратурне оформлення, які є не виправданими для виробництва β-глюкан
3	Конвективна: сушарка з киплячим шаром розпилювальна сушарка	Вологий матеріал приводиться до розпушеного стану потоком гарячих димових газів, які подаються під тиском з-під опорної решітки.	Висока ефективність висушування. Можливість оптимізації процесу шляхом автоматичного регулювання	Значні витрати електроенергії. Погіршення товарного вигляду
		Швидке розпилювання матеріалу та інтенсивне сушіння завдяки миттєвому контакту з теплоагентом	Висока ефективність та продуктивність висушування. Збалансована витрата електроенергії	Складність апаратурного оформлення. Необхідність додаткового очищення тепло агента (повітря)

У розпилювальних сушарках досягається висока інтенсивність випаровування вологи за рахунок тонкого розпилення висушуваного матеріалу в сушильній камері, через яку рухається сушильний агент. При сушінні в розпиленому стані питома поверхня випаровування сягає настільки великої величини, що процес висушування завершується надзвичайно швидко (приблизно 15...30 с). В умовах майже миттєвої сушки температура поверхні частинок матеріалу, незважаючи на високу температуру сушильного агента (близько 180...200 °С), лише трохи перевищує температуру адіабатичного випаровування чистої рідини. Як результат отримуємо швидку сушку в м'яких температурних умовах, що дозволяє отримати якісний порошкоподібний продукт, що є добре розчинним та не вимагає подальшого подрібнення. Можливою є також сушка і з холодним теплоносієм, коли розпилювальний матеріал попередньо нагрівається. Розпилення здійснюється механічними й пневматичними форсунками, а також за допомогою відцентрових дисків (швидкість обертання 4000...20000 об/хв). Продуктивність процесу – висока, інтенсивність висушування – значна. Як результат маємо змогу видалити вологу до заданого значення без подрібнення продукту та уникнути значних витрат електроенергії для створення тиску (з метою виникнення кипіння шару) [253, 259].

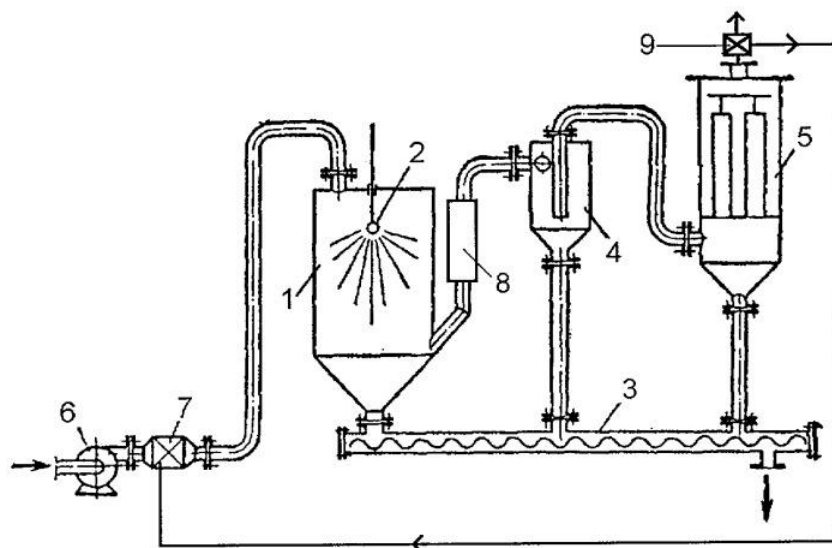


Рисунок № 6 – Сушарка конвективна розпилювального типу:

- 1 – сушильна камера; 2 – розпилюючий механізм; 3 – шнек; 4 – циклон;
5 – фільтр; 6,7 – топка; 8 – акустична установка; 9 – рециркуляційний клапан.

Отже, для сушіння β -глюкану, з метою одержання вже готової товарної форми, доцільно використати конвективну сушарку розпилювального типу.

Обґрунтування необхідності проведення етапу розведення та нейтралізації осаду β -глюкану

Осад, який одержують після останнього центрифугування містить 65% вологи, що унеможливило використання розпилювальної сушарки для одержання готової форми цільового продукту (вміст вологи повинен бути в межах 80...85%). Але розпилювальна сушарка є найпродуктивнішим методом висушування. Окрім того вміст СР в готовому продукті повинен бути не менше ніж 98%, а досягти такий ступінь висушування можливо лише за використання розпилювальної сушарки.

Саме тому необхідно збільшити вміст вологи в осаді перед тим як подавати його на розпилювальну сушарку. β -глюкан легко розчиняється у воді, тому для збільшення вмісту вологи, перед подачею на етап висушування, можна використати розведення осаду в очищеній воді. Для зменшення концентрації СР необхідно приготувати розчин з одержаним осадом в об'ємі 20 л (збільшити вологість на 20 %). Об'єм збірника для розведення становитиме 25 л.

Беручи до уваги обраний метод осадження полісахариду, а саме варіювання значень кислотності (рН) за рахунок його підвищення до значення рН = 12,0, важливою є нейтралізація осаду переж технологічним етапом висушування.

Це пояснюється тим, що осад β -глюкану, який одержують після останнього центрифугування, має рН = 12,0. Це значення є занадто високим і може призвести до корозії обладнання під час подальших етапів одержання готового продукту, а також є ризик погіршення фізико-хімічних властивостей полісахариду, що призведе до виникнення проблем з цільовим використанням останнього [253, 259].

Обґрунтування стадії пакування цільового продукту

При виборі упаковки необхідно обов'язково враховувати властивості самого ЦП та важливі умови його зберігання. Тара повинна захищати ЦП від пошкоджень, сприяти безпечному транспортуванню, збереженню та його подальшій реалізації. Для упаковки порошку β -глюкану використовуємо

поліетиленові пакети (мають непроникність вологи, повітря – дозволяють зберігати властивості продукту, є зручними для транспортування), адже зберігання отриманого ад'юванта не передбачає великих часових проміжків та одразу шнековим транспортером направляються на групову упаковку (крафт-коробки) й потім на лінію отримання вакцини проти ВПГ-2 (за наявності такої).

РОЗДІЛ 4. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ β -ГЛЮКАНУ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)*
Д-1 Д-7	Дозатор	1	—
З-3	Збірник вертикальний для культуральної рідини	1	Збірники вертикальні, виробник Стройторгсервіс, робочий об'єм: 250 л. Оснащений перемішуючим пристроєм та сорочкою, матеріал – нержавіюча сталь, швидкість перемішування 100...500 об/хв
М-2 М-12	Мірник вертикальний для приготування розчину гідроксиду натрію	2	Мірники вертикальні, виробник Стройторгсервіс, робочий об'єм: 30, 50 л, матеріал – нержавіюча сталь
З-6 З-10	Збірник вертикальний для супернатанту	2	Збірники вертикальні, виробник Стройторгсервіс, робочий об'єм: 200 л. Оснащений перемішуючим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь, швидкість перемішування – 100...500 об/хв
НВ-4 НВ-8 НВ-13 НВ-16 НВ-21 НВ-24	Насос	6	Насос відцентрового типу. Матеріал – нержавіюча сталь, швидкість перемішування 100...500 об/хв
Ц-5 Ц-9	Центрифуга	2	Центрифуга горизонтальна безперервної дії із шнековим вивантаженням осаду (осаджувального типу) ОГШ-63, виробник Ekomash Nauchno-Tekhnicheskij Centr, Харків. Продуктивність 6 м ³ /год, 2,5 м ³ /год, частота обертів 39,8 с ⁻¹ , граничне навантаження 4 кг

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ									
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата										
Розробив(ла)		Белемєць Т.О.			РОЗДІЛ 4 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ β-ГЛЮКАНУ				Літ.		Арк.		Акрушів	
Консультант													223	
Керівник		Красінько В.О.							Кафедра БТМ					
Н. Контр.														
Зав. Каф.		Стабніков В.П.												
					116									

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика(виробник)*
3-15 3-17	Збірник вертикальний для супернатанту	2	Збірники вертикальні, виробник Стройторгсервіс, робочий об'єм: 25 л. Оснащений перемішуючим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь, швидкість перемішування 100...500 об/хв
Ц-14	Центрифуга	1	Центрифуга горизонтальна періодичної дії із ножовим вивантаженням осаду ФГН-90, виробник Ekomash Nauchno-Tekhnicheskij Centr, Харків. Поверхня фільтрування 1,12 м ² , частота обертів 25 с ⁻¹ , граничне навантаження 140 кг
Ф-19	Ультрафільтраційна установка	1	Діаметр пор 25 нм
Ф-22	Ультрафільтраційна установка	1	Діаметр пор 6 нм
3-20 3-23	Збірник вертикальний для супернатанту	1	Збірники вертикальні, виробник Стройторгсервіс, робочий об'єм: 25 л. Оснащений перемішуючим пристроєм, матеріал – нержавіюча сталь, швидкість перемішування 100...500 об/хв
С-25 (Ц-30, Б-31, Ш-32)	Сушарка	1	Сушарка розпилювальна прямооточна, з конічним днищем, з відцентровим розпиленням СРЦ-3,2/24 об'ємом 24 м ³ , виробництво Калинівський машинобудівний завод, Вінниця. Діаметр 3,2 м, висота циліндричної частини 3 м
ПЗ-26	Повітрозабірник	1	Обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень.
Ф-27	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтруючий матеріал – волокнистий, Е = 80 %, швидкість фільтрування – 0,1 м/с
В-28	Вентилятор	1	Вентилятор відцентровий АДВ-450 (Харків), максимальна потужність 4 500 м ³ /год, частота обертів 1 500 хв ⁻¹ , 15 кг
К-29	Калорифер	1	Паровий калорифер, виробництва ТОВ «Спецпроменерго-1», Черкаси. Витрата повітря 2000 м ³ /год, робочий тиск не більше 1,2 МПа, габарити 130 × 650 × 450
ФМ-34	Напівавтомат для пакування	1	Напівавтомат для фасування сипких матеріалів, виробництва «Технолог», Харків. Пакувальний матеріал – поліетилен, маса продукту для пакування 2 кг,

Примітка: представлений пошук обладнання для етапу виділення полісахариду – здійснено за використання наступних електронних ресурсів:

1. <https://stprom.com.ua/ua/p1016672395-sbornik-dlya-hrneniya.html> (збірник вертикальний для культуральної рідини);
2. <https://wise-master.com.ua/ua/g24447793-emkosti-nerzhavyuschie> (мірник вертикальний для приготування розчину гідроксиду натрію);
3. <https://stprom.com.ua/ua/p1016672395-sbornik-dlya-hrneniya.html> (збірник вертикальний для супернатанту);
4. <https://dalgakiran.ua/uk/products/vidcentrovi%C2%ADnasosy> (насос відцентрового типу);
5. <https://frunze.com.ua/wp-content/uploads/2023/06/Tsentryfuhy-ua-2023-06.pdf> (центрифуга ОГШ-63);
6. <https://stprom.com.ua/ua/p1016672395-sbornik-dlya-hrneniya.html> (збірник вертикальний для супернатанту);
7. <http://snpo.ua/produksiya/tsentrifugi/tsentrifugi-filtruyuchi-ta-osadzhuvalni-z-nozhovim-vivantazhenyam-osadu-tipu-fgn-i-ogn/> (центрифуга горизонтальна періодичної дії із ножовим вивантаженням осаду ФГН-90);
8. <https://prom-nasos.pro/ua/catalog/engineering/filtration-plants/ultrafiltration-microfiltration/flowmem-025-ultraf-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-plastinchastimi-membranami> (ультрафільтраційна установка, діаметр пор 25 нм);
9. <https://prom-nasos.pro/ua/catalog/engineering/filtration-plants/ultrafiltration-microfiltration/flowmem-025-ultraf-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-plastinchastimi-membranami> (ультрафільтраційна установка, діаметр пор 6 нм);
10. <https://wise-master.com.ua/ua/p730702549-himicheskij-reaktor-sbornik.html> (збірник вертикальний для супернатанту);
11. <https://www.kmbp.com.ua/produksiya/rishennia-dlia-molochnoi-promyslovosti/sushilni-ustanovki> (сушарка);
12. <https://dani.org.ua/komplektuiuchi/povitrozabirnyk-dani-v3-12-1/> (повітрязбірник);
13. <https://kvantum.com.ua/ua/catalog/filtr-gruboy-ochistki-vozdukha-g4-dlya-tion-3s-4s.html> (фільтр грубої очистки. Фільтруючий матеріал – волокнистий);
14. <https://agrotehkom.ua/shop/radialnyj-ventiljator/> (вентилятор відцентровий ADW-450 (Харків);
15. <https://kaloriferu.com.ua/ua/p13398713-kalorifer-vodyanoj-ksk.html> (паровий калорифер, виробництва ТОВ «Спецпроменерго-1», Черкаси);
16. <https://technowagy.com.ua/products/avtomat-dlya-upakovki-sypuchih-produktov-v-sashe-paket/> (напіваавтомат для фасування).

**РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ
ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ β -ГЛЮКАНУ
ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ
ТП 1. Відділення біомаси**

ТП 1.1. Нейтралізація культуральної рідини

У збірник (З-3), геометричний об'єм якого складає 200 л, з культуральною рідиною, самопливом вносять 6 % розчин NaOH. Об'єм титрувального агенту становить 24 л. Включають мішалку та перемішують культуральну рідину (швидкість перемішування 100 об/хв). Перевіряють значення рН (рН = 7,0).

ТП 1.2. Підігрівання культуральної рідини

Підігрівають культуральну рідину до температури 80 °С, подачею глухої пари у сорочку збірника, витримують 30 хв. Мішалку не виключають (швидкість перемішування залишається 100 об/хв).

ТП 1.3. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина (від ТП 1.2) перекачується за допомогою шестеренчастого насосу (НШ-43) на горизонтальну центрифугу безперервної дії із шнековим вивантаженням осаду ОГШ-63 (Ц-5). Процес центрифугування здійснюються при наступних технологічних параметрах: 2 400 об/хв, упродовж 2 год. Осад передають до збірника (З-6) для осадження оксалату.

ТП 2. Відділення оксалату

ТП 2.1. Осадження оксалату

У збірник (З-6) об'ємом 50 л із біомасою (від ТП 1.3) вносять через об'ємно-ваговий дозатор CaCl_2 у кількості та додають очищену воду. Включають мішалку та перемішують вміст збірника (швидкість перемішування 100 об/хв).

ТП 2.2. Відділення осаду оксалату кальцію

Суміш з осадом оксалату кальцію (від ТП 9.1) перекачують за допомогою відцентрового насосу (НВ-8) на центрифугування за допомогою горизонтальної

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив(ла)	Белемєць Т.О.				РОЗДІЛ 5 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ β -ГЛЮКАНУ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консультант								223
Керівник	Красінсько В.О.					Кафедра БТМ 119		
Н. Контр.								
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

центрифуги безперервної дії із шнековим вивантаженням осаду ОГШ-63 (Ц-9). Центрифугують за технологічних параметрів: 2400 об/хв, упродовж 4 год. Супернатант (фугат) 40 л передають до збірника (З-10) для осадження β -глюкану. Осад оксалату кальцію передають до ЗВ 8.2.

ТП 3. Виділення β -глюкану

ТП 3.1. Осадження β -глюкану

У збірник (З-10) об'ємом 50 л із фугатом (від ТП 2.2) самопливом вносять титрувальний агент – 6 % розчин NaOH, об'єм розчину – 3,6 л. Включають мішалку та перемішують супернатант (швидкість перемішування 100 об/хв). Перевіряють значення рН (рН = 12,0).

ТП 3.2. Відділення осаду β -глюкану

Розчин із осадом β -глюкану (від ТП 10.1) перекачують за допомогою відцентрового насосу (НВ-13) на фільтрувальну центрифугу періодичної дії із ножовим вивантаженням осаду ФГН-90 (Ц-14). Центрифугують за наступних параметрів: 1500 об/хв, 8 год. Осад β -глюкану масою 5,72 кг переносять у збірник (З-15) для нейтралізації та розведення. Фугат подають до ЗВ 8.2.

ТП 4. Нейтралізація і розведення осаду β -глюкану

ТП 4.1. Нейтралізація та розведення

Осад з центрифуги вручну вивантажують і через люк вносять у збірник (З-54) об'ємом 25 л та додають 14,88 л очищеної води. Включають мішалку та перемішують вміст збірника. Далі вручну через люк апарату вносять 8 л 6 % розчину HCl, перевіряють рН (рН = 7,0) та вологість (85 %). Розчин подають на ТП 5.1. за допомогою відцентрового насосу (НВ-16).

ТП 5. Очищення β -глюкану

ТП 5.1 Екстрагування супутніх речовин β -глюкану

Нейтралізований та розведений осад β -глюкану подають насосом (НВ-17) у реактор (Р-17), сюди ж зі збірника подають 3 % NaOH. Вмикають перемішувач, перемішують вміст упродовж 60 хвилин.

ТП 5.2 Ультрафільтрація

З реактора (Р-17) насосом (НВ-18) вміст подають на ультрафільтраційну установку (Ф-19) (з діаметром пор не менше 25 нм).

ТП 5.3 Осадження β -глюкану

З ультрафільтраційної установки (Ф-19) фільтрат подають до збірника (З-20) куди подають 2М розчину НСІ. Вміст реактора (З-20) перемішують, за допомогою перемішувального пристрою, упродовж 1 год.

ТП 5.4 Обробка β -глюкану розчином соляної кислоти з зимоліазою

До реактора (З-20) подають розчин НСІ з зимоліазою, для додаткового очищення полісахариду. Швидкість обертів мішалки W – 100 об/хв., упродовж 1 год.

ТП 5.5 Ультрафільтрація

З реактора (З-20) насосом (НВ-21) вміст подають на ультрафільтраційну установку (Ф-22), з діаметром пор 6 нм (до ТП 11). Отриманий супернатант (розчин з осадом β -глюкану) відправляють на подальше висушування до ТП 6.1.

ТП 6. Висушування β -глюкану

ТП 6.1. Висушування β -глюкану

Розведений розчин з осадом β -глюкану (попередньо додана вода очищена) від ТП 5.5, перекачують за допомогою відцентрового насосу (НВ-24) на розпилювальну сушарку СРЦ-3,2/24 (С-25) об'ємом 24 м³, яка має діаметр 3,2 м і висоту циліндричної частини 3 м. Повітря подається у повітророзподільний пристрій сушильної камери. Після сушіння одержують готовий висушений β -глюкану із вмістом вологи не більше ніж 2 %, а також відпрацьоване повітря, яке подається через циклони (Ц-30) на фільтри грубого і тонкого очищення, до ЗВ 7.1. Регламентований час сушіння – 24 годин. Кінцева вологість матеріалу – 2 %. Температура на вході нагрівального агента (повітря) – 180 °С. Після завершення процесу сушіння одержують 257 кг β -глюкану. Висушений продукт по шнековому транспортеру (Ш-32) переходить на стадію пакування (ФМ-33).

ПМВ 7. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 7.1. Первинна упаковка готового продукту

Сухий продукт β -глюкану упаковують у поліетиленові пакети. Фасувальний напівавтомат (ФМ-33) фасує продукт у первинну упаковку, маса β -глюкану для фасування 2,52 кг. Об'єм 1 дози – 0,22 кг.

Фасувально-пакувальна установка забезпечує формування тришовного пакета «єврошвом», з подальшим проставленням необхідної інформативної характеристики: назви продукту, дати, маси, умов зберігання та автоматичним дозуванням сипкого продукту.

Продуктивність установки – 5 пакет/хв., маса дози – 0,2 кг, матеріал упаковки – поліетилен, тип пайки поліетиленової стрічки – імпульсний. Далі за допомогою шнекового транспортеру поліетиленові пакети з β -глюканом транспортуються на групову упаковку у крафт коробки.

ПМВ 7.2. Групова упаковка β -глюкану у крафт-коробки

Поліетиленові пакети з β -глюканом (від ПМВ 6.1) за допомогою шнекового транспортеру подаються на групову упаковку. Пакети вручну упаковують у крафт-коробки по 4 штуки у кожну. Коробки заклеюють за допомогою клейкої стрічки й відправляють на склад готової продукції.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження газоподібних викидів

Для знешкодження газоподібних викидів використовують декілька методів:

- каталітичне спалювання відпрацьованого повітря за рахунок його прокачування за $t = 320...350$ °С, через комбінований каталізатор (ступінь знешкодження 87...95 %). Недолік методу – значні енергетичні затрати;

- рідкофазне окислення із застосуванням KMnO_4 або NaClO . Відпрацьоване повітря в міру проходження скрубера зрошується розчином NaClO , 20 % розчином NaOH , водою та викидається в атмосферу (ефективність очищення 90...95 %). Недолік – при реалізації накопичуються в невеликій кількості стічні води, які потрібно утилізувати; знешкодження відпрацьованого повітря шляхом прокачування його через колектор та головні фільтри

(ефективність очищення – 99 %). Найчастіше використовують саме цей метод [260].

ЗВ 8.2 Знешкодження рідких та твердих відходів

Знешкодження рідких відходів відбувається на локальних очисних спорудах, які складаються з усереднювача, реагентного господарства (використання вапна для коагуляції), первинного відстійника, аеротенка другого ступеню, вторинного відстійника, блоку знезараження. Рекомендовано для біологічного очищення встановлювати аеротенки-змішувачі. Стічна вода та активний мул в аеротенках такого типу підводяться й відводяться – рівномірно вздовж довгих баків споруди.

Основними методами знешкодження твердих промислових відходів являються:

1. біологічне окислення (для знешкодження та стабілізації осадів стічних вод на очисних спорудах);
2. термічна обробка;
3. складування у поверхневих сховищах;
4. захоронення високотоксичних речовин та їх сполук в поверхневих шарах землі.

В останній час все більшого застосування (для знешкодження та утилізації твердих промислових відходів) знаходять термічні методи їх обробки на сміття-спалювальних заводах та полігонах. Спалювання помірно та мало небезпечних твердих промислових відходів можна здійснювати в печах різної конструкції (барабанні, камерні, із зваженим шаром та ін.) [261].

РОЗДІЛ 6. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що контролюється	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт Кх 8.1 Нейтралізація культуральної рідини	Культуральна рідина, рН, швидкість перемішування	рН метр датчик рН, тахометр	рН визначають після внесення гідроксиду натрію, швидкість перемішування під час проведення операції	$\text{pH} = 7,0$ $\omega = 100 \text{ об/хв}$
Кт 8.2 Підігрівання культуральної рідини	Культуральна рідина, температура КР, час, швидкість перемішування	Датчик температури, годинник	Під час проведення операції	$t = 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $\tau = 30 \text{ хв}$ $\omega = 100 \text{ об/хв}$
Кт, 8.3 Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина, кількість обертів, час	Годинник, тахометр	Під час проведення операції	$\omega = 2400 \text{ об/хв}$ $\tau = 2 \text{ год}$
Кт 9.1 Осадження оксалату	Супернатант, оксалату кальцію, швидкість перемішування	Тахометр	Під час проведення операції	$\omega = 100 \text{ об/хв}$
Кт 9.2 Відділення осаду оксалату	Супернатант, кількість обертів, час	Годинник, тахометр	Під час проведення операції	$\omega = 2400 \text{ об/хв}$ $\tau = 4 \text{ год}$
Кт Кх 10.1 Осадження β -глюкану	Супернатант, гідроксид натрію, швидкість перемішування, рН	Тахометр, датчик рН	Під час проведення операції	$\omega = 100 \text{ об/хв}$ $\text{pH} = 12,0$

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ				Літ.	Арк.	Акрушів		
Розробив(ла)	Белемєць Т.О.											223	
Консультант									Кафедра БТМ 124				
Керівник	Красінько В.О.												
Н. Контр.													
Зав. Каф.	Стабніков В.П.												

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що контролюється	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
К_т 10.2 Відділення осаду β-глюкану	Супернатант, кількість обертів, час	Годинник, тахометр	Під час проведення операції	$\omega = 1500$ об/хв $\tau = 8$ годин
К_т К_х 11.1 Нейтралізація та розведення осаду β-глюкану	Осад β-глюкану, 6% розчин соляної кислоти, швидкість перемішування, вологість, рН	Ваги-вологімири, тахометр, датчик рН	рН визначають під час нейтралізації. Вологість після проведення операції	рН = 7,0 $\omega = 50$ об/хв W = 85 %

Визначення вологості в готовому продукті

Визначення вологості можна провести декількома способами:

1. Гравіметричний метод. Перед початком вимірів, два пронумерованих відкритих бюкса на 25 мл (чи 15 мл) разом із кришками – поміщають в сушильну шафу та витримують за $t = 105$ °С, $T = 4$ год. Після закінчення даного етапу сушіння, бюкси переносять в ексикатори з CaCl_2 і залишають для охолодження $T = 40$ хв. Надалі бюкси зважують використовуючи аналітичні ваги й знову висушують $T = 1$ год. в сушильній шафі, дають остигнути та зважують. Повторювати дану процедуру необхідно поки вага бюксів буде доведена до сталого значення (точність $\pm 0,0003$ г).

У доведені до постійної маси бюкси помішають наважку осаду β-глюкану (0,4-0,5 г) та зважують на аналітичних вагах. Відкриті бюкси з наважкою полісахариду поміщають у сушильну шафу й залишають висувуватись $T = 2$ год., $t = 105$ °С. По закінченню часу експозиції, бюкси з наважками закривають кришками, переносять в ексикатор з CaCl_2 , залишають охолоджуватись до кімнатної температури $T = 40$ хв., а потім зважують. Повторювати експеримент, висушуючи зразок полісахариду- β-глюкану, необхідно до постійної ваги (з точністю $\pm 0,001$ г).

Вміст води розраховують згідно формули:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100\%, \quad (1)$$

де: m_1 – вага бюкса з β -глюканом до висушування (г), m_2 – вага бюкса з β -глюканом після висушування (г), m – вага доведеного до постійної маси бюкса (г).

Важливо врахувати, що розходження між паралельними визначеннями, не повинно перевищувати 0,2 %. За кінцевий результат беруть середнє арифметичне з дослідів, округлене до 0,1 % [262].

Вміст води визначають перед проведенням висушування, а також після висушування для перевірки якості готового продукту. До висушування вміст води в полісахариді повинен бути 85 %. А після висушування вміст води в готовому продукті (β -глюкані) повинен бути не більше ніж 2 % [263].

2. Експрес – метод (з використанням ІЧ-променів). Для швидкого видалення води використовують сушіння в інфрачервоних променях, які сприймаються не тільки поверхнею, але й проникають в продукт на глибину до 2...3 мм, що зумовлює його інтенсивне прогрівання.

