

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»

Директор інституту (декан факультету)

Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (прізвище та ініціали)

«_02_» грудня 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

«_02_» грудня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

на тему: «Сучасні технології одержання генно-інженерних білків на прикладі виробництва факторів росту фібробластів»

Виконав: здобувачка II курсу, групи ЗПФБ-1-2М

ПАЛЬОНА Ірина Василівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент АНТОН ІВАСЮК
(прізвище та ініціали) (підпис)

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

Здобувачка Пальона І.В.
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра Біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 08 ” жовтня 2024 року

З А В Д А Н Н Я НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ПАЛЬОНОЇ Ірини Василівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи : «Сучасні технології одержання генно-інженерних білків на прикладі виробництва факторів росту фібробластів»

керівник роботи СТАБНІКОВ Віктор Петрович, д.т.н., проф.

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

затвержені наказом закладу вищої освіти від 07 жовтня 2024 року № 876-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 02.12.2024

3. Вихідні дані до роботи Ферментер об'ємом 200 л, потужність виробництва становить – 15,2 г рік; кількість трудоднів становить -1

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Реферат, Вступ, Розділ 1. Ознайомлення з факторами росту фібробластів та їх значенням, Розділ 2. Сучасні генно-інженерні технології виробництва факторів росту фібробластів, Розділ 3. Підходи до очищення генно-інженерних білків фактора росту фібробластів для можливості їх застосування у медико-терапевтичних цілях та у сільському господарстві, Розділ 4. Потенційні досягнення, майбутні напрямки, нові технології та їхній потенційний вплив на виробництво генно-інженерних білків факторів росту фібробластів, Розділ 5. Техніко-економічне обґрунтування, Розділ 6. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції, Розділ 7. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції, Розділ 8. Технологічні особливості отримання кінцевої форми препарату з людським фактором росту фібробластів, Розділ 9. Контроль виробництва, Розділ 10. Проект заявки на корисну модель, Висновки.

5. Перелік графічного матеріалу: Апаратурні схеми - 2 листи А1, Технологічні схеми - 2 листи А3: 1) апаратурна та технологічна схеми виділення та очищення людського рекомбінантного основного фактора росту фібробластів 146; 2) апаратурна та технологічна схеми приготування готового лікарського засобу людського рекомбінантного основного фактора росту фібробластів 146 у формі спрею.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	При мітка
	Написання Розділу 1. Ознайомлення з факторами росту фібробластів та їх значенням, Розділу 2. Сучасні генно-інженерні технології виробництва факторів росту фібробластів, Розділу 3. Підходи до очищення генно-інженерних білків фактора росту фібробластів для можливості їх застосування у медико-терапевтичних цілях та у сільському господарстві, Розділу 4. Потенційні досягнення, майбутні напрямки, нові технології та їхній потенційний вплив на виробництво генно-інженерних білків факторів росту фібробластів.	01.10.2024- 10.10.2024	
	Написання Розділу 5. Техніко-економічне обґрунтування.	11.10.2024- 14.10.2024	
	Написання Розділу 6. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції, Розділу 7. Опис технологічної схеми виділення і очищення субстанції. АС і ТС схеми.	15.10.2024- 20.10.2024	
	Написання Розділу 8. Технологічні особливості отримання кінцевої форми препарату з людським фактором росту фібробластів, Розділу 9. Контроль виробництва. АС і ТС схеми.	21.10.2024- 08.11.2024	
	Написання Розділу 10. Проект заявки на корисну модель.	09.11.2024- 11.11.2024	
	Написання Реферату, Вступу та Висновків.	12.11.2024- 13.11.2024	
	Остаточне оформлення Кваліфікаційної роботи.	12.11.2024- 14.11.2024	

Здобувач _____
(підпис)

____ **Ірина Пальона** _____
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

____ **Віктор Стабніков** _____
(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

The master's thesis investigates the role of fibroblast growth factors (FGFs) in biotechnology, medicine, and agriculture, as well as modern technologies for their production using genetic engineering methods. The study analyzes approaches to optimizing expression systems to enhance the efficiency of recombinant FGFs production.

A technological scheme for the production of a stable recombinant human basic FGF in the form of a spray-based medicinal product was developed. The scheme includes stages of fermentation, isolation, purification, and formulation of the final product. Several chromatographic steps were employed to improve the purity and stability of the target substance. The choice of equipment and production conditions was justified to ensure the scalability of the process.

A techno-economic analysis of the production was conducted, including annual production capacity, raw material requirements, finished product demand, optimal production parameters, and modern quality control methods. A patent project for a novel utility model was proposed.