Одним із джерел інфрачервоних променів можуть бути нагріті металеві поверхні. На цьому принципі працює прилад Чижової (рис. № 7), який складається з двох масивних металевих плит (сплав алюмінію та чавуну) круглої форми, між якими розміщується тонкий шар матеріалу, котрий висушується. Плити з'єднані між собою шарніром і нагріваються електричними елементами, розміщеними зовні сторін приладу – забезпечує швидке зневоднення продукту. Під час роботи відстань між плитами складає 2 мм, а температура контролюється двома ртутними термометрами (нагрівання плит може бути сильним і слабим). Сильне нагрівання використовується у випадку першопочаткового нагрівання, а слабке – для підтримання необхідної температури (для перемикання режиму нагрівання використовують спеціальний перемикач). Контактний термометр забезпечує сталість заданої температури у межах $\pm 1^\circ\text{C}$.



Рисунок № 7 – Прилад Чигової:

де, а – схематичне зображення приладу (1 – металеві плити; 2 – термометри, вставлені у гільзу); б – цифровий прилад; в – сучасний аналог приладу.

Висушують об'єкт дослідження (полісахарид) у пакетах трикутної (для приладу круглої форми) або прямокутної форм (для приладу прямокутної форми).

При виготовленні пакетів прямокутної форми, лист паперу (газетного) форматом 20×14 згинають навпіл, а відкриті з трьох боків краї пакету, загинають на 1,5 см (рис. № 8). Розмір готових пакетів $8,5 \times 11$ см. Для виготовлення пакетів трикутної форми – папір форматом 15×15 см згинають по діагоналі, а відкриті краї загинають на 1,5 см.

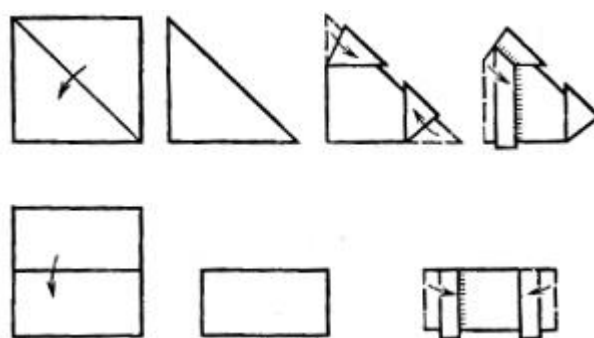


Рисунок № 8 – Схема виготовлення паперових пакетів для приладу Чигової

Для визначення масової частки води в продукті (β-глюкані) – попередньо виготовляють 2 паперові пакети, які просушують за використання приладу

Чижової $t = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T = 3\text{ хв.}$, охолоджують в ексікаторі $T = 3\text{ хв.}$ та зважують. Далі їх розкривають й поміщають в них наважки по 5 г кожна (з відхиленням не більше 0,01 г – проводять два паралельних визначення). Пакети закривають й розміщують у приладі для висушування за $t = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T = 4\text{ хв.}$ Після висушування пакети охолоджують в ексікаторі, зважують та за різницею мас наважки до і після висушування, розраховують масову частку води. Розбіжність між трьома паралельними визначеннями не повинна перевищувати 1 % [264].

Визначення води за допомогою ваг-вологемірів ADS. Даний метод застосовують задля швидкого й точного аналізу продукції на масову частку води у лабораторіях, в процесі виробництва для контролю якості продукції. Метод базується на висушуванні зразка ІЧ-променями.

Ваги-вологеміри – це аналізатори вологості (рис. № 9), які поєднують у собі ваги з функцією вимірювання вологості. Використовуються такі аналізатори у випадках, коли необхідно швидко й точно виміряти наявність води в різноманітних матеріалах в лабораторних умовах та на виробництві. Ваги-вологеміри складаються з лабораторних ваг 3-го класу точності за ГОСТом та вбудованим над ними пристроєм для сушки (галогенові або ІЧ-лампи). Така конструкція дає можливість використати вологемір у якості традиційних лабораторних вагів, а також як пристрій для визначення вмісту води.



Рисунок № 9 – Ваги-вологеміри

Завдяки вагам (рис. № 9) можна визначити масу зразка матеріалу, який знаходиться на шальці. Сушарка зчитує результати вимірів ваги; здійснює процес сушіння зразка, вираховує та висвітлює на цифровому індикаторі кінцевий результат (вологість матеріалу). Для виміру вологості, зразок слід помістити на шальці одноразового використання, яка далі вкладається у камеру вагосушарки. Зразок повинен наноситися рівномірним шаром 2 мм, що відповідає масі 5 г.

Перед початком процедури визначення масової частки вологи необхідно:

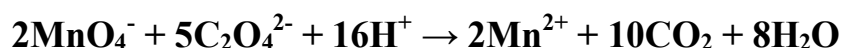
- встановити необхідні режими та параметри процесу сушіння (M);
- встановити на ваги порожню одноразову шальку;
- відтарувати ваги з порожньою одноразовою шалькою натисненням кнопки [T/ON];
- вийняти одноразову шальку та покласти на неї підготовлений зразок полісахариду;
- поставити шальку зі зразком на вантажоприймальну триногу, закрити кришку сушарки та натиснути кнопку [O], при цьому на індикаторі висвітлюються значення пункту меню «Стан роботи ваг»;
- повторно натиснути кнопку [O] сушарки, на індикаторі висвічуються: номер режиму, час роботи, розраховане значення вологості, температура в сушильній камері;
- кінець процедури супроводжується звуковим сигналом та надписом «Кінець» на індикаторі сушарки. Значення вологості, отримане на цей момент, запам'ятовується та зберігається до натискання кнопки [C] або до запуску наступної процедури сушіння;
- роздрукування на принтері і виведення кінцевого звіту про параметри та результати процесу сушіння зразка на комп'ютері – здійснюються після натискання кнопки [O] [265].

Визначення наявності оксалатів в готовому продукті

Наявність оксалатів у готовому висушеному β -глюкані визначають за допомогою «перманганатометрії».

Індикатором є сам робочий розчин, оскільки, навіть при концентрації приблизно 10^{-5} г-моль/л, перманганат-іони здатні зафарбовувати безбарвні розчини, за умови, що в самому розчині – наявні оксалати.

Ознакою наявності оксалатів є блідо-рожеве забарвлення надлишку титранту KMnO_4 (одна крапля 0,004 моль / л розчину титранту надає помітне забарвлення 100 мл розчину), яке не зникає упродовж 30 с. Тому, якщо розчин, який титрують, безбарвний, про наявність оксалатів у ньому можна судити по появі блідо-рожевого забарвлення надлишку титранту KMnO_4 при титруванні прямим способом:



Окиснення $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ перманганатом супроводжується утворенням проміжних сполук у яких важливу роль відіграють іони Mn^{2+} . Тому інколи перед титруванням перманганату у титрований розчин рекомендують додавати солі Mn (II).

Приготування стандартного розчину KMnO_4

Титрований розчин перманганату калію за точною наважкою кристалічного препарату приготувати неможливо, так як в ньому завжди міститься певна кількість MnO_2 й інші продукти розкладання. Перед встановленням точної концентрації розчин KMnO_4 витримують в темній склянці упродовж 7...10 днів. За цей час відбувається окислення відновників, присутність яких в дистильованій воді повністю виключити не вдається (пил, сліди органічних сполук і т.д). Для прискорення цих процесів розчин перманганату калію іноді піддають кип'ятінню.

Обов'язково необхідно враховувати, що вода має окислювально-відновні властивості і може відновлювати перманганат. Ця реакція йде повільно, але MnO_2 та пряме сонячне світло – каталізують процес розкладання KMnO_4 , тому через 7...10 днів, осад MnO_2 необхідно видалити. Розчин KMnO_4 , зазвичай, обережно

зливають з осаду або фільтрують через скляний фільтр. Приготований таким чином розчин KMnO_4 не змінює титр тривалий час. Титр розчину перманганату калію встановлюють по безводному оксалату натрію $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ або дигідрату щавлевої кислоти $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$.

Реакція каталізується іонами Mn^{2+} . Перші краплі перманганату – знебарвлюються досить повільно, навіть у гарячому розчині. Під час титрування концентрація іонів Mn^{2+} – збільшується, тому й швидкість реакції – прискорюється: реакція сама собі створює каталізатор [266].

Алгоритм визначення наявності оксалат [266]:

1. у колбу для титрування поміщають 15 мл 1 моль/л розчину сульфатної кислоти та нагрівають до 80...85 °C;
2. зважують 10 г β -глюкану та поміщають у конічну колбу на 100 мл, доводять до позначки дистильованою водою;
3. піпеткою відбирають 25 мл розчину й вносять у нагрітий розчин сульфатної кислоти, надалі титрують розчином калій перманганату, додаючи титрант по краплях; якщо у досліджуваному розчині є оксалати, то навіть одна крапля калій перманганату забарвить весь розчин у блідо-рожевий колір і забарвлення не зникатиме впродовж 30 с.

Ідентифікація полісахариду- β -глюкану

Ідентифікація β -глюкану методом «АСМ» (атомносилова мікроскопія) виконували в зондовій нанолaboratorії «Прима» дослідного комплексу «ІНТЕГРА».

Для проведення досліджень наважку β -глюкану масою 10 мг розчиняли в 100 см³ $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ (диметилсульфоксиду) при кімнатній температурі $T = 24$ град., при періодичному перемішуванні. Перед нанесенням розчин полісахариду- β -глюкану нагрівали та витримували $t = 100$ °C 10 хв. Нанесення зразків на 129 (заздалегідь приготовані) кремнієві підкладки розміром 12 x 25 мм – здійснювали методом «осадження крапель». Діаметр краплі повинен становити не більше 10 мм, за

товщини шару – менше 2 мм. Після отримані зразки висушували за кімнатної температури; розчинник випаровувався природним шляхом.

Сканування на мікроскопі проводили в конфігурації «напівконтактний метод» за частоти 1 Гц, з допомогою зондового датчика типу «CSG10», використовуючи програму управління мікроскопом – «NOVA». Отримані зображення були оброблені за допомогою програмного модуля «Image Analysis» [267].

Кількісне визначення β -глюкану

Кількісне визначення β -глюкану здійснюється із застосуванням ІЧ фотометрії. Підготовкою зразку є попереднє пресування субстанції з β -глюканом у таблетку з KBr, де міститься 4 г полісахариду та 200 мг калій броміду. ІЧ-спектроскопічний аналіз здійснювали на спектрофотометрі «FTIR 8301 PC».

Аналіз (кількісний) ІЧ-спектрів проводиться за визначеннями відносної оптичної щільності, застосовуючи, при цьому, метод «базисної лінії» та «внутрішнього стандарту». У якості внутрішнього стандарту – використовується максимум смуги поглинання при 890 см^{-1} , що є характерним для глікозидних зв'язків β -конфігурації.

Індекс симетричності оцінюють по відношенню ширини високочастотної до низькочастотної частин поглинання в області $3000\text{...}3750\text{ см}^{-1}$, виміряних від середини перпендикуляра, а також проведеного через максимум смуги поглинання ОН– груп і базисну лінію. Перед аналізом, спектри попередньо обробляємо за допомогою ПЗ «Omnics 32». Задля розрахунку площі вже апроксимації кривої використовуємо ПЗ – «Origin Pro. 8.0» [267].

РОЗДІЛ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ

7.1. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Підготовка персоналу

Одним з базових принципів НВП є наявність навченого персоналу з необхідною кваліфікацією; організація й функціонування відповідної системи якості, а також належне виробництво лікарських засобів співробітниками. У зв'язку з цим виникає потреба у достатній кількості кваліфікованого персоналу для вирішення усіх завдань стосовно сфери відповідальності виробника. Саме тому: кожен співробітник повинен ясно розуміти індивідуальну відповідальність, яка завжди має бути задокументована; увесь персонал зобов'язаний знати принципи НВП, що стосуються його діяльності, а також пройти первинне й подальше навчання, у відповідності до своїх обов'язків, включаючи інструктаж із виконання гігієнічних вимог.

У НВП існують *загальні принципи* стосовного вимог до персоналу, згідно з якими його умовно підрозділяють на персонал, який приймає безпосередню участь в виробничому процесі – виробничий персонал та керівний персонал.

Складовою частиною відповідної підготовки персоналу є організація його навчання. На підприємстві, в першу чергу, потрібно забезпечити навчання персоналу, службові обов'язки якого передбачають: перебування у виробничих зонах або контрольних лабораторіях, а також персоналу, діяльність якого, безпосередньо, може вплинути на якість продукції.

Кожен прийнятий на роботу співробітник зобов'язаний опанувати не тільки теоретичні та практичні знання за GMP, а й також пройти навчання відповідно до обов'язків, що за ним закріплені. На підприємстві повинні бути створені та затверджені керівником виробництва або керівником відділу контролю якості, –

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив(ла)		Белемєць Т.О.			РОЗДІЛ 7 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консультант								223
Керівник		Красінько В.О.				133		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. Каф.		Стабніков В.П.						

НП. Після опанування НП, робітники проходять перевірку засвоєних знань згідно СОП, а також згідно GMP – у тестовій формі [268].

Гігієнічні вимоги до персоналу

Кожен тип виробництва ЛЗ (виробництво стерильних та нестерильних ЛЗ) – потребує формування відповідних гігієнічних вимог до персоналу. У зв'язку з цим повинні бути складені детальні програми з гігієни праці, котрі є адаптованими до різних потреб підприємства.

При зарахуванні на роботу персонал – проходить обов'язкове медичне обстеження. При цьому важливо вжити заходи, які гарантують (наскільки це є можливим), що жодний співробітник з інфекційними захворюванням або відкритими ранами на відкритих ділянках тіла – не зайнятий у виробництві ЛЗ.

Кожна особа, яка входить у виробничі зони, повинна носити захисний одяг, що відповідає виконуваним нею операціями. Варто зауважити, що заборонені усі дії, що порушують гігієнічні вимоги усередині виробничих зон або у будь-якій іншій зоні, якщо вони можуть негативно вплинути на операцію. Слід уникати прямого контакту між руками оператора і відкритою продукцією, а також усякою частиною обладнання, що контактує з продукцією.

Персонал, який знаходиться у чистих зонах, повинен виконувати ряд специфічних вимог:

- персонал повинен мати окрім отриманих знань досвід роботи;
- у чисту зону не можна вносити верхній одяг, тому чисті приміщення супроводжуються перехідними зонами, роздягальнями, а вхід здійснюється крізь повітряні шлюзи;
- у чистих зонах повинна знаходитись мінімальна кількість працюючого персоналу.

Вимоги до комплектів технологічного одягу персоналу

Одяг та його якість – відповідають процесу та класу робочої зони; його слід носити таким чином, щоб захистити продукцію від контамінації.

Клас A/B: головний убір – цілком закриває волосся; на обличчі – захисна маска. Слід носити відповідним чином простерилізовані та не напудрені гумові

або пластикові рукавички, а також простерилізовані або продезінфіковані бахіли. Увесь використовуваний захисний одяг – практично не повинен виділяти волокна або часточки, при цьому повинен затримувати часточки, котрі відокремлюються від тіла.

Клас D: волосся – закрите. Слід носити звичайний захисний костюм та відповідне взуття або бахіли.

Клас C: волосся – закрите. Необхідно носити комбінезон або брючний костюм, а також відповідне взуття або бахіли. Від них практично не повинні відокремлюватися волокна або часточки.

Рукавички під час роботи у кожному із перерахованих вище класів, потрібно регулярно дезінфікувати (відповідними засобами). Маски та рукавички – змінюють, принаймні, кожну зміну (корегується у залежності від конкретних класів чистоти підприємства). Контроль мікробіологічної чистоти рук персоналу, необхідно проводити відповідно до – Методичних рекомендацій, щодо контролю до мікробіологічної чистоти рук персоналу, який наразі, працює у виробничих приміщеннях, які є затвердженими МОЗ України 14.12.2001 N 502 [269].

Вибір класів чистоти виробничих приміщень

При класифікації чистих приміщень розглядаються частинки з розмірами від 0,1...5 мкм. Під частинкою розуміється твердий, рідкий або багатофазний об'єкт, або мікроорганізм з розмірами 0,005...100 мкм.

Якщо для звичайних приміщень чистота повітря оцінюється по масовій концентрації забруднення у повітрі, то для чистих приміщень вона оцінюється кількістю частинок в одиниці об'єму повітря, причому таких частинок, розмір яких рівний або перевищує певну величину. Звідси маємо, що кількість частинок певного розміру в 1 м³ повітря визначає клас чистоти приміщення.

Приміщення певного класу чистоти можуть містити одну або декілька чистих зон. Під **чистою зоною** розуміється зона, в якій контролюється навколишнє середовище на кількісний зміст частинок певного розміру, сконструйована і експлуатована таким чином, щоб запобігти або зменшити можливість

проникнення, розповсюдження, розвитку та затримки в ній забруднюючих речовин й мікроорганізмів.

Чисті зони для виробництва стерильних ЛЗ класифікуються відповідно до необхідних характеристик оточуючого середовища. Кожен виробничий процес – вимагає рівня чистоти навколишнього середовища в «експлуатованому стані», щоб мінімізувати ризик забруднення продукту або використовуваних матеріалів частинками або мікроорганізмами. Для того, щоб відповідати необхідним умовам «у експлуатації», ці зони повинні проектуватись таким чином, щоб забезпечити заданий клас чистоти повітря в «оснащеному» стані [270].

Для виробництва стерильних лікарських препаратів можна, як правило, виділити чотири типи зон:

Тип А: локальні зони для операцій з високим ступенем ризику (зона наповнення, закупорки, викривання ампул, здійснення з'єднань в асептичних умовах). Як правило, такі умови забезпечуються робочою зоною з ламінарним потоком повітря, які повинні забезпечувати однорідну швидкість повітря 0,45 м/с.

Тип В: для випадку асептичної підготовки та наповнення – простір, що оточує зону типу А.

Тип С і D: чисті зони для виконання менш відповідальних етапів виробництва стерильних продуктів.

Отже, однією з критичних вимог належної виробничої практики за GMP, є чистота навколишнього середовища і устаткування, для виконання якої їй слугують чисті приміщення. Виробництво інактивованої вакцини проти ВПГ-2 з епігенетичним ад'ювантом, має здійснюватись у приміщеннях класу чистоти В (як стерильного імунобіологічного препарату) з локальними зонами класу А.

Ведення технологічного процесу в асептичних умовах

Для виробництва, у яких неприпустима стерилізаційна обробка на термінальних стадіях, робота з компонентами первинної упаковки після миття повинна здійснюватись в навколишньому середовищі принаймні класу D. Обробляти стерильну вихідну сировину та компоненти первинної упаковки, за умови якщо в подальшому не передбачена стерилізація або стерилізуюча

фільтрація, потрібно в робочій зоні класу А (з навколишнім середовищем класу В).

Приготування розчинів, які під час технологічного процесу підлягають стерилізуючій фільтрації, слід проводити в навколишньому середовищі класу С; за відсутності проведення стерилізуючої фільтрації, підготовку матеріалів та виготовлення продукції необхідно здійснювати у робочій зоні класу А (з навколишнім середовищем класу В).

Проводити обробку й наповнення продукцією, приготовленою в асептичних умовах, потрібно у робочій зоні класу А (з навколишнім середовищем класу В).

Передачу (транспортування) не остаточно закупорених первинних упаковок із продукцією, наприклад ліофілізованою (до завершення процесу закупорення) – необхідно здійснювати або в зоні класу А, що розташована в навколишньому середовищі класу В, або герметичних передатних боксах у навколишньому середовищі класу В [271].

Вимоги до будівництва та організації чистих приміщень

Чистим приміщенням або **чистою кімнатою** – називається приміщення, у якому рахункова концентрація аерозольних частинок при необхідності число мікроорганізмів в повітрі – підтримуються в певних межах.

– *Кімнати переодягання.* Кімнати переодягання – для підготовки персоналу до входу у чисте приміщення та виходу з нього. У них: одягають одяг (передбачений інструкцією), здійснюється миття рук, дезінфекція та ін. Кімната переодягання виконується як повітряний шлюз. Оснащення кімнати переодягання залежить від класу приміщення, в яке вона веде.

Кімната переодягання має загальні ознаки та, зазвичай, розділяється на три зони:

– *зону входу* в кімнату, де відповідно до регламенту, знімається та зберігається одяг й особисті речі, які не допускаються у чисте приміщення, миються, сушаться руки і т. д.;

- *перехідну зону*, в якій персонал вдягається для чистого приміщення. Тут встановлюється поперечна лава, яка служить фізичним та психологічним бар'єром при переодяганні;
- *зону виходу*, де проводиться остаточна перевірка перед входом в чисте приміщення; у стерильному виробництві надягають стерильні рукавички.
- *зона виходу* – має найбільш високий рівень чистоти. Згідно правилам GMP ЄС, ця зона в «оснащеному» стані повинна мати такий же клас чистоти, що і приміщення, у яке вона веде [272].

Обґрунтування вибору дезінфікуючих розчинів

Розчини, що використовують для дезінфекції приміщення

Згідно встановлених норм, розрізняють щоденну, щотижневу, щомісячну, а також щорічну санітарну обробку приміщень й устаткування, котрі проводять до та після виробничого циклу. Сюди відносимо дезобробку та мийку: дверей, ручок дверей, стін, підлоги, вікон, меблів, контейнерів відходів, трубопроводів, технологічного обладнання і тд. При цьому усі використовувані мийні та мийно-дезінфекційні засоби – змінюють раз на декаду задля запобігання розвитку толерантності та стійності штамів мікроорганізмів або відповідних резистентних форм.

Перш за все, для миття й дезінфекції, пропонуємо до використання:

- 3...6 % **розчин H_2O_2** , як ефективний та економічно привабливий засіб;
- **«Хлорамін Б»** – дешевий, менш токсичний, не такий агресивний у відношенні до оброблених поверхонь;
- розчини (75 %) **$\text{C}_2 \text{H}_6 \text{O}$** , – добре розчиняється в воді, не ушкоджує об'єкти, що виготовлені з металу, скла та гуми;
- розчину рецептури **«С-4»**.

У якості зміни (один раз на декаду) пропонуємо використовувати:

- **«Дезекон ОМ»** (на основі четвертинних амонієвих солей, амінів та бігуанідів) – володіє бактерицидними, віруліцидними, а також фунгіцидними властивостями (властивості мають прямопропорційну залежність від зміни

температури їх використання). Використовувати водним розчином з концентрацією 0,02...0,05 %;

➤ **«Біоконтакт»** – володіє антимікробною (*E. coli*, *S. enteritidis*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, та інших бактерій й їх спор), віруцидною та фунгіцидною діями. Використовувати водним розчином з концентрацією 0,1...0,3 %.

На підприємстві в обов'язковому порядку здійснюється контроль чистоти (мікробної контамінації) мікробіологом цеху. Приміщення **класів чистоти В** (з локальними зонами класу А) контролюються – вибірково два рази на тиждень під час виробничого процесу, а також один раз на два тижні безпосередньо після обробки приміщень.

У процесі роботи (**у виробничих приміщеннях класу В з локальними зонами класу А**) у змивах з поверхонь приміщень площею 100 см² – допускається наявність не більше двох КУО неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х паралельних чашках Петрі. Після обробки дезінфікуючими розчинами, у змивах з поверхонь приміщень, – не допускається наявність життєздатних мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

Розчини, що використовують для дезінфекції рук персоналу

Пропонуємо використовувати:

- **76 % розчин С₂ Н₆ О** – ефективний і дешевий;
- **«Октенісепт»** – вже готовий для використання (його не потрібно розчиняти у воді), малонебезпечний, не виявляє шкірно-подразнюючих властивостей при багаторазовому застосуванні;
- **«Октенідерм»** – готовий для використання, не виявляє шкірно-подразнюючих властивостей при багаторазовому застосуванні. Також виявляє бактерицидні, фунгіцидні властивості.

Контроль мікробної контамінації здійснюється також мікробіологом цеху за рахунок проведення змивів ватними тампонами (надалі здійснює реєстрацію у робочому журналі). Для персоналу, який працює в описаних вище зонах класів чистоти, даний контроль здійснюється два рази на тиждень під час виробничого

процесу чи один раз на два тижні після обробки рук деззасобом у вибіркового порядку у декількох працівників. Після обробки рук (рукавичок) – не допускається, наявність більше двох КУО неспороутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі [273-275].

Підготовка вентиляційного повітря

У чистіших приміщеннях тиск повітря повинен бути більше, ніж в менш чистих, щоб не допустити проникнення забруднень із зовнішнього середовища. Виключенням є чисті приміщення, в яких ведеться робота з небезпечними речовинами. Для них необхідний негативний перепад тиску, тобто в робочій зоні тиск повітря повинен бути нижче, ніж в навколишньому середовищі.

Згідно рекомендації ГНД 07.006.98 між класифікованими і некласифікованими зонами необхідно підтримувати тиск не нижче 15 Па; між класифікованою зоною і прилеглими зонами нижчого класу повинен підтримуватися тиск не нижче 10 Па.

Очищення повітря, яке подається у виробничі ***приміщення класу чистоти В*** (з локальною зоною А), **проводять по трьох-східчастій системі:**

- Попередньої (використовують чарункові фільтри);
- тонкої (використовують рулонні фільтри);
- надтонкої (використовують ФЯЛ, (ЛАИК), 4Ф, НЕРА, ULPA).

Фільтри, що використовуються в системі очистки повітря

Отже, суттєвим елементом проектування системи підготовки повітря є вибір фільтрів. **Фільтр** – найважливіший компонент системи очистки повітря для чистих приміщень, оскільки з його допомогою остаточно встановлюється необхідний ступінь чистоти приміщення. Саме описане вище триступінчасте очищення повітря за допомогою фільтрів грубого, тонкого очищення на першому й на другому ступені, відповідно, а також мікрофільтрів або фільтрів абсолютно тонкого очищення – на третьому ступені, дозволяє досягти необхідного результату

В основі НЕРА технології лежить фільтрація однонаправленого повітряного потоку. Основний принцип робочого блоку очистки повітряного аерозолі –

забрати повітря за допомогою повітродувки, ущільнити його у просторі над фільтром й надалі продути крізь HEPA фільтр.

Фільтри HEPA – складаються з рамки, що виготовляються з картону (або оцинкованої сталі), усередині якої укладений фільтруючий матеріал у вигляді гофрів, який спирається з боку виходу повітря на сітку гофрованої форми. Дані HEPA фільтр є ключовою ланкою системи, від якої залежить ефективність роботи всієї повітроочисної станції; їх ефективне використання можливе тільки за умови триступінчатої фільтрації повітря, що подається. **Кожен із ступенів вирішує свою специфічну задачу:**

Перший ступінь фільтрації – захищає систему підготовки повітря від забруднень, що містяться в зовнішньому (атмосферному) повітрі, що подається у блок підготовки повітря.

Другий ступінь фільтрації – забезпечує чистоту проточувань повітроводів від забруднення й розташовується як останній елемент системи підготовки повітря.

Третій ступінь – саме HEPA фільтр, що забезпечує чистоту повітря, яке поступає безпосередньо в приміщення.

Високоєфективні HEPA фільтри містять волокна діаметром 0,65...0,5 мкм, відстань між якими складає від 10...40 мкм. Принцип HEPA фільтрації – заснований не на обмеженні здатності частинок проникати в проміжки між волокнам, а в зміні ліній повітряного потоку.

Контроль мікробної обнасіненості повітря виробничих приміщень – здійснюють за допомогою «Прибору для бактеріологічного аналізу повітря» за системою Кротова (не рідше 1 разу в тиждень) [277-279].

7.2. Обґрунтування вибору підготовки води очищеної та води ін'єкційної

Отримати очищену воду можна за використання одного із трьох поширених методів, а саме:

- *дистиляції*;
- *іонного обміну* – заснований на обміні катіонів кальцію та магнію на катіони натрію/водню, які містяться у практично не розчинному у воді матеріалі –

катіоніти. Використана вода, пропущена через фільтри з катіонітом, вміщуватиме тільки натрієві солі/мінеральні кислоти, які є добре розчинні та нездатні до утворення накипу у апаратах для дистиляції;

➤ *осадження* – отримують шляхом переведення іонів кальцію та магнію у малорозчинні з'єднання за рахунок додавання до води розчинів розрахованих кількостей їдкового натрію, гідрату окису кальцію, кристалічного карбонату натрію та ін. Через декілька годин за рахунок взаємодії сполук утворюються осади, які надалі піддаються видаленню за рахунок відстоювання або фільтрування (можна використати пісчаний фільтр);;

➤ *мембранного обміну осаження води* – виділяють: зворотній осмос, електродіаліз, діаліз, ультрафільтрацію та ін. Суть перерахованих методів – використання перегородок, котрі володіють селективною проникністю, завдяки якій є можливим отримання води без фазових та хімічних перетворень.

Важливо зазначити, що виконання вказаних методів є можливим виключно за умови, що вихідна питна вода – безпечна у епідеміологічному відношенні, не шкідлива за хімічним складом та має добрі органолептичні властивості. Зберігання чищеної води здійснюється в єностях закритого типу; матеріал повинен захищати від контамінації, а також забезпечувати зберігання властивостей води (згідно чинних вимог нормативних документів).

Ін'єкційна вода. **Ін'єкційна вода** – отримана шляхом 4-х ступеневої дистиляції на установці отримання ін'єкційної води; повинна бути стерильною та прозорою. Її виробництво здійснюють у відповідності до настанови «Настанова СК.Р 02С.02-08 "Виробництво води для ін'єкцій"».

За якісними показниками вода, що використовується у фармацевтичній промисловості, повинна відповідати вимогам Державної Фармакопеї України: вода очищена ФС 42-2619- 108 89; вода для ін'єкцій – ФС 42-2620-89. Зазначимо: для одержання води фармакопейної якості необхідно проводити обробку води питної, що поступає на підприємство.

Зберігається: $t = 3...7\text{ }^{\circ}\text{C} / 80...95\text{ }^{\circ}\text{C}$ у закритих місткостях; матеріал – забезпечує збереження її властивостей (у межах чинних нормативних документів)

та захищає від попадання механічних забруднень та мікробної контамінації. Тривалість – встановлюється валідацією. Матеріал дозволений до контакту з ін'єкційною водою – нержавіюча сталь [279,280].

Обґрунтування вибору допоміжних речовин для отримання інактивованої вакцини проти ВПГ-2

Допоміжними речовинами (за виключенням з переліку ад'юванта – β -глюкану) є сполуки органічної та неорганічної природи, котрі використовуються при виготовленні імунобіологічних препаратів з метою надання їм необхідних властивостей. До їх функцій відносять регулювання швидкості досягнення терапевтичного ефекту діючої речовини ЛЗ, забезпечення зручності застосування, а також забезпечення споживчих властивостей (для вакцин – колір, зовнішній вигляд, стабільність при зберіганні).

До переліку допоміжних речовин вакцини проти ВПГ-2 відносимо:

- ***ад'ювант*** – епігенетичний ад'ювант, агоніст Toll-рецепторів – полісахарид β -1,3/1,6-глюкан;
- ***допоміжна неактивна речовина-розчинник*** – NaCl (для корекції сольового балансу);
- ***буферні речовини (стабілізують вакцину)*** – Na_2HPO_4 (натрію гідрофосфату дигідрат, натрію дигідрофосфату дигідрат). Входить до складу вакцин задля збалансування кислотності у розчинах та підведенням його до рівня тіла людини, надання більшого ступеня сумісності з ін'єкційною частиною тканини тіла, вологоутримуючих властивостей [281, 282].

Проектування і вибір обладнання

Виробниче устаткування необхідно конструювати, проектувати, розміщувати та обслуговувати таким чином, щоб: воно відповідало своєму технологічному призначенню й передбаченим технологічним процесам при використанні, а також існувала можливість проведення легкого і ретельного очищення у відповідності до виробничих інструкцій.

Виробниче устаткування, у жодному разі, не повинне негативно впливати на якість готової продукції. Частини (поверхні) такого устаткування (що є

дотичними з продукцією) повинні бути виготовлені з матеріалів, які не вступають в реакцію, не володіють властивостями абсорбції та не виділяють будь-які речовини у ступені, котрий має вплив на якість ЛЗ.

Ваги, усі засоби вимірювань, регулюючі і записуючі прилади – повинні піддаватися калібруванню та періодичній перевірці відповідними методами, описаними в стандартних робочих методиках (відповідно до графіка).

Стаціонарно встановлені трубопроводи повинні бути чітко промаркіровані з вказівкою речовин, які через них проходять, та зазначенням напрямів руху потоків.

Трубопроводи для очищеної і ін'єкційної води – необхідно піддавати санітарній обробці у відповідності до виробничих інструкцій, які містять точні дані про допустимі норми мікробної контамінації, а також про належні заходи її попередження й усунення.

Усе наявне несправне устаткування на підприємстві повинне бути видалене з виробничих приміщень та приміщень по контролю якості (по можливості) або, в крайньому випадку, чітко промаркировано як «несправне» [283].

Устаткування, використовуване для виробництва тільки одного ЛЗ, слід очищати так, щоб не допустити змішування між собою частин різних серій цього ЛЗ. Усі передавальні пристрої і рухомі частини устаткування (транспортери, ланцюгові передачі, приводи і ін.) повинні бути закриті й мати огорожі.

При розміщенні устаткування повинні бути враховані наступні вимоги:

- Основні проходи у місцях постійного перебування що працюють, а також по фронту обслуговування – шириною не менше 2 м.;
- основні проходи по фронту обслуговування машин (компресорів, насосів, повітродувок і т. д.) та апаратів, що мають «гребінки» управління, місцеві контрольно-вимірювальні прилади, за наявності постійних робочих місць, – не менше 1,5 м.;
- проходи між апаратами, а також між апаратами й стінами приміщень, за необхідності кругового обслуговування, шириною – не менше 1 м.;

- проходи для огляду, періодичної перевірки, регулювання апаратів й приладів шириною – не менше 0,8 м;
- проходи між насосами – шириною не менше 0,8 м;
- проходи у віконних отворів, доступних з рівня підлоги або майданчика, – шириною – не менше 1 м. [284].

7.2. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Для виробництва вакцини проти вірусу Герпесу (ВПРГ-2) використовують ампули об'ємом 2 мл, які виготовлені з медичного скла марки УСП-1 й відповідають усім нормативним вимогам зазначеним в ТУ У 480945-005-96, а також гумові пробки типу 2 для флаконів 2 мл фірми ТОВ «Київгума», м. Бровари (виробництво), Україна; ковпачки алюмінієві типу К-2-13 фірми ТОВ «Статус», м. Харків, Україна [285].

Обґрунтування вибору наповнення ампул

Наповнення ампул відбувається у *зоні А* (з навколишнім *класом чистоти В*) при дотриманні усіх правил асептики. Фактичний об'єм наповнення ампул повинен бути більшим, ніж номінальний, задля забезпечення потрібної дози наповнення шприцу.

В технологічному процесі ампулювання застосовують три відомі способи наповнення ампул: вакуумний, шприцевий та пароконденсаційний.

Вакуумний спосіб полягає в тому, що ампули в касетах поміщають в герметичний апарат, у ємність якого заливають розчин, що підлягає наповненню, і створюють вакуум; при цьому повітря з ампул відсмоктується, і, після гасіння вакууму, розчин заповнює ампули. При вакуумному способі дозування розчину в ампули проводиться за допомогою зміни глибини розрідження, тобто фактично регулюється об'єм, що підлягає заповненню, при цьому сама ампула є дозуючою ємністю. Ампули з різними об'ємами заповнюються при відповідно створеній глибині вакууму в апараті.

Для точного наповнення ампул за допомогою вакууму, попередньо ретельно визначають необхідну глибину створюваного розрідження. Є практика, коли на заводах складаються таблиці необхідного ступеня розрідження у залежності від:

атмосферного тиску, розмірів ампул та необхідного обсягу наповнення. Коли таких таблиць немає, тоді ампули наповнюють при робочому розрідженні, що дає об'єм наповнення дещо менше запланованого, а методом інтерполяції розраховують його шукану глибину.

Недоліки вакуумного наповнення:

- точність дозування розчину $\pm 5 \%$;
- неекономічне використання розчину;
- при наповненні забруднюються капіляри ампул, у результаті чого при запаюванні утворюються небажані «чорні» голівки від пригара розчину на кінці капіляра;
- після наповнення до проведення операції запайки ампул проходить значний, у порівнянні зі шприцевим методом наповнення, інтервал часу, що негативно позначається на чистоті розчину та вимагає застосування спеціальних пристроїв для заповнення капіляра інертним газом.

Перевагою вакуумного наповнення є його висока продуктивність, а також універсальність розмірів і форм капілярів наповнених ампул [286].

Пароконденсаційний спосіб – заснований на тому, що ампули, наповнені парою, опускаються у ванночки-дозатори, які мають точно відміряний об'єм розчину, капілярами вниз. За рахунок конденсаційної пари в середині ампули створюється зони нагріву і стерилізації. ***Недоліком*** тут є неможливість наповнювати ампули термолабільним розчином.

Для даної технології ми обрали ***шприцевий метод*** наповнення ампул. Він здійснюється за допомогою установок зі спеціальними дозаторами (поршневими, мембранними та ін.); має більш складне апаратне оформлення, ніж вакуумний. Загалом шприцевий метод має жорсткіші вимоги до розмірів та форм капілярів ампул, але через низку переваг він відноситься до більш прийнятних для застосування у технології ампулювання.

Переваги шприцевого методу:

- точність дозування $\pm 1\%$;
- невеликий проміжок часу між наповненням та запаюванням (5...10 с);

– можливість наповнювати ампули термолабільними (нестійкими) розчинами у струмені інертного газу;

– капіляри не забруднюються, на відміну від двох попередніх методів, що особливо важливо для густих та в'язких продуктів.

Однак *недоліком шприцевого методу* слід назвати його невисоку продуктивність.

Наразі створено ряд конструкцій дозуючих елементів, які працюють без рухомих частин та дозволяють повністю запобігти забрудненню розчину у процесі дозування. Деякі зарубіжні фірми застосовують для цієї мети різні дозатори мембранного типу. Введення дози в ампулу під тиском дозволяє застосувати при наповненні додаткову фільтрацію розчину безпосередньо у момент наповнення, що надає можливість гарантувати чистоту, а при фільтрації за допомогою ультрафільтру – стерильність розчину в ампулі.

Обґрунтування вибору запайка ампул

Операція запаювання ампул вважається найбільш відповідальною операцією у самому технологічному процесі ампулювання, оскільки неякісна або пролонгована запайка – призведе до браку продукції.

На сьогоднішній день відомо два основних способи запайки ампул з використанням газових пальників:

- *оплавленням кінчиків капілярів* (у безперервно обертаючої ампули нагрівають кінчик капіляра, і скло, розм'якшуючись, саме заплавляє отвір капіляра);

- *відтяжкою капілярів* (у капіляра ампули відпаюють з відтяжкою частину капіляра та у процесі відпайки запаюють ампулу).

При цьому для рівномірного розігріву капіляра ампулу обертають при запаюванні. Варто наголосити, що вибір способу запайки – визначається діаметром капіляра. При вакуумному наповненні, коли капіляр ампули тонкий і крихкий, найбільш прийнятною технологією до теперішнього часу був саме спосіб запаювання оплавленням.

Спосіб запаювання ампул оплавленням має недоліки. У результаті оплавлення кінця капіляра запаювання ампул супроводжуються напливом скла. При значному напливі у місці запаювання можуть утворитися тріщини, які призводять до розгерметизації ампули.

При тонкому капілярі запаювання супроводжується утворенням гачка на кінці капіляра, що вважається браком. За капіляра великого діаметра, запаювання поплавка не відбувається у повній мірі, так як має капілярний отвір в місці запаювання. Спосіб вимагає, щоб ампули були суворо однієї довжини. При різній довжині ампул більше ± 1 мм – якість запаювання різко погіршується, а брак по запайці може бути значним. При запаюванні ампул, наповнених розчином, утворюється пригар «чорні голівки». Капіляри ампул перед запаюванням промивають за допомогою розпилюючої форсунки, що направляє розпилену воду для ін'єкцій в отвір капілярів ампул, що запаюються [284].

За обраної нами раніше шприцевої технології наповнення, коли застосовують широкогорлі ампули з розтрубом, спосіб запаювання закачуванням є неприйнятний. Тому з-поміж двох відомих способів запайки ампул, раціональним є використання способу відтяжки частини капіляра ампули. За його відтворення спочатку розігрівають капіляр ампули, що безперервно обертається, а потім відпаєну частину капіляра захоплюють спеціальними щипцями і, відтягуючи, відпаюють та відкидають у відходи. У цей же час трохи відводять полум'я пальника в сторону для перепалу скляної нитки, що утворюється у місці відпайки та для оплавлення запаяної частини.

Важливим є те, що процес запаювання ведеться за жорстким часовим циклом. У цьому випадку особливо велике значення має маса скла, яка вводиться у полум'я, на яку налаштовується пальник запаячного вузла. Якщо у полум'я пальника буде введена ампула з масою капіляра більшою, ніж маса на яку налаштований пальник, то за відведений на циклограмі проміжок часу, скло не встигне достатньо розігрітися й щипці при відтягненні зісковзнуть з капіляра. Тобто така ампула не запаяється. Якщо ж у зону пальника буде введена ампула з меншою масою капіляра, ніж необхідна, ампула розігріється за менший проміжок

часу, ніж задано – перегріється, відпаювана частина відхилиться від осі ампули, щипці не захоплять капіляр, а отже запаювання не буде виконано якісно.

Для якісної запайки ампули спеціально розсортовують при виготовленні згідно діаметру капіляра на групи й налаштування операції запайки виконують у залежності від використовуваної на виробництві групи ампул.

Варто зауважити: у добре організованому виробництві брак при використанні цього способу не буде перевищувати 1 %. Запайка з відтяжкою забезпечує гарний зовнішній вигляд ампули та високу якість завдяки однаковій товщині стінки запаяної частини та стінки капіляра ампули [285].

Обґрунтування вибору перевірки ампул на герметичність

Контроль якості запайки та герметичності ампул проходять 100% ампул. Для цього існує 3 методи:

- вакуумний;
- за допомоги розчину індикатора (для водних розчинів) й води або мильного розчину (для масляних розчинів);
- по світінню газового середовища у середині ампули під дією високочастотного електричного поля.

Для нашої технології ми обрали вакуумний спосіб перевірки ампул на герметичний, оскільки він простіший та найкраще підходить для ампул з ліофільно висушеним порошком.

Обґрунтування маркування ампул

По мірі необхідності маркування ампул методом «наклеювання самоклеючих етикеток» – здійснюють на автоматі для етикетування. На етикетці, виготовленій поліграфічним способом друку на українській або інших мовах вказують: назву препарату українською та іншими мовами, концентрацію, об'єм препарату в одній ампулі у грамах.

Ампули з лотків вручну завантажують у бункер машини. У тримач цифр друкарського пристрою етикетувальної машини попередньо вручну поміщають набір цифр, що складають номер серії та термін дії ЛЗ. При проходженні стрічки з

етикетками через друкарський пристрій, на етикетку наноситься номер серії та термін дії [286].

7.3. Вибір технологічних стадій, операцій, обладнання

Фільтри, що використовуються для відділення клітинного матеріалу

Серед конструкцій фільтрувальних установок значного розповсюдження набув фільтр ХНДХФІ. Фільтр складається з корпусу та перфорованої катушки-труби, на яку намотується до 208 м. марлі, згорнутої у вигляді слабкого джгута.

При намотці смуги марлевого джгута мають щільно прилягати одна до одної задля одержання потрібної товщини фільтрувального шару (40...50 мм). Рідина для фільтрування надходить спочатку у патрубок та через шар фільтрувального матеріалу проходить усередину катушки-труби, звідки надалі видаляється через патрубок. Шар марлі затримує частинки розміром 10 мкм. Для затримання частинок розміром 5...7 мкм, як фільтрувальний матеріал, можуть використовуватися синтетичні волокна на основі полівінілхлориду, фторопласту, поліпропілену.

Стерилізуюча фільтрація. Особливістю цього фільтра є направленість потоку фільтрації. Рідина, що фільтрується, проходить через фільтрувальний шар не перпендикулярно, а під кутом за рахунок чого збільшується шлях розчину через фільтр і значно поліпшує якість фільтрату.

За конструкцією фільтрувального елемента розрізняють дискові та патронні фільтри. Товщина мембран – 50...120 мкм, діаметр пор – 0,002...1 мкм. Мембранні фільтри можуть працювати під вакуумом й тиском.

Для тонкої фільтрації, у якості фільтруючого елемента, використовують «Profile II фірми «Pall», поріг затримання частинок – 0,2 мкм; фільтруючим матеріалом служить нейлон 6В. Також до складу установки входить фільтротримач.

Перевагами фільтру тонкої фільтрації є:

➤ достатній вузьке розподілення пор (за розмірами) й 100 % контроль процесу;

- відсутність виділення пірогенних та токсичних речовин у лікарський препарат;
- висока швидкість фільтрування;
- висока стійкість фільтрів та обладнання щодо методів стерилізації, що в свою чергу забезпечує стабільність структури мікрофільтраційного матеріалу (при здійсненні стерилізації);
- стійкість до чинників хімічної природи (методів стерилізації) разом з обладнанням, що також забезпечує стабільність мікрофільтраційного матеріалу (при здійсненні стерилізації);
- можливість регенерації, а також повторного використання;
- зручність роботи з фільтраційними елементами (механічна міцність листового матеріалу та його економічна доступність);
- високий ступінь безпечності для персоналу, що обслуговує фільтраційні установки [287].

Ліофільна сушка «MODULYO»

Ліофільна сушка «MODULYO» – виконана у відповідності до стандартів GMP.

До переваг даної моделі відносять:

- основні компоненти установки та усі складові частини (камера сублімації, полиці, конденсатор, що відсікає клапан), що контактують з продуктом, виготовлені з високоякісної сталі (марка AISI 316 L), з чистотою поверхні $RA < 0,5\mu$;
- внутрішня поверхня камери сублімації сконструйована спеціальним чином, щоб уникнути «мертвих кутів» – зон потенційного скупчення забруднень;
- додатково можливе оснащення системи стерилізації парою або хімічною стерилізацією: комплектації системи SIP (Sterilization in place) або CIP (Cleaning in place) для забезпечення високої якості очищення й стерилізації устаткування;

➤ завантажувальні двері камери можуть бути вмонтовані у перегородку стерильного боксу.

Великим плюсом є також передбачена система примусового розморожування конденсатора гарячою водою [288].

Обладнання для запайки ампул

Автомат призначений для наповнення ампул рідкими або дрібно-гранульованими речовинами; запаювання ампул здійснюється за допомогою газового пальника. Може комплектуватися двома типами дозаторів:

- шнековим (для дрібно-гранульованих речовин);
- сильфонним (для рідких речовин).

Автомат також є обладнанням маніпулятором для зняття й видалення верхівок ампул при запаюванні; передбачена можливість установки пристрою наповнення ампул інертним газом та принтера для маркування ампул.

Принцип роботи

Ампули з механізму завантаження поступають в осередки поворотного столу, надалі поворотний стіл переміщає ампули дискретно на кут 150° . При приході ампули на позицію наповнення, датчик контролю наявності ампули дає команду на включення механізму опускання голки й подальше включення дозатора. За умови відсутності ампули або неповному кроці переміщення столу на позиції наповнення, датчик контролю наявності ампули не спрацьовує та команда на наливання – не поступає.

На позиції запаювання ампула отримує обертання від роликів механізму обертання, а її шийка розігрівається факелом газового пальника. Захоплення маніпулятора опускаються, губки захоплення стискають верхівку ампули, яка обертається. Досягши текучості скла в зоні розігрівання верхівка ампули перестає обертатися в захопленнях маніпулятора, а в зоні розігрівання утворюється скручування – забезпечує надійне запаювання ампули. Верхівку ампули маніпулятор відносить убік й скидає у спеціальний лоток; ампула слідує далі. На позиції евакуації механізм вивантаження відводить ампулу у накопичувальний лоток [289].

**Таблиця № 11 – Технічні характеристики автомата для запайки ампул
«Robert Bosch»**

Продуктивність, амп./хв.	до 25
Об'єм дози:	
рідких речовин, мл	1...10
Привід автомата і дозаторів	електромеханічний
Витрата газу, м³/год:	
кисень	0,4
пропан	0,15
інертний газ	0,05
Електроживлення	220 В, 50 Гц
Споживана потужність Вт, не більш	500
Габаритні розміри, мм	1500 × 850 × 1100(Н)
Маса, кг, не більш	120

Автомат для упаковки ампул і флаконів в картонну пачку «Ecogenius»

Для упаковки ампул наповнених інактивованою вакциною проти ВПГ-2, пропонуємо використовувати автомат для упаковки ампул у картонну пачку з подальшим її закриттям. Завдяки оригінальній конструкції та компактним розмірам даного обладнання, для розміщення автомата не знадобиться велика виробнича проща технологічного приміщення. Обрана картонна пачка є гібридом картонної пачки і блістера, що у свою чергу забезпечує 100 % збереження ампул.

Автомат складається з двох модулів:

Модуль А: є 12-ти позиційною каруселлю та конвеєром. Картонна заготівка з горизонтального магазину передається на вузол, на якому відбувається її подальше формування. На наступній станції у сформовану пачку – вкладаються ампули від низу до верху. Потім нижня і передня сторони картонної пачки закриваються, верхня і бічні сторони залишаються відкритими.

Модуль В: є 8-ми позиційною каруселлю та конвеєром. При переміщенні пачки з модуля А на модуль В, на картон наносяться смуги наклеювання та під час руху пачки сторони заклеюються. У пачку вкладається інструкція й закривається верхня кришка.

Переваги обраної системи упаковки ампул Ecogenius:

- упаковка повністю захищає ампули від пошкодження;

- для управління автоматом – достатньо усього одного оператора;
- можливе приміщення в одну коробку до трьох видів ампул;
- легке витягання ампул й флаконів з упаковки;
- екологічність упаковки (картон) [290].

Таблиця № 12 – Технічні характеристики системи упаковки ампул
«Ecogenius»

Механічна швидкість	До 80 пачок в хвилину
Система управління	логічна система управління SIEMENS
Потужність	8 Кв + 6 Кв склеювальний вузол
Споживання електроенергії	380 В 50 Гц 3 фази + заземлення
Тиск повітря	80 л/мін при 6 панів
Стандартний захист	IP 44 мінімальний ступінь захисту
Захист двигуна	IP 54
Захист електричної панелі	Панель і електрична шафа IP 64

8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ

Індекс і номер за схемою	Найменування	Кількість одиниць	Технічна характеристика
ЗМ-1, ЗМ-4, ЗМ-7, ЗМ-10, ЗМ-63, ЗМ-67, ЗМ-70, ЗМ-84	Змішувач	3	Тип L 800. Місткість 150 л. Змішувач має перемішувальний пристрій. Споживча потужність 7,5 кВт. Габаритні розміри, мм: 1200 × 60 × 1400. Ступінь вибухонебезпечності оболонки електродвигуна IP 54 Ex d1G3. У комплекті з двома пересувними ємкостями. Завантаження і вивантаження вручну. Виробник: «НОВАРТ1», США.
Ф-2, Ф-5, Ф-8, Ф-11, Ф-31, Ф-58, Ф-80, Ф-82, Ф-85	Мембранний фільтр	5	Установка фільтруюча для фільтрації розчинів. Мембрана Дюрапор з розміром пор 0,22 мкм. Корпус – сталь. Фірма «Millipore», США
ЗВ-3, ЗВ-6, ЗВ-9, ЗВ-12, ЗВ-29, ЗВ-33, ЗВ-56, ЗВ-60, ЗВ-65, ЗВ-69, ЗВ-72, ЗВ-76, ЗВ-81, ЗВ-83, ЗВ-86	Збірник	10	Ємкість з щільною кришкою ГОСТ 17151-81. Місткість 40 л. Алюміній або н/сталь
М-13	Пральна машина	1	СМ-10, м. «Алітус», Литва. Загрузка 10 кг сухої білизни. Загрузка і вигризка – вручну.
СШ-14	Сушильна шафа	1	ШСС. Об'єм робочої камери 250 см ³ . Напруга 380В ± 10%.
Р-15, Р-34, Р-61, Р-73	Стерилізатор	2	Камера «Крупіна». Стерилізатор паровий. Тиск в корпусі 0,3 МПа. Вміст 1,8 м ³ . Розміри в мм: діаметр – 1184, довжина – 1400. Запобіжний клапан ДУ 50. Умовний тиск 1 МПа. Заповнення і вигризка вручну. м. Пенза.
КП-15.1, КП-34.1, КП-61.1, КП-73.1	pH-метр	2	Виробник фірма «WTW» Німеччина, pH170 Ecoline № 02310037, межа вимірювань від мінус 1 до 14.

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ СТАДІЙ ОТРИМАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розробив(ла)	Белемець Т.О.							223
Консультант								155
Керівник	Красінько В.О.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. Каф.	Стабніков В.П.							