The results of the thesis are aimed at improving the processes for producing genetically engineered proteins, enhancing economic efficiency, and expanding their application. The spray form of the target product ensures ease of use, uniform application, and effectiveness in treating wounds, burns, and other skin injuries, while reducing the risk of complications.

The thesis comprises an introduction, ten chapters, and a bibliography with 221 references. The total volume of the work is 170 pages, including 10 tables and 4 figures. The graphical section includes two apparatus diagrams (A1 format) and two technological schemes (A3 format).

Keywords: genetic engineering technologies, recombinant human basic fibroblast growth factor, skin ulcers, techno-economic analysis, lyophilizate, spray.

РЕФЕРАТ

У магістерській кваліфікаційній роботі досліджено роль факторів росту фібробластів (ФРФ) у біотехнології, медицині та сільському господарстві, а також сучасні технології їх виробництва з використанням генно-інженерних методів. Проаналізовано способи оптимізації експресійних систем для підвищення ефективності отримання рекомбінантних ФРФ.

Розроблено технологічну схему виробництва стабільного рекомбінантного людського основного ФРФ у формі лікарського засобу-спрею. Схема включає етапи ферментації, виділення, очищення та формування кінцевого продукту. Застосовано кілька хроматографічних стадій для підвищення чистоти субстанції цільового продукту та його стабільності. Обґрунтовано вибір обладнання та умов виробництва, що забезпечують масштабування процесу.

Проведено техніко-економічне обґрунтування виробництва, розраховано річну потужність, потребу у сировині та готовому лікарському засобі, вибрано оптимальні виробничі параметри, та сучасні методи контролю. Запропоновано проект патенту на нову корисну модель.

Результати роботи спрямовані на вдосконалення процесів виробництва генно-інженерних білків, підвищення економічної ефективності та розширення їхнього застосування. Форма спрею цільового продукту забезпечує простоту його використання, рівномірне нанесення та ефективність у лікуванні ран, опіків та інших пошкоджень шкіри, знижуючи ризик ускладнень.

Робота складається зі вступу, десяти розділів та списку використаних джерел, що містить 221 посилань. Загальний обсяг роботи – 170 сторінок, кількість таблиць – 10, кількість рисунків - 4. Графічна частина включає дві апаратурні (формат А1) та дві технологічні (формат А3) схеми.

Ключові слова: генно-інженерні технології, рекомбінантний людський основний фактор росту фібробластів, виразки шкіри, техніко-економічне обґрунтування, ліофілізат, спрей.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

aFGF, FGF-1	Кислий фактор росту фібробластів
bFGF, FGF2	Основний фактор росту фібробластів
rhbFGF	Рекомбінантний людський основний фактор росту фібробластів
LB	Luria-Bertani; Середовище Лурія-Бертані
IPTG	Ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид (ІПТГ)
OD600	Оптична щільність при 600 нм
DO	Dissolved Oxygen (розчинений кисень)

Зміст

РЕФЕРАТ	5
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	6
ВСТУП	10
РОЗДІЛ 1. ОЗНАЙОМЛЕННЯ З ФАКТОРАМИ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ ТА ЇХ ЗНАЧЕННЯМ	13
1.1. Огляд можливостей застосування генно-інженерних факторів росту фібробластів у біотехнології, медицині та сільському господарстві	13
1.2. Наявність на ринку пропозицій застосування факторів росту фібробластів та інших факторів росту у терапевтичних цілях	19
РОЗДІЛ 2. СУЧАСНІ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ФАКТОРІВ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ	25
2.1. Визначення досягнень у виробництві факторів росту фібробластів	25
2.1.1. Системи експресії та їх придатність для промислового виробництва факторів росту фібробластів	25
2.2. Оцінка сучасних проблем, прогалин та обмежень у виробництві генно- інженерних факторів росту фібробластів	30
2.3. Шляхи вдосконалення розробки генно-інженерних конструкцій та підвищення ефективності виробництва факторів росту фібробластів	31
2.3.1. Розробка генетичних модифікацій для оптимальної експресії факторів росту фібробластів	32
2.3.2. Підходи до покращення стабільності, розчинності та рівнів експресії факторів росту фібробластів	33
2.3.3. Шляхи вирішення питань, пов'язаних з масштабованістю, економічною ефективністю та посттрансляційними модифікаціями генно-інженерних білків на прикладі факторів росту фібробластів	36
2.3.4. Пропозиція оптимальних генно-інженерних конструкцій для промислового виробництва факторів росту фібробластів	37
РОЗДІЛ 3. ПІДХОДИ ДО ОЧИЩЕННЯ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ БІЛКІВ ФАКТОРА РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ ДЛЯ МОЖЛИВОСТІ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ У МЕДИКО-ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЦІЛЯХ ТА У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ	40
РОЗДІЛ 4. ПОТЕНЦІЙНІ ДОСЯГНЕННЯ, МАЙБУТНІ НАПРЯМКИ, НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ ТА ЇХНІЙ ПОТЕНЦІЙНИЙ ВПЛИВ НА ВИРОБНИЦТВО ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ БІЛКІВ ФАКТОРІВ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ	45
РОЗДІЛ 5. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	50
5.1. Характеристика біотехнологічного продукту	50
5.2. Розрахунок річної потужності виробництва	52
5.2.1. Актуальність власного виробництва генно-інженерних факторів росту фібробластів	52
5.2.2. Розрахунок річної потреби рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів	54