Індекс і номер за схемою	Найменування	Кількість одиниць	Технічна характеристика
КП-15.2, КП-34.2, КП-61.2, КП-73.2	Терморегулятор цифровий	2	ТР-05М. Виробник: КУВП «БАЙТ». Межа регулюючих температур – (0...200) град. 50М ГОСТ 6651-78, похибка вимірювань $\pm 1^{\circ}\text{C}$, споживча потужність – 5 Вт.
КП-15.3 КП-34.3, КП-61.3, КП-73.3	Клапан запобіжний	2	Збірний. Входить до комплекту БР-120.
ПЗ-16	Повітрозабірник	1	Висота 2...2,5м над рівнем даху. н/сталь 12Х18 Н10Т
Ф-17	Фільтр комірковий	1	Фільтр комірковий уніфікований періодичної дії, запиленості повітря не більше 5-10 мг/м ² . Складається з коробчастого корпусу, який заповнено пружним скловолокном. Фільтр типу ФЯУ не регенерується, а при досягненні граничної пилеємності фільтруючий шар замінюється на новий. Ефективність очищення по механічним часткам складає - 70%.
К-18	Компресор	1	Dalgakiran, марки «Eagle» 100, тиск – 7...10 бар, продуктивність 12,7 м ³ /хв. Н/сталь.
Ф-19	Фільтр	1	Тип ФЯВ. Ступінь очищення 90%.
КН-20, КН-21	Кондиціонер	3	Канальні кондиціонери середнього тиску. Продуктивність вентилятора 4300 м ³ /год. Забезпечений системою очистки повітря: 1ст. G-4, 2ст.- F-9. Початкова різниця тиску – 151Па. Максимальна різниця тиску – 300 Па. Максимальна кінцева різниця тиску – 450 Па.
Ф-22, Ф-23, Ф-24	Фільтр НЕРА	3	Фільтр тонкої очистки повітря. Ефективність фільтрації 99,99 %
ГФ-25	Машина, для миття ампул	1	Тип «Robert Bosch». Миття ультразвуком, використання води 200 л/год. Потужність 44,5 кВт. Виробничість 1 мл. – 16 тис/год. Вага – 2750 кг. Німеччина.
ГФ-26	Сухо-жаровий тунель	1	Продуктивність для 5...10 мл ампул – 6 000 амп/год. Температура стерилізації ампул 250...270 °С. Споживча потужність 16 кВт. Завантаження і вивантаження ампул механізоване. Габаритні розміри вхідної частини – 610 мм, зони стерилізації – 1500 мм, зони охолодження – 610 мм. Виробник: фірма «Штрук», Німеччина.
СП-27	Стерилізатор сухо-повітряний	2	ШСС. Об'єм робочої камери 250см ³ . Напруга 380В $\pm 10\%$. Частота 50Гц. Потужність максимальна 7кВт. Габаритні розміри в мм: 780 × 1130 × 1895. Діапазон

			автоматичного підтримання температури в камері 50...200 °С. Похибка ± 2 °С. Маса 255 кг. М. Білгород-дністровський. Завод мед. обладнання.
КП-28, КП-55, КП-62, КП-66, КП-74	Об'ємно-вагові терези	3	Тип ДНУ. Марка ВТУ-Юкг. Тюмень 3-д приладобудування. Похибка вимірювання ± 0.1 г.
Х-35	Холодильна камера	1	Завод приладобудування. Об'єм (3×6×3) м ³ . Холодильна машина ІФ-56, завод «Іскра», м. Москва. Температура (8 ± 2) °С. Потужність приводу 2,2 кВт. Корпус н/сталь 12Х18Н10Т
Н-30, Н-32, Н-36, Н-39, Н-42, Н-45, Н-50, Н-52, Н-59, Н-64, Н-68	Насос відцентровий	11	Продуктивність 91 м ³ /год. Потужність двигуна 1,5 кВт. Виробник «Техмаш», м.Київ.
Ф-37	Фільтр пісчаний	1	Дисковий фільтр ARKAL. Даний фільтр затримує речовини до 100 мікрон при максимальному тиску в системі 10 бар та максимальному потоці 4 м ³ /год
Ф-38, Ф-40	Помякшувачі	2	Помякшувач ER/Kinetiko. Використовується для зниження загальної жорсткості води, часткового видалення катіонів Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺ та Mn ²⁺ . Продуктивність 1,8 м ³ /год. Вода після установки пом'якшення повинна мати жорсткість не більшу 0,3 мг-екв/дм ³ .
Ф-41	Фільтр вугільний	1	Вугільному фільтрі CRAN FCF-37. Максимальна продуктивність фільтру 2,8 м ³ /год.
Ф-43, Ф-51	Фільтр грубої очистки для води	2	Тип «FBICVHL». Виробник США, фірма «Millipore». Патронний з поліпропіленових волокон з діаметром пор – 0,45мкм.
Ф-44, Ф-52	Фільтр тонкої очистки для води	2	Тип «FBICVHL». Виробник США, фірма «Millipore». Патронний з поліпропіленових волокон з діаметром пор – 0,1мкм.
Ф-46, Ф-47, Ф-48	Зворотно-осмотична мембрана	1	Установка зворотноосмотичної фільтрації води типу ДВС-М/(1)5Н продуктивністю від 10 до 50 л/год призначені для одержання деіонізованої води з питомим опором до 18 МОм. Рекомендуються як системи водопідготовки для контрольно-аналітичної апаратури, для біохімічних аналізаторів, рідинних хроматографів, для робіт з культурами клітин.
ЗВ-49, ЗВ-53	Збірники для очищеної та ін'єкційної води	2	Горизонтальний, із змійовиком обігріву паром. Міст-кість 1,0 м ³ мірним склом. Ціна поділки 0,05 м Завантаження

			самопливом, вивантаження за допомогою вакууму. Габаритні розміри: діаметр – 1000 мм, довжина – 2052 мм. Виробник: завод «Дезхімобладнання», м. Пенза.
ГФ-87	Машина для наповнення ампул	1	Фірма «Robert Bosch» Германія. Виробничість 16 тис. амп/год для ампул 1...2 мл. Вага машини 1200 кг. Потужність 2,5 кВт.
ЛС-88	Установка сублимаційної сушки	1	Н/сталь, імпорт. MODULO Виробник: Thermo Fisher Scientific, США . Сушильна камера: внутрішні габарити /1200 × 1000 × 950/ мм. Номінальний об'єм завантаження 50 л. Площа завантаження – 3,8 м ² . Діапазон регулювання температури від мінус 40 до плюс 80 °С. Робочий тиск не менше 13,3 Па. Температура конденсатора мінус (50...80) °С. Номінальна холодопродуктивність 180 ккал/год. Холодильний агент R13/R22. Нагрівальна рідина водо-глізантинова суміш. Середня витрата холодної води 0,9 м ³ /год. Споживча потужність 10 кВт.
ГФ-89	Машина для запайки ампул	1	Фірма «Robert Bosch» Германія. Виробничість 16 тис. амп/год для ампул 1...2 мл. Вага машини 1200 кг. Потужність 2,5 кВт.
ГФ-90	Ємність для перевірки ампул на герметичність	1	Ємність закрита. Тиск стисненого повітря до 0,03 МПа. Розрядження 500...700 мм. рт. ст. Тиск рідини 0,15-0,3 МПа. Напруга 220 В. температура рідини (50...60) °С. потужність не більше 200 Вт. н/ сталь 12Х18Н10Т. м. Маріуполь, завод технологічного обладнання.
ГФ-91	Установка для перегляду ампул на чистоту	1	Габаритні розміри в мм: 1100 × 650 × 700. кількість робочих місць – 1. Виробник МЗТО. Дерево. Стіл оснащений приладом для контролювання ін'єкційних розчинів. Тип Ук-2. Габаритні розміри в мм: 425× 252 × 195. потужність електролампи 60 Вт. Напруга 220 В. Виробник БНР, з-д електромедичних пристроїв, станція «Іскри».
ГФ-92	Машина для маркування ампул	1	АП-20М. Установка для маркування ампул. Машина призначена для нанесення даних на ампулу. Сталь 12Х18Н10Т. Виробничість для ампул 5...10 мл – 9780 шт/год. Потужність 0,3 кВт. Напруга 220/280 Габаритні розміри 450 × 515 × 660.
ГФ-93	Автоматична	1	Швидкість процесу пакування залежить

	машина для упаковки ампул в пачки		від продукту та можливостей подачі матеріалу, до 70 упаковок в хвилину. Діапазон робочих розмірів: довжина: від 70 до 190 мм; ширина: від 40...145 мм; висота від 20...80 мм; висота + ширина – 190 мм. Споживча потужність 1,5 кВт. Висота конвеєра подачі продукту на вході та виході 820 мм, регулюється 30 мм. Габаритні розміри: (2350 × 1600 × 800) мм. Виробник: Піноро, Італія.
ГФ-94	Автоматична машина для упаковки пачок в коробки	1	Напруга 380 В. 50 Гц + Нейтраль + Заземлення. Споживча потужність 0,5 кВт. Витрата повітря 620 л/хв. Робочий тиск 0,6 МПа. Розмір короба: Мін. 200 × 125 × 65. Макс. 600 × 400 × 400. Розмір пачки: Мін. 25 × 10 × 65. Макс. Боо х 120 × 300. Габаритні розміри: (3000 × 2250 × 2050) мм.

Примітка: представлений пошук та підбір обладнання проводився з використанням наступних електронних джерел:

1. <https://promoboz.com/journal/2023/6-99-november/dosyagnennya-maksymalnoyi-efektyvnosti-zavdyaky-vykorystannnyu-kontejnernyh-zmishuvachiv-vid-kompaniyi-l-b-bohle/> (змішувач «НОВАТ1», США);
2. <https://spectrolab.com.ua/p1098405550-membrannyj-filtr-razmer.html> (мембранний фільтр «Millipore», США);
3. <https://stprom.com.ua/ua/p1016672395-sbornik-dlya-hraneniya.html> (збірник кришкою ГОСТ 17151-8);
4. <https://spectrolab.com.ua/ua/p77353697-shkaf-sushilnyj-snol.html> (сушильна шафа);
5. <https://zavet.kiev.ua/ua/sterilizaciya/kamery-ultrafioletovye/> (стерилізатор);
6. <https://ventilator.ua/ru/category/filtry-yachejkovye-fyar-fyav-fyau/> (фільтр комірковий);
7. <https://www.pnevmoteh.com.ua/bezmaslyanyy-vintovoy-kompressor-dalgakiran-eagle-hw-100-9-3-bar> (компресор);
8. https://ventilator.kiev.ua/production/accessories/filtri_iaceikovie.html (фільтр);
9. <https://epicentrk.ua/shop/aksessuary-k-tekhnikе-po-ukhodu-za-domom/fs/tip-hepa-filtr/> (фільтр тонкої очистки HEPA);
10. <https://b2b-postavki.ru/predstavitel/robert-bosch-gmbh-packaging-technology.html> (машина для миття ампул «Robert Bosch»);
11. <http://ukrexport.gov.ua/ukr/prom/ukr/26.html> (сухо-жаровий тунель «Штрук», Німеччина);
12. <https://www.miz-ma.ua/> (стерилізатор сухо-повітряний);
13. <https://dalgakiran.ua/uk/products/vidcentrovogo-typu/> (насос відцентрового типу);
14. <https://rolfis.com.ua/shop/diskovye-promyvnye-filtry-/diskovye-filtry-arkal.html> (фільтри: пісчаний, вугільний);
15. <https://formulavody.com.ua/uk/kinetico-ergo-11-water-softening-system> (пом'якшувач для зниження загальної жорсткості води);
16. <https://akvo.com.ua/ua/fil-try-gruboj-i-tonkoj-ochistki/126-promyshlennyye-filtryi-mehaničeskoj-ochistki-vodyi> (фільтри: для грубої та тонкої очистки води);
17. <https://waterlux.ua/catalog/mobilnye-ustanovki-vodopodgotovki/mobilna-filtruvalna-ustanovka-z-ochishchennya-vodi-v-polovikh-umovakh-ufro-15/> (установка зворотньоосмотичної фільтрації води);
18. <https://stprom.com.ua/ua/p1016672395-sbornik-dlya-hraneniya.html> (збірник для очищеної та ін'єкційної води);

19. https://archive.promoboz.com/n1_30/45.pdf (машина для наповнення ампул «Robert Bosch», Німеччина);
20. <https://ten24.com.ua/ua/blog/sublimatsionnaya-sushka-produktov/> (установка сублімаційної сушки «MODULYO», Thermo Fisher Scientific, США);
21. https://archive.promoboz.com/n1_30/45.pdf (машина для запайки ампул «Robert Bosch», Німеччина);
22. <https://eurojet.com.ua/ru/etifiale/> (машина для упаковки ампул в пачки);
23. <https://promoboz.com/journal/2021/4-87-iyun/nadijna-upakovka-shlyah-do-innovatsij/> (машина для упаковки пачок в коробки).

РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР1.1. Приготування дезінфікуючих розчинів

Для обробки виробничого обладнання та інвентарю використовують розчини перекису водню (3...6 %) з раніше обраними миючими засобами, а також розчини: етилового спирту (76 %), «Хлорамін Б», «Біоконтакт» та інші дезінфікуючі засоби, які зареєстровані в Україні та мають заключний дозвіл на використання.

Зокрема використовують рідкі та порошкові миючі засоби. Дезінфікуючі розчини, як правило, готують перед використанням. Робочі розчини для підготування виробничих приміщень класу В (з локальними зонами класу А) – готують у чистих скляних чи емальованих ємностях, шляхом додання необхідної кількості дезінфікуючих засобів у воду, ретельно перемішують; миючий засіб використовують у необхідній кількості.

При приготуванні робочих розчинів потрібно дотримуватись наступних правил:

- за умови потрапляння дезінфікуючих розчинів на шкірні покриви, уражену ділянку необхідно одразу промити чистою водою та надати допомогу згідно інструкцій з техніки безпеки;
- приготування усіх робочих розчинів здійснюють лише у спеціальному одязі, респіраторі або марлевій пов'язці, захисних окулярах та чоботях;
- під час роботи в обов'язковому порядку строго дотримуються інструкції щодо приготування дезінфікуючих розчинів.

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив(ла)		Белемєць Т.О.			РОЗДІЛ 9 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консультант								223
Керівник		Красінько В.О.				161		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Зав. Каф.		Стабніков В.П.						

ДР 1.1.1. Приготування 76 % розчину C_2H_6O

Для приготування 1 л розчину спирту потрібно відмірити 800 мл спирту етилового (об'ємна доля 96 %) і 224 мл води ін'єкційної (ЗМ-1), ретельно перемішати. Далі розчин пропускають через фільтр (Ф-2) з діаметром пор 0,22 мкм і поміщають у збірник (ЗВ-3).

ДР 1.1.2. Приготування 1 % розчину «Хлораміну Б»

У змішувач (ЗМ-4) наливають 9900 мл очищеної води і розчиняють в ній 100,0 г «Хлораміну Б», перемішують та пропускають через мембранний фільтр (Ф-5). Далі розчин за допомогою повітря перекачується у збірник (ЗВ-6). Розчин готують для одноразового використання.

ДР 1.1.3. Приготування розчину рецептури «С-4»

Для приготування 2 л рецептури «С-4» у змішувач (ЗМ-7) поміщають 34,2 мл 30 % перекису водню і 16,2 мл 85 % мурашиної кислоти, а також біля 2 л води.

ДР 1.1.4. Приготування розчину перекису водню 3 %, 6 %

Для приготування 3 % розчину перекису водню у змішувач (ЗМ-10) поміщають 100 мл 30 % перекису водню, 895 мл води ін'єкційної та 5 мл миючого засобу. Розчин пропускають через мембранний фільтр (Ф-11) і поміщають у збірник (ЗВ-12) для подальшого використання за призначенням. Розчин перекису водню (6 %) – готують ідентичним способом з перерахунком на відповідні пропорції компонентів розчину.

ДР 1.2. Підготовка виробничих приміщень

Виробничі приміщення для отримання вакцини проти ВПГ-2, оснащені системою: водопроводів, каналізацій, вентиляцій та системою знищення відходів. Приміщення В класів чистоти – мають установку кондиціонерів, які підтримують необхідну температуру та вологу повітря. Виробничі приміщення мають гладку внутрішню поверхню (стіни, стелі, підлога та двері), а також мінімум виступаючих частин. Поверхні приміщень – непроникні для рідин і легко доступні для миття миючими та дезінфікуючими розчинами; можуть піддаватись ультрафіолетовому опроміненню.

Стіни приміщень В класу – виготовлені із н/сталі 12Х18Н10Т; приміщення має освітлення, температурний режим, вологу повітря й вентиляцію, які не мають впливу на якість ЛЗ, функціонування обладнання та здоров'я персоналу; підвісні стелі – ретельно загерметизовано; наявна наливна підлога.

В приміщенні В класу чистоти відсутні відкриті комунікації та повітроводи. Вхід персоналу в «чисті» приміщення відбувається через повітряні шлюзи. Санітарно-побутові приміщення є обов'язково ізольованими від виробничих приміщень.

Підготовка виробничих приміщень до роботи включає в себе вологе прибирання, дезінфікацію, ультрафіолетове опромінення стін, підлоги та усіх інших поверхонь. Така підготовка ділиться на щоденну й генеральну. Прибирання проводять в спецодязі, який спеціально назначений для цієї цілі. Обов'язково в гумових рукавичках, гумових чоботах, у марлевій пов'язці або в респіраторі.

В якості дезінфікуючих розчинів використовують розчини описані у попередньому розділі кваліфікаційної роботи. Для прибирання використовують паралонові губки або серветки з обробленими краями. Розпочинають прибирання з чистих приміщень [279, 284].

ДР 1.2.1. Щоденне прибирання

Прибирання приміщень проводять після кожної зміни вологим способом. По закінченню роботи із приміщень прибирають: препарати, інвентар, матеріали; вимикають обладнання. Оброблення приміщень (В класу чистоти) проводять 3 % розчином перекису водню з миючим засобом/іншими передбаченими дезінфікуючими засобами. Стіни, двері, поверхні – протирають паралоновою губкою, змоченою робочим розчином, надалі цим же розчином миють підлогу.

За умови систематичного використання упродовж місяця 3 %-го розчину перекису водню, стан повітряного середовища приміщень – відповідатиме класу чистоти, тоді концентрацію перекису водню в робочому розчині можна знизити до 1 %. При виявленні у повітрі приміщень грибків, концентрацію перекису водню обов'язково збільшують до 4 %, а при наявності спроутворюючої мікрофлори – до 6 %. По закінченню вологого прибирання, персонал покидає

приміщення, включає бактерицидні лампи на 2 год. Не менше, ніж на 30 хв до початку роботи лампи, вмикають й вимикають вентиляцію [285].

ДР 1.2.2. Генеральне прибирання

Генеральне прибирання проводять вологим способом раз у 5...6 днів по закінченню робочого тижня. У приміщеннях В класу чистити прибирання проводять 6 % розчином перекису водню з миючим засобом.

Стіни, двері, підлогу й інші поверхні оброшують із гідропульту або вручну робочим розчином (150...200) мл/м². Після цього персонал покидає приміщення, його закривають на 30...40 хв. Надалі залишок миючого розчину видаляють з приміщень за допомогою ганчірок та губок. Особливо забруднені місця – додатково миють цим же розчином.

Визначення мікробної контамінації приміщень проводять 2 рази на тиждень під час виробничого процесу та 1 раз у два тижні, відповідно, після оброблення приміщень дезінфікуючими розчинами. В виробничих приміщеннях В класу чистоти поверхні приміщень після оброблення дезінфікуючими розчинами – повинні бути стерильними. Під час роботи у змивах з поверхонь приміщень допускається не більше 2-х колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х паралельних чашках Петрі для приміщень В класу чистоти [284,285].

ДР 1.3. Підготовка технологічного одягу

Технологічний одяг виготовлено з безворсової тканини. Призначений для захисту матеріалів та напівпродуктів від вторинної контамінації мікроорганізмами та механічними частинками, що виділяються персоналом.

В комплект технологічного одягу, що призначений для роботи у приміщеннях В класу чистоти, входять: комбінезон, глибокий шолом-капюшон з вирізами для очей та бахіли. Робота виконується у стерильних рукавичках з гуми або еластичних полімерів. Кожний комплект технологічного одягу – використовується виключно упродовж однієї зміни, після чого він передається на обробку.

Персонал, що виконує прання, сушіння, упаковку та стерилізацію технологічного одягу, підготовку та стерилізацію рукавиць, – працює у

стерильному технологічному одязі з безворсової тканини. Перед пранням проводять огляд стану технологічного одягу, оцінку стану його зношеності, виявлення пошкоджень, перевірку роботи застібок та сортування одягу по кольору та призначенню. При наявності дефектів – одяг ремонтується або замінюється на новий. Огляд стану технологічного одягу перед пранням або ремонтом проводиться у спеціальному приміщенні С класу чистоти. Технологічний одяг, що призначений для роботи у приміщеннях різних класів чистоти, оглядається та зберігається до прання окремо. Перед відправкою на прання чи ремонт його зберігають у боксах або контейнерах, що закриваються кришками; застібають на застіжки [281].

ДР 1.3.1. Прання технологічного одягу

Прання технологічного одягу здійснюють у приміщеннях С класу чистоти. Сушку та упаковку технологічного одягу виконують у приміщеннях В класу чистоти. Сушку й упаковку технологічного одягу, що призначений для роботи у приміщеннях різних класів чистоти, проводять окремими порціями.

Прання проводять у пральній машині (М-9) протягом 30 хв з моменту включення машини. На кожний кілограм технологічного одягу використовують не менше 10 л розчину миючого засобу. Для прання використовують синтетичні миючі засоби, які мають низьку ціноутворюючу здатність. Рекомендована концентрація розчину – 2 г/л, рекомендована температура: для змішаних тканин – (30...35) °С, для нейлону – (50...56) °С, для поліефірних тканин – (60...67) °С.

Після закінчення прання, одяг декілька разів обполіскують упродовж 20...30 хв у профільтрованій через мембранний фільтр (з порами розміром не більше 5,0 мкм) воді очищеній, спочатку теплій, потім у холодній.

ДР 1.3.2. Сушіння технологічного одягу

Віджим проводять у центрифугі, потім одяг струшують, по комплектам розвішують на підплічники та поміщають у спеціальну шафу (СШ-10), в яку через фільтр тонкої очистки подається тепле повітря.

ДР 1.3.3. Стерилізація технологічного одягу

По закінченню сушки кожний комплект технологічного одягу загортають у два прошарки пергаменту або спочатку поміщають у мішечки з безворсової тканини, а потім загортають. Після цього згортки поміщають не ущільнюючи у бокси (або контейнери) з кришками, що замикаються, та стерилізують в автоклаві (Р-11) прохолодного типу при надлишковому тиску 0,11 МПа та температурі $(120 \pm 1) ^\circ\text{C}$ упродовж 45 хв.

По закінченню стерилізації спускають пару, підсушують одяг та охолоджують його стерильним повітрям. Розвантаження стерильного технологічного одягу з автоклаву проводять у другому відділенні підготовки персоналу, де його розкладають в індивідуальні відділення шаф чи стелажів. Термін придатності стерильного одягу в пачках – не більше 2-х діб.

Визначення мікробної контамінації технологічного одягу проводять 2 рази на тиждень під час виробничого процесу в кожному виробничому приміщенні В класу чистоти вибірково у деяких працівників, а також 1 раз у два тижні безпосередньо після стерилізації (при цьому контролюється не менше 3-х комплектів з кожного розвантаження автоклаву). Важливо, щоб технологічний одяг після стерилізації був чистим з мікробіологічної точки зору. Тому у процесі роботи допускається наявність не більше 2-х колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х паралельних чашках Петрі у змивах з технологічного одягу одного працівника у виробничому приміщенні В класу чистоти.

Контроль ступеню виділення часток тканиною технологічного одягу перевіряють не рідше 1 разу на два тижні (наступного дня після прання одягу). Досліджується не менше 5 % від всієї партії випраного одягу. Тех. одяг вважається придатним для використання у приміщеннях В класу чистоти виробництва стерильних ЛЗ у тому випадку, якщо з ділянки тканин площею 10 см^2 під впливом потоку повітря обсягом у 1 л виділяється, в середньому, не більше 40 частин розміром $\geq 5\text{ мкм}$ [291].

ДР 1.4. Підготовка персоналу

Персонал є одним з джерел забруднення готового продукту як механічними частками, так і мікроорганізмами. Найбільша кількість мікроорганізмів виділяється з верхніх дихальних шляхів, волосся та шкіряних покривів під час десквамації.

До персоналу, що працює в «чистих» приміщеннях, висувається ряд наступних вимог:

- слід мити голову не рідше 2-х раз на тиждень, рекомендується носити коротку стрижку;
- не допускаються до роботи особи з підвищеним виділенням лупи;
- забороняється носити бороду;
- перед роботою 2 рази на тиждень слід робити гігієнічний манікюр;
- забороняється носити ювелірні вироби.

У виробничих приміщеннях суворо забороняється палити та приймати їжу.

Весь персонал, котрий зайнятий безпосередньо на виробництві, зобов'язаний регулярно проходити медичний огляд. Про кожне захворювання (нариви, порізи, шкіряні та простудні захворювання) – необхідно заздалегідь ставити до відома майстра цеху.

Персонал, що працює в «чистих» приміщеннях, одягнений у відповідності до вимог прописаних вище. Пересування персоналу всередині виробничих приміщень здійснюється у певному порядку у залежності від виконуваних виробничих операцій. Забороняється: хаотичне, безцільне ходіння по приміщеннях під час роботи. Суворо обмежується вхід у виробничі приміщення та вихід з них. У приміщеннях В класу чистоти неможна піднімати з підлоги та повторно використовувати предмети, що впали під час роботи.

Для записів використовують попередньо нарізані папірці пергаменту, які зберігаються у пластмасових пакетах. Писати дозволяється лише кульковою ручкою, яку 1 раз на зміну слід протирати 76 % спиртом етиловим. Записи проводять на столі, що стоїть поблизу місцевої витяжної вентиляції. У загально

цеховій гардеробній – персонал знімає верхній одяг та одягає перехідний одяг, взуття для подвір'я завжди змінюють на індивідуальні тапочки.

ДР1.4.1. Інструктажі, які проводяться працівникам

Види інструктажів, які проводяться персоналу:

1. *Вхідний інструктаж проводиться :*

- усім працівникам, які приймаються на постійну або тимчасову роботу, незалежно від їх освіти, стажу праці й посади;
- з працівниками організацій, які прибули на підприємство та беруть участь безпосередньо у виробничих процесах;
- з студентами, які проходять виробничу практику.

Вхідний інструктаж – проводиться спеціалістами відділу ОП. Програма інструктажу затверджується керівниками підприємства.

2. *Первинний інструктаж проводиться перед початком роботи та перед початком роботи безпосередньо на робочому місці з працівниками:*

- при прийнятті на постійну або тимчасову роботу;
- при переводі із одного цеху на інший;
- при виконанні нової роботи.

Первинний інструктаж – проводиться індивідуально або з групою людей однієї професії по діючій інструкції ОП.

3. *Повторний інструктаж проводиться з працівниками на робочому місці:*

- на роботі з підвищеною небезпекою 1 раз на 3 місяці;
- для інших робіт – 1 раз на 6 місяців.

4. *Неплановий інструктаж проводиться:*

- при вводі в дію нових нормативних актів про ОП, а також при внесенні змін до них;
- при зміні технологічного процесу, заміні або модернізації обладнання, приладів, матеріалів інструментів, а також інших факторів, які впливають на ОП;
- при порушенні працівниками вимог нормативних актів про ОП, які можуть призвести до травми, аварії, пожежу та ін.

5. *Цільовий інструктаж проводиться з працівниками:*

- при виконанні разових робіт;
- при ліквідації аварії;
- при проведенні робіт, на які оформляються наряд-допуск,

розпорядження або інші документи [291].

ДР 1.4.3. Підготовка персоналу до роботи в чистих приміщеннях

Підготовка персоналу для роботи у приміщеннях В класу чистоти

У першому відділенні приміщення підготовки, підготовка персоналу ведеться так само, як і для С класу чистоти.

Друге відділення підготовки оснащено лавкою із комірками для взуття у нижній частині. Сидячи на лаві, персонал знімає капці та поміщає їх до індивідуальної комірки (без допомоги рук). Потім, перекидаючи ноги через лаву, працівник повертається на 180 °С та бере з індивідуальної полиці або стелажу пакет зі стерильним комплектом тех. одягу та стерильним взуттям, котрі призначені для роботи у приміщеннях В класу чистоти. Після того, як надіто весь комплект тех. одягу, окрім рукавиць, персонал направляється до другої вмивальні. Тут обробляють дез. засобами руки у відповідності до МУ 42-51-13-93 та лише потім надівають рукавиці. Через повітряний шлюз персонал переходить до приміщення В класу чистоти. При необхідності вийти – персонал проходить ті ж процедури у зворотному порядку, минаючи повітряний шлюз.

При необхідності відвідати туалет, персонал проходить до другого відділення, де знімає технологічний одяг та складає його у ємкості з кришками, що відчиняються підніжними педалями. Потім сідає на лаву, переміщається на іншу сторону, дістає з комірки взуття та перезувається; проходить до першої вмивальні, з якої за допомогою підніжної педалі відчиняє двері до туалету. Після відвідування вбиральні, персонал знову проходить усі процедури підготовки, надіваючи при цьому новий стерильний комплект технологічного одягу [292].

Обробка рук персоналу

Для обробки рук персоналу у якості розчинів дезінфікуючих засобів використовуються:

- розчин рецептури <С-4> (масова частка 2,4 %);
- спирт етиловий (об'ємна доля 76 %).

Дезінфікуючі розчини повинні бути стерильними. Для попередження росту мікроорганізмів, їх слід зберігати виключно обмежений термін. Частково порожні ємкості для зберігання забороняється доливати свіжо-приготованими розчинами. Дезінфікуючі р-ни – по чергово змінюють кожні 5...6 діб задля попередження появи стійких форм мікроорганізмів.

Визначення мікробної контамінації рук персоналу повинно проводитися 2 рази на тиждень під час виробничого процесу у кожному виробничому приміщенні В класів чистоти – вибірково у декількох працівників та 1 раз на 2 тижні безпосередньо після обробки рук дез. розчинами. У процесі роботи допускається наявність не більше 2 колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на 2-х паралельних чашках Петрі у змивах з рук одного працівника у виробничому приміщенні В класу чистоти [293].

ДР 1.5. Підготовка обладнання та комунікацій

Обладнання, яке використовується для виробництва вакцини ВПГ-2, має гладку поверхню, виготовленого з нетоксичного, стійкого до корозії металу, який стійко витримує обробку дезінфікуючих розчинів та подальший контакт із сировиною. Усі деталі обладнання, що контактують з продуктами виробництва, знімаються для полегшення їх обробки дезінфікуючими розчинами чи стерилізації.

Обладнання розміщено так, щоб попередити забруднення продукту у процесі його виробництва, полегшити обробку, мийку, експлуатацію та обслуговування обладнання. Обладнання повинно регулярно проходити профілактичний ремонт й огляд. У підготовку обладнання до роботи входить: мийка та стерилізація його частин (які знімаються), обробка зовнішніх та внутрішніх частин миючими й дез. засобами.

Підготовку обладнання до роботи проводять до початку чи після проведення технологічного процесу у спецодязі.

У якості дезінфікуючих засобів застосовують розчини – описані вище у кваліфікаційній роботі. Дезінфікуючі розчини періодично (один раз на 2 тижні/один раз на декаду) змінюють, щоб попередити появу стійких форм мікроорганізмів. Для миття обладнання використовують паралонові губки, серветки з капронових або шовкових тканин з обробленими краями. Матеріали й інвентар – зберігають окремо та використовують виключно за призначенням. Після використання матеріали для обробки знезаражують 6 % розчином перекису водню упродовж 2...3 год. Можна використовувати розчини «Хлораміну Б» або хлорного вапна.

Чистоту обладнання контролюють за рахунок визначення мікробної контамінації – проводять 2 рази на тиждень під час виробничого процесу, а також 1 раз на 2 тижні після обробки дезінфікуючими розчинами чи стерилізації. Поверхні обладнання після обробки дезінфікуючими засобами (розчинами) чи після стерилізації, у виробничих приміщеннях А класу чистоти – повинні бути стерильними. У змивах з поверхні обладнання допускається наявність не більше 2-ох колоній мікроорганізмів, що не здатні утворювати спор на 2-ох паралельних чашках Петрі для приміщень А і В класу чистоти [294].

ДР 2. Підготовка вентиляційного повітря

Забір повітря здійснюється за допомогою повітрязабірника (ПЗ-16). З повітрязабірника надалі повітря поступає у комірковий фільтр (Ф-17), який складається з скловолокна; ступінь його очищення – 70 %. Після повітря поступає на компресор (К-18). Далі повітря надходить у комірковий фільтр (Ф-19) ступінь очистки якого – 90 %. Потім повітря надходить до кондиціонерів (КН-20, КН-21) у яких створюється різниця тисків, далі – у приміщення С і D класів чистоти через фільтр (Ф-22). У приміщення А та В класів чистоти, повітря надходить після проходження через фільтри НЕРА (Ф-23, Ф-24); ефективність очистки даних фільтрів – 99,99 %. Варто зауважити, що на кожному ступені очистки передбачені

штуцери для відбору проб повітря задля визначення концентрації механічних частинок до та після фільтрації.

У приміщеннях В класу чистоти створюють кратність повітряного обміну 20...40 разів за год. У приміщеннях розливу та герметизації ампул розливо-запаїчний цех – забезпечений камерою з подачею ламінарного потоку, який поступає у робочу зону зі швидкістю 0,3 м/с. У приміщенні створений 20-ти кратний обмін повітря за год. [295].

ДР 3. Підготовка матеріалів первинної упаковки

Перед початком роботи з кожної одиниці обладнання знімають етикетки з інформацією про готовність до роботи та в обов'язковому порядку замінюють їх новими, де вказано інформацію про майбутню роботу апарата.

ДР 3.1. Перегляд ампул

Ампули, які надійшли зі складу продивляються на столі під рефлектором ламп денного світла та відбраковують побиті й некондиційні ампули.

До некондиційних ампул відносять:

- капіляри, що продавлюються;
- склоподібні включення;
- механічні включення;
- насічки.

Відбраковують ампули, що мають на внутрішній й зовнішній поверхнях забруднення, які не відмиваються, а також ампули, що не стоять на горизонтальній поверхні. Ампули, які переглянули – встановлюють в касети.

ДР 3.2. Миття ампул

Перед початком роботи перевіряють дієздатність допоміжних вузлів та вимірювальних приладів мийної машини (ГФ-25), готовність до роботи у плані очистки. Миття ампул проводять в приміщенні D класу чистоти. На мийній машині встановлюють форматні деталі під ампули відповідної ємкості та здійснюють необхідне регулювання; перевіряють наявність в системі очищеної води і стисненого повітря. Потім, у відповідності з інструкцією, вмикають установку, приводять у роботу вентилятори ламінарного потоку повітря,

вмикають генератор ультразвукових коливань. Встановлюють задане виробництво машини на індивідуальному пульті та приступають до загрузки на мийку ампул з касет до нахилоного лотку ультразвукової ванни.

Обробку першої партії ампул здійснюють очищеною водою за допомогою душу «обливання», тобто ємкості наповнюють водою. Температура води становить 50...60 °С. Надалі ампули обробляють ультразвуком. Ампули заповнені водою і оброблені ультразвуком для знищення забруднень, за допомогою спеціального шнека подаються у форматні захвати барабану миючої машини, надалі повертаються на 180 °С та подаються горловиною вниз на внутрішню й зовнішню мийку.

Режими мийки ампул:

- ✓ шприцювання проточною очищеною водою (внутрішня поверхня за температури води 60...90 °С, зовнішня поверхня 50...60 °С);
- ✓ обробка ультразвуком (температура води очищеної 50...60 °С);
- ✓ продувка стерильним повітрям (під тиском 0,03...0,05 МПа);
- ✓ шприцювання (ополіскування) водою для ін'єкцій (внутрішня поверхня за температури води 60...90°С, зовнішня поверхня 50...60 °С);
- ✓ продувка стерильним повітрям (під тиском 0,03...0,05 МПа).

Оброблені ампули перевіряють на механічні вклучення.

Варто зауважити, що ампули після миття, у жодному разі не повинні містити механічних вклучень [296].

ДР 3.3. Сушка і стерилізація ампул

Після проходження усіх попередніх операцій підготовки, ампули вивідним гребінцем встановлюються в касети та поміщають у стерилізаційний тунель (ГФ-26). Стерилізують ампули за температури (180 ± 2) °С упродовж 2-ох год. Від стерильних ампул ОБТК відбирають контрольну пробу для перевірки стерильності та наявності механічних вклучень. Відсутність стерильності й наявність будь-якого роду контамінації чи механічних вклучень – суворо заборонені [296].

ДР 4. Приготування робочих розчинів

ДР 4.1. Приготування розчину NaCl (0,9 %)

Перед використанням NaCl прокалюють у сухоповітряному стерилізаторі (СШ-27) за температури $(180 \pm 2) ^\circ\text{C}$ упродовж 60 хв. На вагах (КП-28) зважують 0,099 кг прокаленого NaCl та поміщають в ємність (ЗВ-29). Надалі в ємність приливають попередньо підготовану воду для ін'єкцій до 11 л., вміст перемішують й здійснюють відбір контрольної проби. В розчині натрію хлору вміст NaCl повинен бути $(0,90 \pm 0,05) \%$. Отриманий розчин фільтрують через «Міллідиск» (Ф-31) у збірник (ЗВ-33) за допомогою вакууму; одночасно відбирають контрольну пробу. Збірник з розчином NaCl – стерилізують у паровому стерилізаторі (Р-34) при температурі $(132 \pm 2) ^\circ\text{C}$, під тиском 4,2 МПа, упродовж 2-ох год.

ДР 5. Отримання води очищеної та води для ін'єкцій

Вода при виробництві ЛЗ – широко використовується у якості компонента продукту, самого продукту, сировини, а також як миючий агент (компонент миючого агента) для тари й обладнання. З урахуванням особливих потреб до чистоти продукції, вода яку використовують на виробництві, повинна контролюватись як на вміст домішок, так і за мікробіологічними показниками. Беручи до уваги, що вода може бути використана на різних стадіях виробництва та у різних цілях, існує декілька типів води, які відрізняються згідно вимог щодо їх мікробіологічної чистоти. Відповідно, розрізняють методи очистки та обладнання використане з цією метою.

При виробництві різноманітних ЛЗ, суттєво відрізняється кількість та якість використаної води для їх одержання. Зокрема: для парентеральних препаратів – потрібна стерильна вода (у якій відсутні мікроорганізми та ендотоксини), для препаратів місцевої дії та пероральних лікарських засобів – вода, у якій відсутність пірогенів не є обов'язковою.

Підготовка води розпочинається з того, що водопровідна вода поступає через насос (Н-36) на систему з фільтрів, принцип дій якої полягає в наступному:

1. На стадії попередньої фільтрації вода проходить через пісчаний фільтр (Ф-37), який являє собою циліндричний резервуар з нержавіючої сталі, заповнений піском. Пісок перед цим піддають промиванню та хлоруванню.

2. Вода після фільтрації потрапляє в установку обезсолення (Ф-38, Ф-40), де проходить очистка від катіонів лужноземельних й важких металів.

3. Після видалення катіонів вода потрапляє в установку, заповнену активованим вугіллям (Ф-41), де з неї видаляються органічні з'єднання з малою молекулярною масою та залишки хлору.

4. Надалі вода потрапляє у фільтри з розміром пор 5 мкм (Ф-43) і 1 мкм (Ф-44). У якості фільтруючого матеріалу – поліпропілен.

5. Підготовлена на попередніх стадіях вода проходить очистку у системі зворотного осмосу (Ф-46, Ф-47, Ф-48). Тут відбувається видалення більше 96 % одновалентних іонів; більше 98 % двовалентних іонів; більше 97 % кремнію; більше 98 % пірогенів та бактерій. Фільтруючі елементи – поліамідні мембрани. Вода після фільтрації надходить у збірник (ЗВ-49) для збереження очищеної води.

6. Наступним етапом водопідготовки є отримання води ін'єкційної для вакцини проти ВПГ-2. Воду для ін'єкцій отримують методом дистиляції води очищеної на установці FINN-AQUA 2000H5 (ДУ-51).

Вода для ін'єкцій постійно циркулює в трубопроводах зі швидкістю $1,5 \text{ м}^3/\text{м}^2\text{с}$, з поверненням в ємкість накопичування, де зберігається за температури $85 \dots 95 \text{ }^\circ\text{C}$ та температури у точці повернення – не менше $80 \text{ }^\circ\text{C}$.

По трубопроводах ін'єкційна вода надходить у систему розподілення, а невикористана вода – повертається в ємність (ЗВ-53) [278].

Усі апарати даної системи водопідготовки виготовляють із нержавіючої сталі.

ТП 10 Приготування розчину вакцини

Антитіла до вірусу герпесу приходять на підприємство «in balk». До складу вакцини також входить ад'ювант – β -глюкан й деякі інші допоміжні речовини (детальний склад вакцини проти ВРГ-2 – описаний у роботі вище). Компоненти вакцини змішуються та розчиняються фізіологічним розчином. Готовий розчин

переміщують упродовж 20...30 хв. до повного розчинення субстанції. Розчинення контролюють візуально.

На цій стадії додатково здійснюють відбір проби (пробовідбірником) на аналіз вмісту діючої речовини й повноти розчинення готового розчину, густини, прозорості, кольоровості.

Отриманий ін'єкційний розчин передається на стерилізуючу фільтрацію. Отриманий розчин додатково пропускаємо ще через один фільтр (Ф-85) для остаточного очищення. За конструкцією фільтрувальний елемент – це дисковий фільтр з товщиною мембран – 50...120 мкм, діаметром пор – 0,002...1 мкм [281].

ТП 11 Наповнення і герметизація ампул

ТП 11.1. Наповнення ампул

Операції по наповненні ампул препаратом і їх запайці здійснюють на автоматичній розливній машині (ГФ-87).

Перед початком роботи перевіряють:

- чистоту та дієздатність розливної машини;
- наявність електронної мережі;
- наявність заземлення.

Всі роботи здійснюють у технологічному одязі із застосуванням засобів індивідуального захисту.

Попередньо бікси з простерилізованими деталями вузла розливу встановлюють на столі у приміщенні розливу препарату; приводять збір та встановлення розливної машини у відповідності з робочою інструкцією.

Під час монтажу поверхні шлангів, насосів та штуцерів – протирають серветкою, змоченою 76 %-вим розчином етилового спирту.

В приміщення наповнення вносять збірники з вакциною. До сифону збірника з вакциною прикріплюють силіконову трубку на вході якої кріплять скляну гребінку на 4 різки. 4 кінці гребінки через сифонову гуму прилаштовують до розливної машини. Розлив вакцини йде при постійному перемішуванні, тому бутиль з препаратом потрібно встановити на апарат струшування.

Перед початком роботи здійснюють налаштування та регулювання розливної машини на відповідний об'єм розчину в ампулі.

Спосіб заповнення ампул – шприцевий.

Регулюванням величини ходу поршня насосу встановлюють дозу розливу на заданий об'єм вакцини. Після заповнення системи препаратом та витиснення повітря, перевіряють дозу наповнення.

Перевірку об'єму наповнення ампул здійснюють каліброваним шприцом на початку, в середині та у кінці наповнення. Після наповнення дози, голки для наповнення укріплюють в тримачах машини.

За використання регулюючого трансформатора на індивідуальному пульті машини управління, встановлюють потрібну виробничість у залежності від властивостей наповнюючого розчину, його об'єму, витримки лінійних розмірів та товщини стінок ампул.

Подачу ампул до машини встановлюють в автоматичному режимі, приступають до наповнення [281].

ТП 11.2. Ліофільне висушування

Сублімаційна сушка вакцини проти герпесу здійснюється у камерній вакуум сушильній установці (ЛС-88) марки «MODULYO». Місткістю камери сублімації – 50 л.

До комплекту сушарки входять:

- вакуумна установка в тому числі (сушильна камера, конденсатор, пластинчато-роторний вакуум насос, термостат);
- холодильна установка;
- розподільна шафа.

Сушильна камера і конденсатор розділені між собою засувкою. У сушильній камері встановлені 7 полиць для розміщення продукту, що підлягає висушуванню. Охолодження (нагрів) полиць здійснюється за рахунок подавання в порожнину полиць, відповідно, холодоносія фреону R 22 або водно-гліцерина волога, суміші (глізантину).

У процесі сушіння волога, що видаляється з продукту конденсується на поверхні конденсатору, що охолоджується фреоном R 22. Щит керування дозволяє дистанційно керувати та контролювати увесь процес.

На щиті керування винесені такі показники:

- величина вакууму у системі;
- температура глізантину;
- температурні показники будь-яких двох полиць сушильної камери;
- температура продукту на дальніх полицях.

Перед завантаженням напівпродукту на сушку сушильна камера охолоджується до температури мінус 20...30 °С за рахунок подавання фреону в порожнину полиць. При досягненні визначеної температури в камеру завантажують напівпродукт після чого двері камери герметично закривають. Одночасно в камеру завантажують 10 піддонів з продуктом.

При температурі мінус 30...40 °С в камері сушарки створюється вакуум і в конденсатор подається фреон, відкривають головний засув установки та починають процес сушки. Величина вакууму на початку висушування 26,6 Па.

Покази температури препарату, розчину теплоносія й конденсатора, а також значення величини вакууму – записують через кожну годину в операційний лист реєструючого приладу.

При досягненні температури в конденсаторі мінус 50...60 °С – починається процес основного сушіння.

Сушку здійснюють при відповідних технологічних параметрах:

- температура продукту на полицях мінус 35...40 °С
- температура полиць мінус 35...40 °С;
- величина вакууму 50...60 Па.

Через 4 години відключають подачу фреону в полиці.

Після відключення подачі фреону, через 4 години з початку сушки, для прискорення процесу сушіння в полиці сушильної камери подають глізантин. Початкова температура глізантину дорівнює температурі навколишнього середовища. Упродовж 20...30 год. глізантин циркулює через полиці сушильної

камери, після чого включають нагрів глізантину. Спочатку температура становить $+ 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, надалі через кожні 5 годин температуру підвищують на $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ до моменту досягнення температури $+ 30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Коли температура продукту на полицях сушильної камери досягне $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, процес сушіння продовжують ще 10...12 год.

Через 30 годин після старту сушки починають плавний підігрів теплоносія на $1...2\text{ }^{\circ}\text{C}$ на годину до досягнення температури теплоносія $(35 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$. Температура препарату також зазнає поступового підвищення на $1...2\text{ }^{\circ}\text{C}$ на годину. При досягненні температури препарату $(35 \pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ його витримують упродовж 6 год.

Величина вакууму в кінці сублімації досягає 5,3 Па. Загальна тривалість висушування – 90 год.

ТП 11.3. Запайка ампул з вакциною

Після стадії сушіння розчину вакцини проти ВПГ-2, приводять в дію машину для запайки ампул (ГФ-89), яка складається з грілок попереднього нагріву та грілок запайки. У процесі запаювання потрібно кожні 30 хв. обробляти руки 76 % етиловим спиртом.

Під час роботи слідкують:

- за якістю запайки ампул, не допускаючи здуття, гачків;
- за дієздатність всіх з'єднань, не допускаючи виходу газу;
- за чистотою робочого місця (прибирати побиті ампули).

У залежності від довжини й діаметру капіляру ампули, а також товщини скла ампул, – регулюють притік газокисневої суміші. Тиск природного газу – $0,2...0,25\text{ МПа}$. Тиск кисню – $0,25...0,3\text{ МПа}$.

Якість запаювання повинна відповідати наступним вимогам:

- усі без виключення запаяні ампули повинні бути герметичними;
- кінець капіляра після запаювання повинен мати сферичну форму без видимих випуклостей та впадин;
- капіляр ампули не повинен бути зміщеним відповідно до корпусу самої ампули.

Запаяні ампули передаються транспортером машини у вивідний лоток, куди встановлюють касету для збору ампул. Касети з ампулами передають у

приміщення для зберігання ампул. Після закінчення наповнень машину вимикають, демонтують з'ємні частини та передають на мийку [278].

ТП 11.4. Перевірка ампул з препаратом на герметичність

Перевірку ампул на герметичність здійснюють у вакуумній закритій робочій ємності (ГФ-90), в яку встановлюють касети з ампулами таким чином, щоб капіляри ампул були направлені вниз. Ємність наповнюють метиленовим синім, який фарбує.

Принцип роботи заснований на різниці тисків у робочій ємності та в ампулах. Створюють розрядження 0,07...0,09 МПа. При скиданні тиску фарбуюча рідина (метиленовий синій) потрапляє виключно в не герметичні ампули. Ампули з розчином, що змінив колір, а також биті – відбирають з касети й відправляють на знищення. Склобій поміщають в контейнер для сміття та вивозять на звалище. На касету з переглянутими ампулами кріплять етикетку, де вказано назву препарату, номер серії, концентрація та кількість.

Контроль готового ЛЗ (імунобіологічного препарату), а саме інактивованої вакцини проти ВПГ-2 з використанням у якості ад'юванта – β -глюкану, проводиться згідно аналітично-нормативної документації (АНД). Опис лікарського засобу – згідно АНД.

ПМВ 12 Пакування, маркування, відвантаження

12.1 Перевірка ампул на механічні вклучення

Ампули поступають на перегляд для відбраковки. Перегляд ампул з препаратом проводять при освітленні електролампи з потужністю 60 Вт на фоні екрану (ГФ-91). Освітлення регулюється таким чином, щоб було видно дефекти скла, а також вклучення, які можуть знаходитись в ампулі.

Перегляд ампул здійснюють неозброєним оком у затемненому приміщенні на білому та чорному фонах, освітлених електричною лампою 60 Вт. Поверхня ампул повинна бути чистою та сухою.

Стан ока переглядача відносно світла та контрольованого об'єкта повинен відповідати наступним умовам:

➤ відстань очей переглядача до контрольованого об'єкта повинна бути в межах 25...30 см;

➤ кут між оптичною віссю перегляду та напрямком променю світла повинен складати приблизно 90 °С.

Очі переглядача мають бути відгороджені від випромінювання світла безпосередньо від джерела, лінія зору повинна бути спрямована трохи знизу (при вертикальному положенні голови).

Бракують ампули з препаратом по таких причинах:

- наявність видимих відхилень у дозуванні;
- тріщини скла, сколи, бій, кольорові смужки;
- видима неякісна запайка ампул;
- наявність сторонніх включень.

Всередині цеху огляду підлягають усі 100 % ампул [297].

ПМВ 12.2. Маркування ампул з вакциною

По мірі необхідності маркування ампул здійснюють на автоматі для етикетування (ГФ-92) – методом наклеювання самоклеючих етикеток.

На етикетці, виготовленої поліграфічним способом друку, на українській або інших мовах вказують: назву препарату, концентрацію, об'єм препарату в одній ампулі у грамах.

Ампули з лотків вручну завантажують в бункер машини. У тримач цифр друкарського пристрою етикетувальної машини попередньо вручну поміщають набір цифр, що складають номер серії та термін дії.

При проходженні стрічки з етикетками через друкарський пристрій на етикетку наноситься номер серії та термін дії.

При русі ампул по транспортеру, ампули затискуються направляючими й стеновими роликами. Відстань між ампулами встановлюють таку, щоб етикетка підходила одночасно з ампулою до апплікатора та акуратно приклеювалась. Відстань регулюється швидкістю або положенням стенового ролика.

У процесі роботи контролюють: якість прикріплення етикетки, цілісність етикетки, якість маркування, чіткість напису, номеру серії та терміну придатності.

Після наклеювання етикеток ампули знімають із транспортеру, збирають в лотки з відповідними ідентифікаційними картками та передають на пакування.

ПМВ 12.3. Пакування ампул з вакциною

Перед початком роботи перевіряють чистоту робочого місця, а також відсутність ампул інших серій.

Ампули по 10 штук укладають в пачки з перегородками або гофрованим вкладишем з картону для споживчої тари (разом з інструкцією по медичному застосуванню та ножом для відкриття ампул або скарифікатором).

Спочатку на автоматі (ГФ-93) формується гофрований вкладиш із картону й наклеюється на картон. Вкладиш потім заповнюється ампулами по 10 штук та відсікається.

Заповнені ампулами вкладиші поступають на транспортер. На транспортері формується стопа із двох вкладишів. Вручну на сформовану стопу кладуть ніж для відкриття ампул або скарифікатор, а також інструкцію по медичному застосуванню. За умови пакування ампул з кольоровим кільцем зламу, укладання ножів для відкриття ампул або скарифікаторів – не проводять. Підготовлені стопи транспортером подаються до автомату.

Перед початком роботи в механізмі друку автомату установлюють потрібні значення номеру серії та терміну придатності; у приймальні пристрої вкладають пачки.

На автоматі формується картонна пачка. На пачці поліграфічним способом друку необхідною мовою вказують: «Україна», назву підприємства, його товарний знак та адресу, назву препарату (латинською й іншими мовами), концентрацію, об'єм препарату в грамах, кількість ампул в упаковці, «Стерильно», «Для ін'єкцій», умови зберігання, реєстраційний номер, штриховий код.

Встановленим кліше на клапанах сформованої пачки автоматично наноситься номер серії та термін придатності; у пачку вкладається стопка; пачка закривається.

У процесі роботи машини для пакування ампул контролюють: якість пакування, цілісність пачки, чіткість напису на пачці номеру серії та терміну придатності.

ПМВ 12.4 Пакування у групову тару

Пачки з ампулами передаються до машини (ГФ-94) для пакування пачок у коробки. Установлюють пустий короб в касету й вмикають установку.

Пачки ампулами по 2 мл вкладаються у коробки з гофрокартону по 30/50/100 штук відповідно. Заповнений короб пачками з ампулами закривається та подається на транспортер. Короб із транспортеру знімається вручну й переноситься на пакувальний стіл. На пакувальному столі короб заклеюють липкою стрічкою («Скотч»), наклеюють групову етикетку та передають на піддон.

На груповій етикетці на українській або іншій мові вказують: «Україна», назва підприємства, його товарний знак та адресу, назву препарату латинською та іншими мовами, концентрацію, об'єм препарату в мілілітрах, кількість ампул в упаковці, «Стерильно», «Для ін'єкцій», умови зберігання, реєстраційний номер, штриховий код, номер серії, термін придатності, кількість упаковок.

РОЗДІЛ 10. ОПИС ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ЗГІДНО

АНД

Проект АНД на інактивовану вакцину проти ВПГ-2

Основні фізико-хімічні властивості: ліофільно висушена пориста маса білого кольору, гігроскопічна; після розчинення – опалесцююча безбарвна рідина. Вакцина обов’язково проходить високий ступінь очищення та відповідає вимогам ВООЗ для інактивованих вакцин проти генітального герпесу.

Склад: інактивований вірус простого герпесу людини, 5 доз 2,5 МО, β-глюкан (ад’ювант), допоміжні речовини. Розчинник: вода для ін’єкцій – 2,5 мл. Вакцина не містить консервантів.

Форма випуску: ліофілізат для приготування розчину для внутрішньом’язового (далі в/м) введення у вигляді пористої маси білого кольору – 5 доз містить 2,5 МО інактивованого вірусу герпесу.

Фармакологічна група: лікарські засоби, що корегують процеси імунітету.

Фармакологічні властивості: противірусна вакцина. Очищений антиген вірусу простого герпесу II-типу (генітального). Код АТХ: J07BX.

Імунобіологічні і біологічні властивості: імунобіологічний препарат, який призводить до утворення імунітету.

Фармакологічні властивості: препарат містить інактивований вірус проти герпесу людини, який стимулює утворення специфічних гуморальних антитіл, клітинну й гуморальну імунні системи. Ад’ювант (β-глюкан): індукує чітку вроджену імунну пам’ять у диференційованих макрофагів, забезпечує тренований імунітет (індукований агоністичними властивостями β-глюкану до TLR), має Th1-стимулюючі властивості, впливає на транскрипцію ключових генів цитокінів – INF-с та IL-12 та стимулює клітини до секреції IL-2 та INF-γ, посилює продукцію

					НУХТ БТЕК 02.02.02 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив(ла)	Белемєць Т.О.				РОЗДІЛ 10 ОПИС ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ЗГІДНО АНД	Літ.	Арк.
Консультант							223
Керівник	Красінько В.О.					184	
Н. Контр.						Кафедра БТМ	
Зав. Каф.	Стабніков В.П.						

прозапальних цитокінів IL-6, IL-8 і TNF- α в макрофагах THP-1 (необхідно для регуляції запального процесу), підвищує загальний титр імуноглобулінів крові (IgA, IgM, IgG), а також викликає посилену реакцію (лейкоцитів) на вторинну стимуляцію відповідним патогеном.

Фармакокінетика: не застосовується.

Показання для застосування: препарат застосовується для лікувально-профілактичної імунізації людей, у яких підтверджено вірус простого герпесу, та з метою попередження загострення герпетичної інфекції. Активна імунізація пацієнтів із загостренням хронічних інфекцій, що викликані вірусами *Herpesviridae* (можлива три або більше разів протягом року); специфічної профілактики рецидивів генітальної герпетичної інфекції. Ефективний при ВПГ-2, викликаного вірусом II-типу. Важливо: препарат рекомендовано вводити людям без симптомів герпесу, однак з високим титром антитіл до *Herpes simplex II type*. Дана інактивована вакцина з β -глюканом у якості безпечного ад'юванта, може бути показана для людей похилого віку, людей зі слабкою імунною відповіддю (включно із новонародженими), осіб із ослабленим імунітетом.

Спосіб застосування та дози: вміст флакона із вакциною розчиняють у 2,5 мл води для ін'єкцій. Розчинену вакцину вводять повільно внутрішньом'язово у дельтоподібний м'яз плеча, дітям до 5 років – у верхню частину передньобоківної поверхні стегна. Введення вакцини у сідничну ділянку – неприпустиме. Зберігання розчиненої вакцини більше 5 хвилин – неприпустиме. Вакцинований повинен знаходитись під медичним наглядом упродовж 30 хв. після здійснення вакцинації. Місця для введення вакцини повинні бути оснащені засобами протишокової терапії.

Після курсу імунотерапії видається довідка із зазначенням типу та серії препаратів, курсу щеплень, післявакцинальних реакцій. Вакцина може використовуватися для вакцинації різних вікових категорій зазначених в інструкції до імунобіологічного препарату.

Побічні реакції: введення вакцини може супроводжуватись місцевою чи загальною реакцією.

Місцева реакція характеризується незначним набряком, почервонінням, свербінням, збільшенням регіональних лімфовузлів.

Загальна реакція може проявитись у вигляді нездужання, головного болю, слабкості, підвищення температури тіла (не вище 37,5 °C), втоми, що проходять без лікування.

Рекомендується симптоматична терапія, застосування гіпосенсибілізуючих та антигістамінних препаратів. В рідких випадках можуть бути зареєстровані неврологічні симптоми.

За умови виникнення більш виражених місцевих та запальних реакцій, розвитку загострення герпетичної інфекції, введення препарату слід одразу зупинити. Вакцинація може бути продовжена лише через 14 днів після повного зникнення клінічних проявів герпетичної інфекції та запальної реакції, як відповідь на введення вакцини.

Протипоказання: гострі інфекційні та неінфекційні захворювання у стадії загострення чи декомпенсації – щеплення проводять не раніше одного місяця після одужання (ремісії); системні алергічні реакції на попереднє введення даного препарату; алергічні реакції на антибіотики; вагітність; злоякісні новоутворення. Пацієнтам із гострими захворюваннями різної етіологічної природи, що супроводжуються лихоманкою, слід відкласти вакцинування; введення препарату можливе лише через місяць після повного одужання.

Взаємодія з іншими лікарськими препаратами: не рекомендується одночасно застосовувати з імуносупресивними препаратами та протималарійними лікарськими засобами. Протигерпетична вакцина повинна вводиться в суворо встановлених кількостях. Не слід підвищувати або знижувати дозу. Після проведення вакцинації проти герпесу, проведення інших вакцинацій – допускається мінімум через 2 місяці.

Особливості застосування: препарат не придатний до застосування при порушенні цілісності та маркування флаконів; при зміні кольору та прозорості; при закінченні терміну придатності; при неправильному зберіганні. Розкриття ампул та процедура вакцинації здійснюється за суворого дотримання правил

асептики. Неприпустиме змішування в одній ємкості з іншими медикаментами. Зберігання розчиненої вакцини більше 5 хвилин – недопустиме. Препарат не буде запобігати іншим герпетичним інфекціям, окрім генітального герпесу. Вакцинацію проводять в стадії ремісії, не раніше, ніж через 5 днів після повного зникнення клінічних проявів герпетичної інфекції.

Пакування: вакцину випускають по 1 флакону з 5 дозами вакцини. В упаковці вміщується 1 флакон. На упаковці нанесено назву вакцини латинською та українською мовами, підприємство – виробник, товарний знак та адресу, лікарську форму, кількість доз, кількість комплектів, «Розчин для ін'єкцій», умови зберігання, «Зберігати в недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер для країн-імпортерів. Номер серії та термін придатності можна вказувати на ампулі нанесенням фарби, у відповідності до ГОСТ 17768-90.

Маркування: на пачці нанесено назву вакцини латинською та українською мовами, підприємство – виробник, товарний знак та адресу, лікарську форму, кількість доз, кількість комплектів, «Розчин для ін'єкцій», умови зберігання, «Зберігати в недоступному для дітей місці», номер серії, реєстраційний номер, термін придатності, штрих-код, реєстраційний номер для країн-імпортерів. Номер серії та термін придатності вказують на пачці методом тиснення. Відповідно до ГОСТ 17768-90.

На етикетці-самоклейці, яку наносять на флакони, зазначають українсько та іншими мовами: назву лікарського засобу, штрих-код, інформацію (що ідентифікує кінцеву серію), дозу (що рекомендується для застосування людиною та вміст діючої речовини в ній), шлях введення імунобіологічного препарату, термін придатності, умови зберігання, назву і кількість усіх антимікробних консервантів, назви усіх допоміжних речовин (ад'ювантів, барвників або стабілізаторів, що входять до складу вакцин, тощо).

Транспортування та термін зберігання: транспортування в закритих транспортних засобах всіма видами критого транспорту за температури від 2 до 8 °С. Не заморожувати. Допускається транспортування вакцини при температурі до

25 °С протягом не більше 2 діб. Відповідно до ГОСТ 17768-90. Термін придатності – 36 місяців. Не застосовувати після закінчення терміну придатності, зазначеного на упаковці. Зберігати у місцях, не доступних для дітей.

Зберігання: зберігати потрібно в сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С.

Умови відпуску з аптек: відпускається лише в лікувально-профілактичних установах [298-300].

ПРОЕКТ АНАЛІТИЧНО – НОРМАТИВНОЇ ДОКУМЕНТАЦІЇ СПЕЦИФІКАЦІЯ

на ліофілізат для приготування розчину для в/м введення по 2,5 МО

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Пориста маса білого кольору. Після розведення – рідина з легкою опалесценцією	За п. 1 АНД, Візуальний контроль
Ідентифікація	Препарат являє собою ліофільно висушену масу з титром вірусу на 1 дозу 2,5 МО та специфічною реакцією з утворенням антитіл	За п. 2 АНД, Ерп 2.7.1
Розчинність	Вміст флакону повинен розчинятися протягом 2 хв за умови внесення в нього 1 мл розчинника при періодичному струшуванні	За п. 3 АНД, ДФУ 2.9.4
Прозорість	Препарат за ступенем каламутності має бути порівняний з еталонним розчином	За п. 4 ДФУ, 2.2.1
Забарвлення	Розчинений препарат має бути прозорим	За п. 5 ДФУ, Візуальний контроль
Механічні включення	Препарат має витримувати вимоги ДФУ	За п. 6 ДФУ 2.9.20 Візуальний контроль
рН	7,1 ± 0,2	Ерп 2.2.2
Об'єм, що витягається	Не менше 5 мл	За п. 7 ДФУ, 2.9.17
Аномальна токсичність	Препарат має бути нетоксичним	За п.8 ДФУ, 2.6.9
Бактеріальні ендотоксини	Не більше 2,5 МО на одну людську дозу	За п. 9 ДФУ, Ерп 2.6.14
Стерильність	Препарат має бути стерильним. В умовах випробувань не має проявляти антимікробної дії	За п. 10 ДФУ, Ерп 2.6.1
Пірогенність	Пірогенність відповідає тесту, який описаний в Європейській фармакопеї, або проводять введення розбавленої в 10 разів вакцини піддослідній тварині.	За п. 11 ДФУ, Ерп 2.6.8
Кількісне визначення білку (альбумін)	Максимально 50 мкг на одну людину	За п. 12 ДФУ, Ерп 2.7.1

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

Опис: флакон, що містить пористу масу білого кольору. Флакони скляні.

Зовнішній вигляд та вміст флакону контролюють візуально.

Ідентифікація: ліофільно висушена маса з титром вірусу 2,5 МО на 1 дозу, при якій визначається утворення специфічних антитіл.

Визначення імунохімічним методом: базується на утворенні нековалентно зв'язаних комплексів антиген-антитіло.

Розчинність: при додаванні розчинника (воду для ін'єкцій) у флакон з пористою масою, спостерігається її розчинення протягом 2 хв. при періодичному струшуванні. Проводиться візуальний контроль.

Прозорість: препарат після змішування повинен порівнюватись з еталонним розчином.

Забарвлення: розчин повинен бути прозорим, тобто не набувати ніяких забарвлених відтінків, якщо це трапляється, то препарат виготовлений технологічно неправильно. Проводиться візуальний контроль.

Механічні включення: контроль проводять візуальним способом відповідно до ДФУ. Переглядають зразки відібрані із розрахунку 80 флаконів на об'єм серії. Контейнери в яких виявлені механічні включення, вважають забракованими та відкладають у інший контейнер з позначкою «Брак». Якщо було виявлено більше ніж 7 флаконів з механічними включеннями, проводять додатковий контроль.

pH: $7,1 \pm 0,2$. Зазначено в Європейській Фармакопеї (2.2.2).

Об'єм, що витягається: об'єм, що витягається повинен бути не меншим ніж 5 мл (ДФУ 2.9.17).

Аномальна токсичність: препарат має бути не токсичним. Тест-доза має містити 2,5 МО вірусу герпесу людини. Вводять внутрішньочеревним способом одну дозу для людини, але не більше 1 мл кожній з п'яти здорових мишей масою від 17 г до 24 г. Дозу для людини зазначають на етикетці випробовуваного лікарського засобу або у супровідному документі. Спостерігають за тваринами протягом 7 діб. Зразок витримує випробування, якщо у жодної з тварин не виявляються ознаки інтоксикації. Якщо більше ніж одна тварина гине, зразок не

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

Бактеріальні ендотоксини: повинно бути не менше 2,5 МО на одну дозу. Визначається турбідометричним методом, який визначає каламутність розчину та його збільшення або зменшення. Спосіб кінетичної турбідометрії, який базується на часі (час потоку), необхідному для того аби реакційна суміш досягла заданого поглинання або швидкості за якого розчин каламутніє. Випробовування проводять зазвичай при температурі 37 ± 1 °C. За цими даними будують криву, по якій потім визначають концентрацію ендотоксину порівнюючи її зі стандартною кривою, яка наведена в Європейській Фармакопеї. Випробовування вважається пройденим, якщо виконуються такі умови:

- абсолютне значення коефіцієнта кореляції стандартної кривої та отриманої кривої буде більшим або дорівнюватиме 0,980;
- результат не перевищує значення, яке подане в описі вакцини, тому межа ендотоксину не повинна перевищувати вміст діючого агента у вакцині.

Стерильність: випробовування проводять в асептичних умовах. Випробування проводять, використовуючи метод мембранної фільтрації. Проводять відповідні негативні контрольні дослідження. Метод мембранної фільтрації треба використовувати в усіх випадках, коли природа випробовуваного лікарського засобу це дозволяє – для випробування лікарських засобів у вигляді водних розчинів, що піддаються фільтрації, спиртових або олійних лікарських засобів, лікарських засобів, які змішуються або розчиняються у водних або олійних розчинниках, що не мають антимікробної активності за умов випробування.

Випробування методом мембранної фільтрації. Використовують мембранні фільтри з номінальним розміром пор не більше 0,45 мкм, здатні ефективно затримувати мікроорганізми. Для водних, розведених спиртових розчинів та розчинів в оліях використовують, наприклад, целюлозно-нітратні мембранні фільтри, а для концентрованих спиртових розчинів – целюлозно-

ацетатні мембранні фільтри. Фільтраційну установку і мембранні фільтри стерилізують підходящим способом.

Водні розчини. Перед початком випробування рекомендується пропустити крізь мембранний фільтр невелику кількість підходящого стерильного розчинника, наприклад, нейтрального розчину 1 г/л м'ясного або казеїнового пептону з рН 7,1 $\pm$ 0,2. Вміст контейнера(ів) з випробовуваним зразком переносять на мембранний фільтр або мембранні фільтри. Якщо необхідно, попередньо доводять об'єм зразка відповідним стерильним розчинником до того самого об'єму, що і при перевірці придатності методики. Відразу фільтрують. Якщо лікарський засіб має антимікробну активність в умовах випробування, мембранний фільтр відмивають не менше трьох разів, пропускаючи крізь нього при кожному відмиванні той самий об'єм вибраного стерильного розчинника, що і при перевірці придатності методики. Загальний об'єм промивної рідини не має перевищувати п'яти порцій по 100 мл на один мембранний фільтр, навіть у тому разі, коли при перевірці придатності методики встановлено, що такий режим відмивання мембранних фільтрів – не дозволяє повністю усунути антимікробну активність лікарського засобу. Після відмивання мембранний фільтр переносять у живильне середовище або розрізають його (дотримуючись асептики) на дві рівні частини, кожную з яких поміщають у відповідне живильне середовище. Використовують ті самі кількості живильного середовища, що і при перевірці придатності методики. При використанні установки закритого типу живильне середовище вносять безпосередньо в установку. Посіви інкубують не менше 14 діб.

Пірогенність: тест проводять за допомогою готової вакцини, але розбавленої у 10 разів. Суть випробування полягає в тому, що вимірюють температуру тіла кроликів, після внутрішньовенного введення вакцини (стерильного розчину вакцини). Використовують здорових дорослих кроликів обох статей вагою не менше 1,5 кг, які проживали в приміщеннях, що задовольняли умови життя тварин. Випробування проводять за допомогою 3 кроликів. Попередньо розбавлений розчин повільно вводять в край вуха кролика протягом 4 хв. Температуру заміряють за 30...40 хв. до ін'єкції, потім після 3 годин після

ін'єкції. Записують температуру кожного кролика. Результат вважають негативним, якщо різниця між початковою температурою і кінцевою дорівнює 0,2 °С. Якщо результат інший, то випробовування проводять ще раз. Але існують так звані допустимі межі, вакцина вважається не пірогенною, якщо значення різниці температури потрапляє в проміжок від 1,15...2,65 °С.

Кількісне визначення білку (альбумін): максимальна доза 50 мкг на одну людську дозу. Визначається за імунохімічним методом. Метод прописаний в Європейській Фармакопеї (2.7.1) [298-300].

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Karch, C. P., & Burkhard, P. (2016). Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochemical pharmacology*, 120, 1-14.
2. Макарова, О. Є., Пенчук, Ю. М., & Гергель, М. В. (2011). *Сучасний стан розробки та застосування вакцин*, 4, 39-42.
3. Shah, R. R., Hassett, K. J., & Brito, L. A. (2017). Overview of vaccine adjuvants: introduction, history, and current status. *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols*, 1-13.
4. Mohan, T., Verma, P., & Rao, D. N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian journal of medical research*, 138(5), 779.
5. Facciola, A., Visalli, G., Laganà, A., & Di Pietro, A. (2022). An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives. *Vaccines*, 10(5), 819.
6. Ong, G. H., Lian, B. S. X., Kawasaki, T., & Kawai, T. (2021). Exploration of pattern recognition receptor agonists as candidate adjuvants. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 968.
7. Zhao, T., Cai, Y., Jiang, Y., He, X., Wei, Y., Yu, Y., & Tian, X. (2023). Vaccine adjuvants: Mechanisms and platforms. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 283.
8. Brito, L. A., Malyala, P., & O'Hagan, D. T. (2013, April). Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. *In Seminars in immunology* (Vol. 25, No. 2, pp. 130-145). Academic Press.
9. Apostolico, J. D. S., Lunardelli, V. A. S., Coirada, F. C., Boscardin, S. B., & Rosa, D. S. (2016). Adjuvants: classification, modus operandi, and licensing. *Journal of immunology research*, 2016.
10. Vanderslott, S., & Marks, T. (2021). Charting mandatory childhood vaccination policies worldwide. *Vaccine*, 39(30), 4054-4062.
11. Чернишова, Л. І., & Лапій, Ф. І. (2014). Сучасні технології виготовлення вакцин. *Здоров'я ребенка*, (4 (55)), 167-171.

12. Pulendran, B. (2021). S Arunachalam P, O'Hagan DT. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*, 20(6), 454-475.
13. De Gregorio, E., & Rappuoli, R. (2014). From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 505-514.
14. Kwissa, M., Nakaya, H. I., Oluoch, H., & Pulendran, B. (2012). Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(9), 2044-2055.
15. Harandi, A. M. (2018, October). Systems analysis of human vaccine adjuvants. *In Seminars in immunology* (Vol. 39, pp. 30-34). Academic Press.
16. Cid, R., & Bolívar, J. (2021). Platforms for production of protein-based vaccines: From classical to next-generation strategies. *Biomolecules*, 11(8), 1072.
17. Malik, A., Gupta, M., Gupta, V., Gogoi, H., & Bhatnagar, R. (2018). Novel application of trimethyl chitosan as an adjuvant in vaccine delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7959-7970.
18. Beirne, P. V., Hennessy, S., Cadogan, S. L., Shiely, F., ... & MacLeod, F. (2015). Needle size for vaccination procedures in children and adolescents. *Cochrane database of systematic reviews*, (6), 32-37.
19. Tadepalli, G., Konduru, B., Murali, H. S., & Batra, H. V. (2017). Intraperitoneal administration of a novel chimeric immunogen (rOP) elicits IFN- γ and IL-12p70 protective immune response in BALB/c mice against virulent Brucella. *Immunology Letters*, 192, 79-87.
20. Galson, J. D., Trück, J., ... & Kelly, D. F. van der Most (2016) Investigating the effect of AS03 adjuvant on the plasma cell repertoire following pH1N1 influenza vaccination. *Sci Rep*, 6, 37229.
21. Yang, J., Zhang, J., Han, T., Liu, C., ... & Yang, X. (2020). Effectiveness, immunogenicity, and safety of influenza vaccines with MF59 adjuvant in healthy people of different age groups: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 99(7).

22. Clark, T. W., Pareek, M., Hoschler, K., Dillon, H., ... & Stephenson, I. (2009). Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine. *New England Journal of Medicine*, 361(25), 2424-2435.
23. Desbien, A. L., Reed, S. J., Bailor, H. R., Cauwelaert, N. D., ... & Duthie, M. S. (2015). Squalene emulsion potentiates the adjuvant activity of the TLR4 agonist, GLA, via inflammatory caspases, IL- 18, and IFN- γ . *European journal of immunology*, 45(2), 407-417.
24. Coler, R. N., Day, T. A., Ellis, R., Piazza, F. M., ... & TBVPX-113 Study Team. (2018). The TLR-4 agonist adjuvant, GLA-SE, improves magnitude and quality of immune responses elicited by the ID93 tuberculosis vaccine: first-in-human trial. *npj Vaccines*, 3(1), 34.
25. Wimmers, F., Donato, M., Kuo, A., Ashuach, T., ... & Pulendran, B. (2021). The single-cell epigenomic and transcriptional landscape of immunity to influenza vaccination. *Cell*, 184 (15), 3915-3935.
26. Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., ... & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in immunology*, 30(1), 23-32.
27. Arunachalam, P. S., Charles, T. P., Joag, V., Bollimpelli, V. S., ... & Pulendran, B. (2020). T cell-inducing vaccine durably prevents mucosal SHIV infection even with lower neutralizing antibody titers. *Nature medicine*, 26(6), 932-940.
28. Liang, F., Lindgren, G., Sandgren, K. J., Thompson, E. A., ... & Loré, K. (2017). Vaccine priming is restricted to draining lymph nodes and controlled by adjuvant-mediated antigen uptake. *Science translational medicine*, 9(393), eaal2094.
29. Kasturi, S. P., Rasheed, M. A. U., Havenar-Daughton, C., Pham, M., ... & Pulendran, B. (2020). 3M-052, a synthetic TLR-7/8 agonist, induces durable HIV-1 envelope-specific plasma cells and humoral immunity in nonhuman primates. *Science immunology*, 5(48), eabb1025.
30. Lee, A., Scott, M. K., Wimmers, F., Arunachalam, P. S., ... & Pulendran, B. (2022). A molecular atlas of innate immunity to adjuvanted and live attenuated vaccines, in mice. *Nature communications*, 13(1), 549.

31. Гулянич, М., Недосєков, В., & Годовський, О. (2017). Ефективність вакцини, інактивованої проти інфекційного ринотрахеїту ВРХ. *Тваринництво України*, (3-4), 36-39.
32. Powell, B. S., Andrianov, A. K., & Fusco, P. C. (2015). Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clinical and experimental vaccine research*, 4(1), 23-45.
33. Ho, N. I., Huis in't Veld, L. G., Raaijmakers, T. K., & Adema, G. J. (2018). Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines?. *Frontiers in immunology*, 9, 2874.
34. Ho, N. I., Huis in't Veld, L. G., Raaijmakers, T. K., & Adema, G. J. (2018). Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines?. *Frontiers in immunology*, 9, 2874.
35. Pulendran, B., S. Arunachalam, P., & O'Hagan, D. T. (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(6), 454-475.
36. Rivas, E., Gómez-Arnáiz, M., Ricoy, J. R., Mateos, F., ... & Cabello, A. (2005). Macrophagic myofasciitis in childhood: a controversial entity. *Pediatric neurology*, 33(5), 350-356.
37. Gherardi, R. K., Coquet, M., Cherin, P., Belec, L., ... & Authier, F. J. (2001). Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain*, 124(9), 1821-1831.
38. Parmaksız, S., Pekcan, M., Özkul, A., Türkmen, E., ... & Şenel, S. (2023). In vivo evaluation of new adjuvant systems based on combination of Salmonella Typhi porins with particulate systems: Liposomes versus polymeric particles. *International Journal of Pharmaceutics*, 648, 123568.
39. Lee, D. H., Kim, S. H., Kang, W., Choi, Y. S., ... & Shin, E. C. (2011). Adjuvant effect of bacterial outer membrane vesicles with penta-acylated lipopolysaccharide on antigen-specific T cell priming. *Vaccine*, 29(46), 8293-8301.

40. Taleghani, N., Bozorg, A., Azimi, A., & Zamani, H. (2019). Immunogenicity of HPV and HBV vaccines: adjuvant activity of synthetic analogs of monophosphoryl lipid A combined with aluminum hydroxide. *Apmis*, 127(3), 150-157.
41. Hajam, I. A., Dar, P. A., Shahnawaz, I., Jaume, J. C., & Lee, J. H. (2017). Bacterial flagellin—a potent immunomodulatory agent. *Experimental & molecular medicine*, 49(9), e373-e373.
42. Murthy, K. G., Deb, A., Goonesekera, S., Szabó, C., & Salzman, A. L. (2004). Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5667-5675.
43. Bates, J. T., Uematsu, S., Akira, S., & Mizel, S. B. (2009). Direct stimulation of tlr5^{+/+} CD11c⁺ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7539-7547.
44. Huleatt, J. W., Nakaar, V., Desai, P., Huang, Y., ... & Powell, T. J. (2008). Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 26(2), 201-214.
45. Song, L., Zhang, Y., Yun, N. E., Poussard, A. L., ... & Paessler, S. (2009). Superior efficacy of a recombinant flagellin: H5N1 HA globular head vaccine is determined by the placement of the globular head within flagellin. *Vaccine*, 27(42), 5875-5884.
46. Delaney, K. N., Phipps, J. P., Johnson, J. B., & Mizel, S. B. (2010). A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral immunology*, 23(2), 201-210.
47. Lin, K. H., Chang, L. S., Tian, C. Y., Yeh, Y. C., ... & Leng, C. H. (2016). Carboxyl-terminal fusion of E7 into Flagellin shifts TLR5 activation to NLRC4/NAIP5 activation and induces TLR5-independent anti-tumor immunity. *Scientific reports*, 6(1), 24199.

48. Treanor, J. J., Taylor, D. N., Tussey, L., Hay, C., ... & Shaw, A. (2010). Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza–flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. *Vaccine*, 28(52), 8268-8274.
49. Daleke-Schermerhorn, M. H., Felix, T., Soprova, Z., ten Hagen-Jongman, C. M., ... & Luirink, J. (2014). Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach. *Applied and environmental microbiology*, 80(18), 5854-5865.
50. Zingl, F. G., Leitner, D. R., & Schild, S. (2020). Biogenesis of Gram-Negative OMVs. *Bacterial membrane vesicles: Biogenesis, functions and applications*, 23-46.
51. Krishnan, N., Kubiawicz, L. J., Holay, M., Zhou, J., ... & Zhang, L. (2022). Bacterial membrane vesicles for vaccine applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 185, 114294.
52. Mehanny, M., Lehr, C. M., & Fuhrmann, G. (2021). Extracellular vesicles as antigen carriers for novel vaccination avenues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 173, 164-180.
53. Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., ... & Schiffelers, R. M. (2016). Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 106, 148-156.
54. Elsharkasy, O. M., Nordin, J. Z., Hagey, D. W., de Jong, O. G., ... & Vader, P. (2020). Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how?. *Advanced drug delivery reviews*, 159, 332-343.
55. Buschmann, D., Mussack, V., ... & Byrd, J. B. (2021). Separation, characterization, and standardization of extracellular vesicles for drug delivery applications. *Advanced drug delivery reviews*, 174, 348-368.
56. Masforrol, Y., Gil, J., García, D., Noda, J., ... & González, L. J. (2017). A deeper mining on the protein composition of VA-MENGOC-BC®: An OMV-based vaccine against N. meningitidis serogroup B and C. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(11), 2548-2560.

57. Acevedo, R., Fernández, S., Zayas, C., Acosta, A., ... & Perez, J. L. (2014). Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Frontiers in immunology*, 5, 121.
58. Petousis-Harris, H., & Radcliff, F. J. (2019). Exploitation of *Neisseria meningitidis* group B OMV vaccines against *N. gonorrhoeae* to inform the development and deployment of effective gonorrhea vaccines. *Frontiers in immunology*, 10, 683.
59. Semchenko, E. A., Tan, A., Borrow, R., & Seib, K. L. (2019). The serogroup B meningococcal vaccine Bexsero elicits antibodies to *Neisseria gonorrhoeae*. *Clinical Infectious Diseases*, 69(7), 1101-1111.
60. Martiñón, S., Cisneros, A., Villicaña, S., Hernández-Miramontes, R., ... & Calderón-Vargas, P. (2019). Chemical and immunological characteristics of aluminum-based, oil-water emulsion, and bacterial-origin adjuvants. *Journal of immunology research*, 2019, 1-9.
61. Daleke-Schermerhorn, M. H., Felix, T., Soprova, Z., ten Hagen-Jongman, ... & Luirink, J. (2014). Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens by using an autotransporter approach. *Applied and environmental microbiology*, 80(18), 5854-5865.
62. Afrough, P., Karam, M. R. A., Vaziri, F., Behrouzi, A., & Siadat, S. D. (2020). Construction and assessment of the immunogenicity and bactericidal activity of fusion protein porin A from *Neisseria meningitidis* serogroups A and B admixed with OMV adjuvant as a novel vaccine candidate. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(6), 737.
63. Gan, Y., Li, C., Peng, X., Wu, S., ... & Ding, X. (2021). Fight bacteria with bacteria: Bacterial membrane vesicles as vaccines and delivery nanocarriers against bacterial infections. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 35, 102398.
64. Gnopo, Y. M., Watkins, H. C., Stevenson, T. C., DeLisa, M. P., ... & Putnam, D. (2017). Designer outer membrane vesicles as immunomodulatory systems—Reprogramming bacteria for vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 132-142.

65. Toussaint, B., Chauchet, X., Wang, Y., Polack, B., & Gouëllec, A. L. (2013). Live-attenuated bacteria as a cancer vaccine vector. *Expert review of vaccines*, 12(10), 1139-1154.
66. de Laval, B., Maurizio, J., Kandalla, P. K., Brisou, G., ... & Sieweke, M. H. (2020). C/EBP β -dependent epigenetic memory induces trained immunity in hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*, 26(5), 657-674.
67. Rusek, P., Wala, M., Druszczyńska, M., & Fol, M. (2018). Infectious agents as stimuli of trained innate immunity. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 456.
68. Hernandez, A., Patil, N. K., Stothers, C. L., Luan, L., ... & Bohannon, J. K. (2019). Immunobiology and application of toll-like receptor 4 agonists to augment host resistance to infection. *Pharmacological research*, 150, 104502.
69. Sánchez-Ramón, S., Conejero, L., Netea, M. G., Sancho, D., ... & Subiza, J. L. (2018). Trained immunity-based vaccines: a new paradigm for the development of broad-spectrum anti-infectious formulations. *Frontiers in immunology*, 9, 2936.
70. Palgen, J. L., Feraoun, Y., Dzangué-Tchoupou, G., Joly, C., ... & Beignon, A. S. (2021). Optimize prime/boost vaccine strategies: trained immunity as a new player in the game. *Frontiers in Immunology*, 12, 612747.
71. Pulendran, B., S. Arunachalam, P., & O'Hagan, D. T. (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(6), 454-475.
72. Biering-Sørensen, S., Aaby, P., Lund, N., Monteiro, I., ... & Benn, C. S. (2017). Early BCG-Denmark and neonatal mortality among infants weighing < 2500 g: a randomized controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*, 65(7), 1183-1190.
73. Bruxvoort, K. J., Ackerson, B., Sy, L. S., Bhavsar, A., ... & Qian, L. (2022). Recombinant adjuvanted zoster vaccine and reduced risk of coronavirus disease 2019 diagnosis and hospitalization in older adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 225(11), 1915-1922.

74. Walk, J., de Bree, L. C. J., Graumans, W., Stoter, R., ... & Sauerwein, R. W. (2019). Outcomes of controlled human malaria infection after BCG vaccination. *Nature communications*, 10(1), 874.
75. Mifsud, E. J., Tan, A. C., & Jackson, D. C. (2014). TLR agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease. *Frontiers in immunology*, 5, 79.
76. Biering-Sørensen, S., Aaby, P., Lund, N., Monteiro, I., ... & Benn, C. S. (2017). Early BCG-Denmark and neonatal mortality among infants weighing < 2500 g: a randomized controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*, 65(7), 1183-1190.
77. Aaby, P., Martins, C. L., Garly, M. L., Balé, C., ... & Whittle, H. C. (2010). Non-specific effects of standard measles vaccine at 4.5 and 9 months of age on childhood mortality: randomised controlled trial. *Bmj*, 341.
78. Bruxvoort, K. J., Ackerson, B., Sy, L. S., Bhavsar, A., ... & Qian, L. (2022). Recombinant adjuvanted zoster vaccine and reduced risk of coronavirus disease 2019 diagnosis and hospitalization in older adults. *The Journal of Infectious Diseases*, 225(11), 1915-1922.
79. Wimmers, F., Donato, M., Kuo, A., Ashuach, T., ... & Pulendran, B. (2021). The single-cell epigenomic and transcriptional landscape of immunity to influenza vaccination. *Cell*, 184(15), 3915-3935.
80. Owen, A. M., Fults, J. B., Patil, N. K., Hernandez, A., ... & Bohannon, J. K. (2021). TLR agonists as mediators of trained immunity: mechanistic insight and immunotherapeutic potential to combat infection. *Frontiers in Immunology*, 11, 622614.
81. Wang, Q., Sheng, X., Shi, A., Hu, H., ... & Liu, H. (2017). β -Glucans: Relationships between modification, conformation and functional activities. *Molecules*, 22(2), 257.
82. Colaço, M., Roquito, T., Costa, J. P., Cruz, M. T., & Borges, O. (2023). The Effect of Curcumin-Loaded Glucan Nanoparticles on Immune Cells: Size as a Critical Quality Attribute. *Pharmaceutics*, 15(2), 623-638.

83. Han, B., Baruah, K., Cox, E., Vanrompay, D., & Bossier, P. (2020). Structure-functional activity relationship of β -glucans from the perspective of immunomodulation: a mini-review. *Frontiers in immunology*, 11, 658.
84. Mitroulis, I., Ruppova, K., Wang, B., Chen, L. S., ... & Chavakis, T. (2018). Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell*, 172(1), 147-161.
85. Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H., Rao, N. A., ... & Stunnenberg, H. G. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, 345(6204), 1251086.
86. Dos Santos, J. C., de Figueiredo, A. M. B., Silva, M. V. T., Cirovic, B., ... & Joosten, L. A. (2019). β -Glucan-induced trained immunity protects against *Leishmania braziliensis* infection: a crucial role for IL-32. *Cell reports*, 28(10), 2659-2672.
87. Novakovic, B., Habibi, E., Wang, S. Y., Arts, R. J., ... & Stunnenberg, H. G. (2016). β -Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance. *Cell*, 167(5), 1354-1368.
88. Ji, L., Sun, G., Li, J., Wang, Y., ... & Liu, Y. (2017). Effect of dietary β -glucan on growth, survival and regulation of immune processes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*. *Fish & shellfish immunology*, 64, 56-67.
89. Yun, C. H., Estrada, A., Van Kessel, A., Park, B. C., & Laarveld, B. (2003). β -Glucan, extracted from oat, enhances disease resistance against bacterial and parasitic infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(1), 67-75.
90. Ciarlo, E., Heinonen, T., Théroude, C., Asgari, F., ... & Roger, T. (2020). Trained immunity confers broad-spectrum protection against bacterial infections. *The Journal of infectious diseases*, 222(11), 1869-1881.
91. De Smet, R., Allais, L., & Cuvelier, C. A. (2014). Recent advances in oral vaccine development: Yeast-derived β -glucan particles. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(5), 1309-1318.

92. Mentrup, T., Stumpff-Niggemann, A. Y., Leinung, N., Schlosser, C., ... & Schröder, B. (2022). Phagosomal signalling of the C-type lectin receptor Dectin-1 is terminated by intramembrane proteolysis. *Nature Communications*, 13(1), 1880.
93. Hurtgen, B. J., Hung, C. Y., Ostroff, G. R., Levitz, S. M., & Cole, G. T. (2012). Construction and evaluation of a novel recombinant T cell epitope-based vaccine against coccidioidomycosis. *Infection and immunity*, 80(11), 3960-3974.
94. Huang, H., Ostroff, G. R., Lee, C. K., Agarwal, ... & Levitz, S. M. (2012). Relative contributions of dectin-1 and complement to immune responses to particulate β -glucans. *The Journal of Immunology*, 189(1), 312-317.
95. Soto, E. R., Caras, A. C., Kut, L. C., Castle, M. K., & Ostroff, G. R. (2012). Glucan particles for macrophage targeted delivery of nanoparticles. *Journal of drug delivery*, 2012.
96. Mirza, Z., Soto, E. R., Dikengil, F., Levitz, S. M., & Ostroff, G. R. (2017). Beta-glucan particles as vaccine adjuvant carriers. *Vaccines for Invasive Fungal Infections: Methods and Protocols*, 143-157.
97. Hwang, J., Lee, K., Gilad, A. A., & Choi, J. (2018). Synthesis of beta-glucan nanoparticles for the delivery of single strand DNA. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23, 144-149.
98. Soto, E. R., Specht, C. A., Rus, F., Lee, C. K., ... & Ostroff, G. R. (2023). An efficient (nano) silica-In glucan particles protein encapsulation approach for improved thermal stability. *Journal of Controlled Release*, 357, 175-184.
99. De Smet, R., Demoor, T., Verschuere, S., Dullaers, M., ... & Cuvelier, C. A. (2013). β -Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. *Journal of controlled release*, 172(3), 671-678.
100. Berner, V. K., Sura, M. E., ... & Hunter, K. W. (2008). Conjugation of protein antigen to microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. *Applied microbiology and biotechnology*, 80, 1053-1061.

101. De Smet, R., Demoor, T., Verschuere, S., Dullaers, M., ... & Cuvelier, C. A. (2013). β -Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. *Journal of controlled release*, 172(3), 671-678.
102. Berner, V. K., Sura, M. E., & Hunter, K. W. (2008). Conjugation of protein antigen to microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. *Applied microbiology and biotechnology*, 80, 1053-1061.
103. De Smet, R., Demoor, T., Verschuere, S., Dullaers, M., ... & Cuvelier, C. A. (2013). β -Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. *Journal of controlled release*, 172(3), 671-678.
104. Huang, H., Ostroff, G. R., Lee, C. K., Specht, C. A., & Levitz, S. M. (2013). Characterization and optimization of the glucan particle-based vaccine platform. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(10), 1585-1591.
105. Berner, M. D., Sura, M. E., Alves, B. N., & Hunter Jr, K. W. (2005). IFN- γ primes macrophages for enhanced TNF- α expression in response to stimulatory and non-stimulatory amounts of microparticulate β -glucan. *Immunology letters*, 98(1), 115-122.
106. Yu, X., Zhang, D., Shi, B., Ren, G., ... & Yuan, Z. (2015). Oral administered particulate yeast-derived glucan promotes hepatitis B virus clearance in a hydrodynamic injection mouse model. *PLoS One*, 10(4), e0123559.
107. Liu, M., Luo, F., Ding, C., Albeituni, S., ... & Yan, J. (2015). Dectin-1 activation by a natural product β -glucan converts immunosuppressive macrophages into an M1-like phenotype. *The Journal of Immunology*, 195(10), 5055-5065.
108. Chaichian, S., Moazzami, B., Sadoughi, F., Haddad Kashani, H., & Asemi, Z. (2020). Functional activities of beta-glucans in the prevention or treatment of cervical cancer. *Journal of Ovarian Research*, 13, 1-12.
109. Sadoughi, F., Asemi, Z., Hallajzadeh, J., Mansournia, M. A., & Yousefi, B. (2022). Beta-glucans is a potential inhibitor of ovarian cancer: based on molecular and biological aspects. *Current pharmaceutical biotechnology*, 23(9), 1142-1152.

110. Peymaeei, F., Sadeghi, F., Safari, E., Khorrami, S., ... & Roudbary, M. (2020). Candida albicans beta-glucan induce anti-cancer activity of mesenchymal stem cells against lung cancer cell line: an in-vitro experimental study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 21(3), 837.
111. Sadoughi, F., Asemi, Z., Hallajzadeh, J., Mansournia, M. A., & Yousefi, B. (2022). Beta-glucans is a potential inhibitor of ovarian cancer: based on molecular and biological aspects. *Current pharmaceutical biotechnology*, 23(9), 1142-1152.
112. Geller, A., Shrestha, R., & Yan, J. (2019). Yeast-derived β -glucan in cancer: novel uses of a traditional therapeutic. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3618.
113. Caseiro, C., Dias, J. N. R., de Andrade Fontes, C. M. G., ... & Bule, P. (2022). From cancer therapy to winemaking: The molecular structure and applications of β -glucans and β -1, 3-glucanases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3156.
114. Sadoughi, F., Asemi, Z., Hallajzadeh, J., Mansournia, M. A., ... & Yousefi, B. (2022). Beta-glucans is a potential inhibitor of ovarian cancer: based on molecular and biological aspects. *Current pharmaceutical biotechnology*, 23(9), 1142-1152.
115. Miyamoto, N., Mochizuki, S., & Sakurai, K. (2018). Designing an immunocyte-targeting delivery system by use of beta-glucan. *Vaccine*, 36(1), 186-189.
116. Berner, V. K., Redelman, D., & Hunter, K. W. (2015). Microparticulate β -glucan vaccine conjugates phagocytized by dendritic cells activate both naïve CD4 and CD8 T cells in vitro. *Cellular Immunology*, 298(1-2), 104-114.
117. Berner, V. K., Redelman, D., & Hunter, K. W. (2015). Microparticulate β -glucan vaccine conjugates phagocytized by dendritic cells activate both naïve CD4 and CD8 T cells in vitro. *Cellular Immunology*, 298(1-2), 104-114..
118. De Smet, R., Allais, L., & Cuvelier, C. A. (2014). Recent advances in oral vaccine development: Yeast-derived β -glucan particles. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(5), 1309-1318.

119. De Smet, R., Demoor, T., Verschuere, S., Dullaers, M., ... & Cuvelier, C. A. (2013). β -Glucan microparticles are good candidates for mucosal antigen delivery in oral vaccination. *Journal of controlled release*, 172(3), 671-678.
120. Cheng, S. C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., ... & Netea, M. G. (2014). mTOR-and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*, 345(6204), 1250684.
121. Rodríguez, F. E., Valenzuela, B., Farías, A., Sandino, A. M., & Imarai, M. (2016). β -1, 3/1, 6-Glucan-supplemented diets antagonize immune inhibitory effects of hypoxia and enhance the immune response to a model vaccine. *Fish & shellfish immunology*, 59, 36-45.
122. Pavan, T. R., Di Domenico, J., Kirsten, K. S., Nied, C. O., & Kreutz, L. C. (2016). Antibody response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) immunized with a model antigen associated with different adjuvants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49.
123. Wang, J., Dong, S., Liu, C., Wang, W., ... & Qu, D. (2010). -Glucan Oligosaccharide Enhances T Cells Immune Response Induced by a DNA Vaccine Encoding Hepatitis B Virus Core Antigen. *BioMed Research International*, 2010.
124. Baert, K., De Geest, B. G., De Rycke, R., ... & Devriendt, B. (2015). β -glucan microparticles targeted to epithelial APN as oral antigen delivery system. *Journal of controlled release*, 220, 149-159.
125. Donadei, A., Gallorini, S., Berti, F., O'Hagan, D. T., ... & Baudner, B. C. (2015). Rational design of adjuvant for skin delivery: Conjugation of synthetic β -glucan dectin-1 agonist to protein antigen. *Molecular pharmaceutics*, 12(5), 1662-1672.
126. Huang, H., Ostroff, G. R., Lee, C. K., Specht, C. A., ... & Levitz, S. M. (2010). Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded β -glucan particles. *MBio*, 1(3), 10-1128.
127. Kobiyama, K., Temizoz, B., Kanuma, T., Ozasa, K., ... & Ishii, K. J. (2016). Species- dependent role of type I IFNs and IL- 12 in the CTL response induced by humanized CpG complexed with β - glucan. *European journal of immunology*, 46(5), 1142-1151.

128. Mochizuki, S., Morishita, H., Kobiyama, K., Aoshi, T., ... & Sakurai, K. (2015). Immunization with antigenic peptides complexed with β -glucan induces potent cytotoxic T-lymphocyte activity in combination with CpG-ODNs. *Journal of Controlled Release*, 220, 495-502.
129. Miyamoto, N., Mochizuki, S., & Sakurai, K. (2018). Designing an immunocyte-targeting delivery system by use of beta-glucan. *Vaccine*, 36(1), 186-189.
130. Dong, S. F., Chen, J. M., Zhang, W., Sun, S. H., ... & Qu, D. (2007). Specific immune response to HBsAg is enhanced by β -glucan oligosaccharide containing an α -(1 $\rightarrow$ 3)-linked bond and biased towards M2/Th2. *International immunopharmacology*, 7(6), 725-733.
131. Stuyven, E., Verdonck, F., Van Hoek, I., Daminet, S., ... & Cox, E. (2010). Oral administration of β -1, 3/1, 6-glucan to dogs temporally changes total and antigen-specific IgA and IgM. *Clinical and vaccine immunology*, 17(2), 281-285.
132. Wang, J., Dong, S., Liu, C., Wang, W., ... & Qu, D. (2010). -Glucan Oligosaccharide Enhances T Cells Immune Response Induced by a DNA Vaccine Encoding Hepatitis B Virus Core Antigen. *BioMed Research International*, 2010.
133. Berner, V. K., Sura, M. E., & Hunter, K. W. (2008). Conjugation of protein antigen to microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. *Applied microbiology and biotechnology*, 80, 1053-1061.
134. Qiao, W., Ji, S., Zhao, Y., & Hu, T. (2015). Conjugation of β -glucan markedly increase the immunogenicity of meningococcal group Y polysaccharide conjugate vaccine. *Vaccine*, 33(17), 2066-2072.
135. Donadei, A., Balocchi, C., Romano, M. R., Panza, L., ... & Baudner, B. C. (2017). Optimizing adjuvants for intradermal delivery of MenC glycoconjugate vaccine. *Vaccine*, 35(32), 3930-3937.
136. Kobiyama, K., Temizoz, B., Kanuma, T., Ozasa, K., Momota, M., Yamamoto, T., ... & Ishii, K. J. (2016). Species- dependent role of type I IFNs and IL- 12 in the CTL response induced by humanized CpG complexed with β - glucan. *European journal of immunology*, 46(5), 1142-1151.

137. Wang, M., Yang, R., Zhang, L., Meng, X., ... & Hu, Y. (2014). Sulfated glucan can improve the immune efficacy of Newcastle disease vaccine in chicken. *International journal of biological macromolecules*, 70, 193-198.
138. Guo, Z., Hu, Y., Wang, D., Ma, X., Zhao, X., Zhao, B., ... & Liu, P. (2009). Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of lentinan and improve the immune effect of ND vaccine. *Vaccine*, 27(5), 660-665.
139. Le, T. H., Le, T. B., Doan, T. H. T., Quyen, D. V., ... & Agatsuma, T. (2011). The Adjuvant Effect of Sophy β -Glucan to the Antibody Response in Poultry Immunized by the Avian Influenza A H5N1 and H5N2 Vaccines. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21(4), 405-411/
140. Wang, M., Zhang, L., Yang, R., Fei, C., ... & Xue, F. (2016). Improvement of immune responses to influenza vaccine (H5N1) by sulfated yeast beta-glucan. *International journal of biological macromolecules*, 93, 203-207.
141. Wang, M., Yang, R., Zhang, L., Meng, X., ... & Hu, Y. (2014). Sulfated glucan can improve the immune efficacy of Newcastle disease vaccine in chicken. *International journal of biological macromolecules*, 70, 193-198.
142. Berner, V. K., Redelman, D., & Hunter, K. W. (2015). Microparticulate β -glucan vaccine conjugates phagocytized by dendritic cells activate both naïve CD4 and CD8 T cells in vitro. *Cellular Immunology*, 298(1-2), 104-114.
143. Soares, E., Jesus, S., & Borges, O. (2018). Chitosan: β -glucan particles as a new adjuvant for the hepatitis B antigen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 131, 33-43.
144. Urbancikova, I., Hudackova, D., Majtan, J., Rennerova, Z., ... & Jesenak, M. (2020). Efficacy of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in the management of herpes simplex virus type 1 infection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
145. Pence, B. D., Hester, S. N., Donovan, S. M., ... & Woods, J. A. (2012). Dietary whole glucan particles do not affect antibody or cell-mediated immune responses to influenza virus vaccination in mice. *Immunological investigations*, 41(3), 275-289.

146. Leentjens, J., Quintin, J., Gerretsen, J., Kox, M., ... & Netea, M. G. (2014). The effects of orally administered Beta-glucan on innate immune responses in humans, a randomized open-label intervention pilot-study. *PloS one*, 9(9), e108794.
147. De Marco Castro, E., Calder, P. C., & Roche, H. M. (2021). β - 1, 3/1, 6-glucans and Immunity: State of the Art and Future Directions. *Molecular nutrition & food research*, 65(1), 1901071.
148. Elder, M. J., Webster, S. J., Chee, R., Williams, D. L., ... & Goodall, J. C. (2017). β -Glucan size controls dectin-1-mediated immune responses in human dendritic cells by regulating IL-1 β production. *Frontiers in Immunology*, 8, 791.
149. Moni, S. S., Abdelwahab, S. I., Jabeen, A., Elmobark, M. E., Aqaili, D., Ghoal, G., ... & Mohammad Alowayni, A. M. H. (2023). Advancements in Vaccine Adjuvants: The Journey from Alum to Nano Formulations. *Vaccines*, 11(11), 1704.
150. Owen, A. M., Fults, J. B., Patil, N. K., Hernandez, A., & Bohannon, J. K. (2021). TLR agonists as mediators of trained immunity: mechanistic insight and immunotherapeutic potential to combat infection. *Frontiers in Immunology*, 11, 622614.
151. Zhao, T., Cai, Y., Jiang, Y., He, X., ... & Tian, X. (2023). Vaccine adjuvants: Mechanisms and platforms. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 283.
152. Facciola, A., Visalli, G., Laganà, A., & Di Pietro, A. (2022). An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives. *Vaccines*, 10(5), 819.
153. Mohan, T., Verma, P., & Rao, D. N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian journal of medical research*, 138(5), 779.
154. Kumar, S., Sunagar, R., & Gosselin, E. (2019). Bacterial protein toll-like-receptor agonists: a novel perspective on vaccine adjuvants. *Frontiers in immunology*, 10, 1144.
155. Tan, K., Li, R., Huang, X., & Liu, Q. (2018). Outer membrane vesicles: current status and future direction of these novel vaccine adjuvants. *Frontiers in microbiology*, 9, 783.

156. Shah, V. B., Williams, D. L., & Keshvara, L. (2009). β -Glucan attenuates TLR2-and TLR4-mediated cytokine production by microglia. *Neuroscience letters*, 458(3), 111-115.
157. Mancini, F., Rossi, O., Necchi, F., & Micoli, F. (2020). OMV vaccines and the role of TLR agonists in immune response. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4416.
158. Tan, K., Li, R., Huang, X., & Liu, Q. (2018). Outer membrane vesicles: current status and future direction of these novel vaccine adjuvants. *Frontiers in microbiology*, 9, 783.
159. Van Der Pol, L., Stork, M., & van der Ley, P. (2015). Outer membrane vesicles as platform vaccine technology. *Biotechnology journal*, 10(11), 1689-1706.
160. Eldred, B. E., Dean, A. J., McGuire, T. M., & Nash, A. L. (2006). Vaccine components and constituents: responding to consumer concerns. *Medical journal of Australia*, 184(4), 170-175
161. Exley, C. (2014). Aluminium adjuvants and adverse events in sub-cutaneous allergy immunotherapy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 10(1), 1-5.
162. Facchini, F. A., Minotti, A., Luraghi, A., Romerio, A., ... & Peri, F. (2021). Synthetic glycolipids as molecular vaccine adjuvants: mechanism of action in human cells and in vivo activity. *Journal of medicinal chemistry*, 64(16), 12261-12272.
163. Mohan, T., Verma, P., & Rao, D. N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *The Indian journal of medical research*, 138(5), 779.
164. Burny, W., Callegaro, A., Bechtold, V., Clement, F., ... & ECR-002 Study Group. (2017). Different adjuvants induce common innate pathways that are associated with enhanced adaptive responses against a model antigen in humans. *Frontiers in immunology*, 8, 943.
165. Vono, M., Taccone, M., Caccin, P., Gallotta, M., ... & Seubert, A. (2013). The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 21095-21100.

166. Kim, E. H., Woodruff, M. C., Grigoryan, L., Maier, B., ... & Pulendran, B. (2020). Squalene emulsion-based vaccine adjuvants stimulate CD8 T cell, but not antibody responses, through a RIPK3-dependent pathway. *Elife*, 9, e52687.
167. Klinman, D. M. (2003). CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert review of vaccines*, 2(2), 305-315.
168. Netea, M. G., & van der Meer, J. W. (2017). Trained immunity: an ancient way of remembering. *Cell host & microbe*, 21(3), 297-300.
169. Kanjan, P., Sahasrabudhe, N. M., de Haan, B. J., & de Vos, P. (2017). Immune effects of β -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. *Journal of functional foods*, 37, 433-440.
170. Arts, R. J., Moorlag, S. J., Novakovic, B., Li, Y., Wang, S. Y., ... & Netea, M. G. (2018). BCG vaccination protects against experimental viral infection in humans through the induction of cytokines associated with trained immunity. *Cell host & microbe*, 23(1), 89-100.
171. Biering-Sørensen, S., Aaby, P., Lund, N., Monteiro, I., ... & Benn, C. S. (2017). Early BCG-Denmark and neonatal mortality among infants weighing < 2500 g: a randomized controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*, 65(7), 1183-1190.
172. Arts, R. J., Novakovic, B., Ter Horst, R., Carvalho, A., ... & Netea, M. G. (2016). Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity. *Cell metabolism*, 24(6), 807-819.
173. Facciola, A., Visalli, G., Laganà, A., & Di Pietro, A. (2022). An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives. *Vaccines*, 10(5), 819.
174. Stothers, C. L., Burelbach, K. R., Owen, A. M., Patil, N. K., ... & Sherwood, E. R. (2021). β -glucan induces distinct and protective innate immune memory in differentiated macrophages. *The Journal of Immunology*, 207(11), 2785-2798.
175. Гудзенко, О. В., Белемєць, Т. О. (2021). *Імунологія та основи імунобіотехнологій: конспект лекцій*. НУХТ.

176. Geller, A., Shrestha, R., & Yan, J. (2019). Yeast-derived β -glucan in cancer: novel uses of a traditional therapeutic. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3618.
177. Sun, B., Yu, S., Zhao, D., Guo, S., ... & Zhao, K. (2018). Polysaccharides as vaccine adjuvants. *Vaccine*, 36(35), 5226-5234.
178. Stanfield, B. A., Kousoulas, K. G., Fernandez, A., & Gershburg, E. (2021). Rational Design of Live-Attenuated Vaccines against Herpes Simplex Viruses. *Viruses*, 13(8), 1637.
179. Alareeki, A., Osman, A. M., Khandakji, M. N., Looker, K. J., ... & Abu-Raddad, L. J. (2023). Epidemiology of herpes simplex virus type 2 in Europe: systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *The Lancet Regional Health—Europe*, 25.
180. Preda, M., Manolescu, L. S. C., & Chivu, R. D. (2023). Advances in Alpha Herpes Viruses Vaccines for Human. *Vaccines*, 11(6), 1094.
181. Локальні та іноваційні протоколи. Протокол № 19. Рецидивуючий герпес: генітальний та лабільний (*Herpes Labialis*). (2023.) Вилучено з <https://vitacell.com.ua/page11222.html>
182. Suárez, N., Ferrara, F., Rial, A., Dee, V., & Chabalgoity, J. A. (2020). Bacterial lysates as immunotherapies for respiratory infections: Methods of preparation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 545.
183. Sun, B., Yu, S., Zhao, D., Guo, S., ... & Zhao, K. (2018). Polysaccharides as vaccine adjuvants. *Vaccine*, 36(35), 5226-5234.
184. Fraser, K. A., Kangas, T., Fulton, R. B., Leonardo, S. M., ... & Gorden, K. B. (2018). Imprime PGG, a soluble yeast β -glucan PAMP, enhancement of anti-tumor responses in combination with tumor targeting antibody is highly dependent on NK cell killing. *Cancer Research*, 78(13_Supplement), 3767-3767.
185. McCann, F., Carmona, E., Puri, V., Pagano, R. E., & Limper, A. H. (2019). Macrophage internalization of fungal β -glucans is not necessary for initiation of related inflammatory responses. *Infection and immunity*, 73(10), 6340-6349.

186. Yu, S., Wang, J., Li, Y., Wang, X., ... & Wang, X. (2021). Structural studies of water-insoluble β -glucan from oat bran and its effect on improving lipid metabolism in mice fed high-fat diet. *Nutrients*, 13(9), 3254.
187. Ільїнська, І. Ф., Копосова, І. В., & Ткаченко, І. В. (2007). Загальна характеристика імуномодуляторів та їх класифікації. Вилучено з <ftp://ftp1.ifp.kiev.ua/original/2007/ilyinskaya.Pdf>.
188. Tverda, I. I., Yaremchuk, O. V., & Zhubryd, M. T. (2023). Роль імунокорекції в лікуванні інфекційних захворювань. *Likars'ka sprava*, (1), 19-27.
189. Господарська, Х. О, Гришук, Л. А. (2021). Можливості застосування бетаглюканів в імунореабілітації пацієнтів із запальними захворюваннями верхніх дихальних шляхів. *Медична газета «Здоров'я України 21 сторіччя»*, 4 (497):2060.
190. Сиза, О. І., Челябієва, В. М., & Савченко, О. М. (2018). *Технології полісахаридів та їх застосування в харчовій промисловості: конспект лекцій*. НУХТ.
191. *Полісахариди в косметології*. (2021). Вилучено з <https://www.pleyana.com/archive/betaglucan/>
192. Sampath, P. G. (2021). Market Shaping and Market Access in the Global Vaccines Market: *Approaches for the Future*. German International Agency (GIZ), (1), 3-21.
193. *Вакцинація дорослих: що важливо знати під час війни. Поради щодо ефективного захисту від небезпечних хвороб*. (2023). Вилучено з <https://www.unicef.org/ukraine/stories/vaccination-for-grown-ups-during-war>.
194. Watanabe, A. H., Veettil, S. K., Le, L. M., Bald, E., ... & Chaiyakunapruk, N. (2023). Clinical and Economic Implications of Increasing Access to Herpes Zoster Vaccination Rate in Community Pharmacies. *Journal of the American Pharmacists Association*.
195. *Застосування і ефективність вакцини від герпесу*. (2021). Вилучено з <https://bezbolezni.info/herpes/privivka-ot-gerpesa.html>
196. Мірошникова Є.О. *Вакцинація від герпесу*. (2021). Вилучено з <https://mrfilin.com/privivka-ot-gerpesa>

197. O'Rourke, B., Oortwijn, W., & Schuller, T. (2020). The new definition of health technology assessment: A milestone in international collaboration. *International journal of technology assessment in health care*, 36(3), 187-190.
198. Gennet, É., Mahalatchimy, A., Frischhut, M., Lau, P. L., ... & Hawrot, T. (2022). *Health as a fundamental value*. Towards an inclusive and equitable pharmaceutical strategy for the European Union (Doctoral dissertation, European Health Policy Platform of the European Commission).
199. Цілі Сталого Розвитку: Україна: національна доповідь. Мінекономрозвитку України, 2017. (2017). Вилучено з <https://www.kmu.gov.ua/storage/app/sites/1/natsionalna-dopovid-csrUkrainy.pdf>
200. Радкевич, Г. (2023). Аналіз проблем інтеграції оцінки медичних технологій в систему охорони здоров'я в контексті забезпечення населення України ліками та вакцинами.
201. Calabro, G. E., Carini, E., Tognetto, A., Giacchetta, I., ... & De Waure, C. (2022). The value (s) of vaccination: building the scientific evidence according to a value-based healthcare approach. *Frontiers in Public Health*, 10, 786662.
202. Сенюта І., Терешко Х. Вакцинація у запитаннях і відповідях: метод. рекомендації. Національна асоціація адвокатів України, Комітет медичного права і фармацевтичного права та біоетики. (2023). Вилучено з https://unba.org.ua/assets/uploads/77b7b540396ed691df9b_file.pdf.
203. Щеплення, вакцини, профілактика інфекційних захворювань у дорослих. (2023). Вилучено з <https://zdorovoepokolenie.dp.ua/uk/doroslym/vaktsynatsiia-shcheplennia>
204. Про затвердження Настанови з державної оцінки медичних технологій для лікарських засобів : Наказ МОЗ України від 29.03.2021 р. № 593. 61. (2021). Вилучено з <https://moz.gov.ua/article/ministry-mandates/nakaz-moz-ukraini-vid29032021--593-pro-zatverdzhennja-nastanovi-z-derzhavnoi-ocinki-medichnihtehnologij-dlja-likarskih-zasobiv>

205. Синиця, П. В. (2011). Генітальний герпес: етіопатогенетичні, клінікоепідеміологічні аспекти, комплексна діагностика та лікування, профілактика. Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология, 1-4, 115-129.

206. Лич, І. В. (2017). *Промислова технологія лікарських засобів: конспект лекцій*. НУХТ.

207. Турянська, Г. М., Грищук, Л. В. (2007). *Технологія лікарських форм промислового виробництва. Стерильні та асептично приготовлювані лікарські форми: навчально-методичний посібник*. ОНУ.

208. Градусов, В. І., Оридорога, Л. М., Винник, О. В. (2019). *Лікарські засоби і готові лікарські форми. Організація зберігання фармацевтичних товарів на аптечних складах і в аптечних умовах*. НФаУ.

209. *PCI intends to Acquire Pharmaceutical Packaging Professionals*. (2018).

Вилучено

3

https://www.manufacturingchemist.com/news/article_page/PCI_intends_to_acquire_Pharmaceutical_Packaging_Professionals/139495.

210. Закон України «Про затвердження методичних рекомендацій, щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів». №502, 14.12.2001.

211. Закон України «Про затвердження методичних рекомендацій, щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві стерильних лікарських засобів». №508, 14.12.2001.

212. Wu, Q., Dou, X., Wang, Q., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2018). Isolation of β -1, 3-glucanase-producing microorganisms from *Poria cocos* cultivation soil via molecular biology. *Molecules*, 23(7), 1555/

213. Мокросноп, В. М. (2018). Продуцирование запасного полісахарида парамілона мікроводоростями *Euglena gracilis* Klebs (*Euglena*, *Euglenophyceae*). *Альгология*

214. Qu, Y., Zhao, X., Guo, H., Meng, Y., ... & Sun, L. (2021). Structural analysis and macrophage activation of a novel β -glucan isolated from *Cantharellus cibarius*. *International Journal of Molecular Medicine*, 47(4), 1-1.

215. Zhang, M., Jin, X., & Yang, Y. F. (2019). β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* induces SBD-1 production in ovine ruminal epithelial cells via the Dectin-1–Syk–NF- κ B signaling pathway. *Cellular Signalling*, 53, 304-315.
216. Chen, X., Wang, Y., He, C. Y., Wang, G. L., ... & Wei, G. Y. (2021). Improved production of β -glucan by a T-DNA–based mutant of *Aureobasidium pullulans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(18), 6887-6898.
217. Philippini, R. R., Martiniano, S. E., dos Santos, J. C., da Silva, S. S., & Chandel, A. K. (2019). Fermentative Production of Beta- Glucan: Properties and Potential Applications. *Bioprocessing for biomolecules production*, 303-320.
218. Hu, J., Wu, Y., Xie, H., Shi, W., ... & Liu, Y. (2020). Purification, preliminary structural characterization, and in vitro inhibitory effect on digestive enzymes by β -glucan from *qingke* (Tibetan Hulless Barley). *Advances in Polymer Technology*, 2020.
219. Han, X. Q., Yue, G. L., Yue, R. Q., Dong, C. X., ... & Han, Q. B. (2014). Structure elucidation and immunomodulatory activity of a beta glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. *PLoS One*, 9(7), e100380.
220. Suzuki, T., Kusano, K., Kondo, N., Nishikawa, K., ... & Ohno, N. (2021). Biological activity of high-purity β -1, 3-1, 6-glucan derived from the black yeast *Aureobasidium pullulans*: A literature review. *Nutrients*, 13(1), 242.
221. Tel-Çayan, G., Çayan, F., Deveci, E., & Duru, M. E. (2021). Phenolic profile, antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of four *Trametes* species: *T. bicolor*, *T. pubescens*, *T. suaveolens*, and *T. versicolor*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(5), 4608-4616.
222. Yang, Y. M., Fu, X., Cui, F. J., Sun, L., ... & Sun, W. J. (2023). Biochemical and structural characterization of a glucan synthase GFGLS2 from edible fungus *Grifola frondosa* to synthesize β -1, 3-glucan. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 16(1), 163.
223. Zhang, M., Yan, M., Yang, J., Li, F., ... & Yang, B. (2022). Structural characterization of a polysaccharide from *Trametes sanguinea* Lloyd with immune-

enhancing activity via activation of TLR4. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206, 1026-1038.

224. Черно, Н. К., Озоліна, С. О., & Никітіна, О. В. (2013). Фракціонування полісахаридів гливи звичайної *Pleurotus ostreatus*. *Харчова наука і технологія*, (4), 30-34.

225. Yadav, D., & Negi, P. S. (2021). Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. *Food Research International*, 148, 110599.

226. Mironczuk-Chodakowska, I., Kujawowicz, K., & Witkowska, A. M. (2021). Beta-glucans from fungi: biological and health-promoting potential in the COVID-19 pandemic era. *Nutrients*, 13(11), 3960.

227. Boutros, J. A., Magee, A. S., & Cox, D. (2022). Comparison of structural differences between yeast β -glucan sourced from different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processed using proprietary manufacturing processes. *Food Chemistry*, 367, 130708.

228. Kim, K. S., & Yun, H. S. (2006). Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 496-500.

229. Pengkumsri N., Sudiana, A. D. G., Kuswendi, H., Dewi, V. Y. K., & Balia, R. L. (2022). The potential of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall as anti-cholesterol. *J Anim Health Prod*, 9(1), 72-77.

230. Zhang, M., Jin, X., & Yang, Y. F. (2019). β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* induces SBD-1 production in ovine ruminal epithelial cells via the Dectin-1–Syk–NF- κ B signaling pathway. *Cellular Signalling*, 53, 304-315.

231. Utama, G. L., Kurniawan, M. O., Cahyana, Y., & Balia, R. L. (2022). β -Glucan production through bioconversion of sugarcane bagasse by *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*. In *Innovations in Fermentation and Phytopharmaceutical Technologies* (pp. 397-416). Elsevier.

232. Utama, G. L., Dio, C., Sulistiyo, J., Chye, F. Y.,... & Singh, S. (2021). Evaluating comparative β -glucan production aptitude of *Saccharomyces cerevisiae*,

Aspergillus oryzae, *Xanthomonas campestris*, and *Bacillus natto*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 6765-6773.

233. Kaur, R., Sharma, M., Ji, D., Xu, M., & Agyei, D. (2019). Structural features, modification, and functionalities of beta-glucan. *Fibers*, 8(1), 1.

234. Avramia, I., & Amariei, S. (2021). Spent Brewer's yeast as a source of insoluble β -glucans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 825.

235. Suarez, N., Ferrara, F., Rial, A., Dee. (2020). Bacterial Lysates as Immunotherapies for Respiratory Infections: Methods of Preparation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(2), 545.

236. Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B. S., Sirilun, S., Peerajan, S., ... & Chaiyasut, C. (2016). Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology*, 37, 124-130.

237. Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B. S., Sirilun, S., Peerajan, S., ... & Chaiyasut, C. (2016). Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology*, 37, 124-130.

238. Freimund, S., Sauter, M., Käppeli, O., & Dutler, H. (2003). A new non-degrading isolation process for 1, 3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, 54(2), 159-171.

239. Клечак, І. Р., Бісько, Н. А., Митропольська, Н. Ю., & Антоненко, Л. О. (2014). Вплив джерел вуглецю і азоту в живильних середовищах на накопичення біомаси базидіальними лікарськими грибами роду *Trametes* (Fr.). *Research Bulletin of the National Technical University of Ukraine "Kyiv Politechnic Institute"*, (3), 52-57.

240. Клименко, О.Д., Селезньов, Е.Л., Герасимчук, О.П. (2012). *Хімічна технологія та обладнання підприємств: Електронний посібник*. ЛНТУ.

241. Законопроекти України. (2021). Вилучено з http://database.ukrcensus.gov.ua/PXWEB2007/ukr/news/op_popul.asp

242. Синиця, П.В. (2011). Генітальний герпес: етіопатогенетичні, клінікоепідеміологічні аспекти, комплексна діагностика та лікування,

профілактика. *Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология*, 1-4, 115-129.

243. *Населення України певних вікових категорій*. (2021). Вилучено з <https://countrymeters.info/ru/Ukraine>.

244. *Автоматична лінія розливу та закупорювання рідких препаратів у флакони. Модель ТБ-056*. (2019). Вилучено з <http://automatica.kiev.ua/tb056.html>.

245. *Типи центрифуг*. (2018). Вилучено з <http://medical-enc.com.ua/centrifugi.htm>

246. *Метод формального титрування*. (2018). Вилучено з доступу: <http://docs.cntd.ru/document/gost-25179-90>

247. Bzducha-Wróbel, A., Błażej, S., Kawarska, A., Stasiak-Róžańska, L., Gientka, I., & Majewska, E. (2014). Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β -glucan isolation. *Molecules*, 19(12), 20941-20961.

248. Varelas, V., Liouni, M., Calokerinos, A. C., & Nerantzis, E. T. (2016). An evaluation study of different methods for the production of β -D-glucan from yeast biomass. *Drug testing and analysis*, 8(1), 46-55.

249. Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Galović, P., Galović, V., ... & Srećec, S. (2010). Application of different drying methods on β -glucan isolated from spent brewer's yeast using alkaline procedure. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 75(1), 45-50.

250. *Типи центрифуг*. (2017). Вилучено з <https://labcentrifuge.ru/information/articles/405/>

251. Hemmo A. F., Taco W., Geert W. J. (2019). Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Genetically Undiagnosed Patients with Primary Immunodeficiencies: a Systematic Review. *J Clin Immunol*, 39(6), 577-591.

252. Кузнецова, Л. В., Бабаджана, В. Д., Фролова, В. М. (2012). *Клінічна та лабораторна імунологія*. ООО «Полиграф плюс».

253. Holst, O., Molinaro, A. (2009) Microbial Glycobiology: Structures Relevance and Applications. *J Elsevier*, 15(2), 48-57.

254. Du, L., Zhang, X., Wang, C., & Xiao, D. (2012). Preparation of water soluble yeast glucan by four kinds of solubilizing processes. *Engineering*, 4(10B), 184-88.
255. Shokri, H., Asadi, F., & Khosravi, A. R. (2008). Isolation of β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Natural product research*, 22(5), 414-421.
256. Карлаш, Ю.В. (2013). *Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій*. НУХТ.
257. Чуешов, В. И. (2002). *Промышленная технология лекарств*. НФАУ.
258. Hromádková, Z., Ebringerová, A., Sasinková, V., Šandula, J., ... & Omelková, J. (2003). Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers*, 51(1), 9-15.
259. Ультрафільтрація. (2018). Вилучено 3
<https://www.membranium.com/ru/about-us/articles/ultrafiltraciya-i-obratnyj-osmos/>
260. Khan, N. A., Khan, S. U., Ahmed, S., Farooqi, I. H., ... & Changani, F. (2020). Recent trends in disposal and treatment technologies of emerging-pollutants-A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115744.
261. Parvatker, A. G., Tunceroglu, H., Sherman, J. D., Coish, P., ... & Eckelman, M. J. (2019). Cradle-to-gate greenhouse gas emissions for twenty anesthetic active pharmaceutical ingredients based on process scale-up and process design calculations. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(7), 6580-6591.
262. Черних, В. П. (2010). *Фармацевтична енциклопедія*. Київ: МОРІОН.
263. Чуешов, В.И. (2002). *Промислова технологія ліків*. НФАУ.
264. Omarov, R., Shlykov, S., Rebezov, M., Sorokin, A., & Khlopova, Y. (2020). Technology Development of Whipped Drink based on Biomodified Blood Plasma. *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies*, 11(14), 1-9.
265. Sala, A., Barrena, R., Sanchez, A., & Artola, A. (2021). Fungal biopesticide production: Process scale-up and sequential batch mode operation with

Trichoderma harzianum using agro-industrial solid wastes of different biodegradability. *Chemical Engineering Journal*, 425, 131620.

266. Timakova, E. V., Timakova, T. E., Afonina, L. I., Bulina, N. V., ... & Yukhin, Y. M. (2023). Synthesis and study of bismuth (III) oxalates precipitated from mineral acid solutions. *Russian Journal of General Chemistry*, 93(9), 2295-2304.

267. Черно, Н. К., Коваленко, О. В., & Шапкина, К. І. (2012). Водорозчинний бета-глюкан *Saccharomyces cerevisiae*. *Харчова наука і технологія*, (4), 32-35.

268. Зони чистих приміщень та вимоги до них. Клас приміщення GMP. (2021). Вилучено з <https://profinstall.com.ua/ua/statt%D1%96/farmaczevtichne-virobnictvo/zonyi%20chistyix-pomeshhenij-i-trebovaniya-k-nim.-klass-pomeshheniya-gmp>

269. Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. (2001). Вилучено з <https://docs.dtki.ua/doc/1039.2472.1>

270. Зав'ялов, В.Л., Бодров, В.С., Мисюра, Т.Г. (2007). *Процеси і апарати біотехнологічних виробництв: курс лекцій*. НУХТ.

271. Kakad, S. B., Kolhe, M. H., & Dukre, T. P. (2020). A review on pharmaceutical validation. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 11(3), 338-342.

272. Зони чистих приміщень та вимоги до них. Клас приміщення GMP. (2022). Вилучено з <https://profinstall.com.ua/ua/statt%D1%96/farmaczevtichne-virobnictvo/zonyi%20chistyix-pomeshhenij-i-trebovaniya-k-nim.-klass-pomeshheniya-gmp>.

273. Saini, V., Sikri, K., Batra, S. D., Kalra, P., & Gautam, K. (2020). Development of a highly effective low-cost vaporized hydrogen peroxide-based method for disinfection of personal protective equipment for their selective reuse during pandemics. *Gut pathogens*, 12, 1-11.

274. Дезекон ОМ. (2022). Вилучено з <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om%20baltiachemi-kie/>
275. Дезінфектант БІОКООНТАКТ. (2022). Вилучено з <https://agronet.ua/obyavlenie/id25199-preparat-kormoviy-biokatalizatorniy>
276. Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., & De Noni, I. (2019). Airborne contamination in the food industry: An update on monitoring and disinfection techniques of air. *Trends in food science & technology*, 90, 147-156.
277. Grennan, M., & Town, R. J. (2020). Regulating innovation with uncertain quality: information, risk, and access in medical devices. *American Economic Review*, 110(1), 120-161.
278. Поводзинський, В. М., Шибецький В. Ю. (2017). Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів: конспект лекцій. КПІ.
279. Організація фармацевтичного виробництва. Основні вимоги. Вилучено з https://ips.ligazakon.net/document/situation-doc/SX170074?ed=2017_10_11.
280. Tran, P., Pyo, Y. C., Kim, D. H., Lee, S. E., Kim, J. K., & Park, J. S. (2019). Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs. *Pharmaceutics*, 11(3), 132.
281. Лич, І.В. (2017). Промислова технологія лікарських засобів: конспект лекцій. НУХТ.
282. Настанова СТ-Н МОЗУ 42–6.2:2021. Лікарські засоби доклінічна оцінка вакцин (2021). Вилучено з https://moz.gov.ua/uploads/6/32521-dn_1765_19_08_2021_dod.pdf.
283. Kakad, S. B., Kolhe, M. H., & Dukre, T. P. (2020). A review on pharmaceutical validation. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 11(3), 338-342.
284. ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ. Належна виробнича практика. (2020). Вилучено з https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/A3-42-4.0_2020.pdf.

285. *Настанова. ЛІКАРСЬКІ ЗАСОБИ. Належна виробнича практика. СТ-Н МОЗУ 42.-4.0:2016.* (2016). Вилучено з https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2018/10/GMP-1_2016.pdf.
286. Турянська, Г. М., Грищук, Л. В. (2007). *Технологія лікарських форм промислового виробництва. Стерильні та асептично приготовлювані лікарські форми: навчально-методичний посібник.* ОНУ.
287. *Стерилізуюча фільтрація і все, що ви хотіли про неї знати.* Вилучено з <https://analitic.ub.ua/19601-sterilizuyushchaya-filtraciya-i-vse-hto-vy-hoteli-o-ney-znat.html>.
288. Mishra, A., Saini, T. R., & Maurya, V. K. (2017). Process validation of lyophilization process. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 365-397.
289. *Robert Bosch GmbH Packaging Technology (Германия).* Вилучено з <https://b2b-postavki.ru/predstavitel/robert-bosch-gmbh-packaging-technology.html>.
290. *Фармацевтична галузь.* Вилучено з <https://promoboz.com/wp-content/uploads/2022/08/ParmGaluz0392.pdf>.
291. *Виробництво лікарських засобів (GMP).* Вилучено з <https://cratia.ua/ua/service/pharmaceutical-manufacturer-gmp/>.
292. Лебединець, В. О. (2014). Підготовка персоналу підприємства з виробництва лікарських засобів при впровадженні та в умовах функціонування системи управління якістю. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*, (1), 28-35.
293. Вороненко, Ю. В., Пономаренко, М. С., Соловйов, О. С., Черних, В. П., & Толочко, В. М. (2014). Нормативно-правові засади вдосконалення системи післядипломного навчання персоналу підприємств промислової фармації. Повідомлення І. Проект Положення про сертифікацію, ліцензування та атестацію персоналу підприємств фармацевтичної промисловості. *Фармацевтичний журнал*, (3), 3-12.
294. Смойловська, Г. П., Мазулін, О. В. (2018). *Фармацевтична технологія : навчальний посібник.* ЗДМУ.

295. World Health Organization. (1977). *Manual for the production and control of vaccines: tetanus toxoid* (No. BLG/UNDP/77.2 Rev. 1). World Health Organization.
296. Губин М.М. Вимоги, конструктивні особливості згідно з GMP. Вилучено з <https://www.vipsmed.ru/sections/information/publications/obshhie-statyi/upakovkadlya-lekarstvennyix-preparatov>.
297. Skorikov, A. V., Zabashta, N. N., Basova, N. Y., Yurina, N. A., Krivonos, R. A., & Chernykh, O. Y. (2018). The technology for the production of the vaccine for pseudomonosis of pigs. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(8), 2053-2055.
298. Закон України «Про затвердження методичних рекомендацій, щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві стерильних лікарських засобів». №508, 14.12.2001. (2001). Вилучено з https://zakononline.com.ua/documents/show/41907_487517
299. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів» (2024). <http://sphu.org/farm-centr>
300. PCI Completes Acquisition of Pharmaceutical Packaging Professionals. (2018). Виучено з <http://pciservices.com/pci-completes-acquisition-pharmaceutical-packaging-professionals>