5.2.3. Розрахунок масштабу, частоти та об'єму річного виробництва рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів.....	57
5.2.4. Обґрунтування вибору експресійної моделі для виробництва рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів.....	60
5.2.5. Загальна схема виробництва рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів	63
5.3. Конструювання вектора експресії та початкові етапи ферментації рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів	64
РОЗДІЛ 6. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ.....	66
6.1. Опис етапів виділення та очищення субстанції людського рекомбінантного основного фактора росту фібробластів	66
6.2. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції цільового продукту.....	68
6.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.....	84
6.4. Специфікація обладнання для етапу виділення та очищення цільового продукту	91
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ	93
7.1. Етапи виділення та очищення субстанції.....	93
7.2. Контрольовані параметри на етапі виділення та очищення субстанції цільового продукту	97
РОЗДІЛ 8. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КІНЦЕВОЇ ФОРМИ ПРЕПАРАТУ З ЛЮДСЬКИМ ФАКТОРОМ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ	100
8.1. Обґрунтування виробничих умов та кінцевої форми лікарського препарату ...	100
8.2. Обґрунтування технології отримання спрею	105
8.3. Матеріальний розрахунок на серію виробництва лікарського засобу	106
8.4. Обґрунтування вибору упаковки	108
8.5. Специфікація обладнання для виробництва спрею з рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів	110
8.6. Опис технологічного процесу виробництва спрею з рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів	112
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА.....	116
9.1. Сучасні методи контролю виробництва субстанції	116
9.2. Методи контролю готового лікарського засобу	118
9.3. АНД на спрей з рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів	121
РОЗДІЛ 10. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ	123

10.1. Опис до деклараційного патенту на корисну модель.....	123
10.2.Реферат до деклараційного патенту №	135
10.3. Формула винаходу	137
10.4.Висновки.....	138
ВИСНОВКИ.....	139
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	141

ВСТУП

Актуальність власного отримання субстанції рекомбінантного людського основного фактора роста фібробластів (rhbFGF) на території України є досить високою, оскільки існує велика незадоволена через певні законодавчі і логістичні обмежуючі фактори потреба в наявності продуктів, до складу яких входить rhbFGF для терапевтичних, косметологічних та сільськогосподарських цілей. На території України, Казахстану, Узбекистану, країн Європи поки немає зареєстрованих терапевтичних продуктів, що мають в своєму складі rhbFGF.

Фактори росту набули особливої значущості в медицині для лікування таких патологій, як діабетична стопа, трофічні виразки, опіки, пролежні, діабетична гангрена тощо, оскільки вони є одними з найбільш ефективних засобів лікування цих станів (Acosta та ін., 2006; Fernández-Montequín, 2009; Berlanga-Acosta, 2011). Основний фактор росту фібробластів людини (hbFGF), також відомий як FGF-2, є неглікозильованим одноланцюговим білком, що бере участь у різноманітних біологічних процесах (Powers та ін., 2000; Barrientos та ін., 2008; Veerken та Mohammadi, 2009; Kors та Friesel, 2009; Куо та ін., 2015). На сьогодні hbFGF затверджений для лікування шкірних ран у Китаї, а також для лікування пародонтиту, пролежнів та шкірних виразок у Японії (Hui та ін., 2018a). Крім того, існують докази, що hbFGF є перспективним терапевтичним засобом для відновлення функцій і тканин серця (Li та ін., 2021), відновлення нервових пошкоджень (Li та ін., 2017), регенерації кісток (Novais та ін., 2021), лікування астми та хронічної обструктивної хвороби легень (Tan та ін., 2020), а також для профілактики розвитку патологічних (келоїдних) рубців (Tiede, 2009) та в якості прогностичного біомаркера при гематологічних та солідних пухлинах (Akl та ін., 2016). Крім того, rhbFGF часто застосовується як важливий компонент у культуральних середовищах для підтримання індукованих

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пальона І.В.					10	3
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

плюрипотентних стовбурових (iPS) клітин та ембріональних стовбурових (ES) клітин у недиференційованому стані (Masuda та ін., 2018).

Також було встановлено, що bFGF посилює запальні реакції та сприяє ангиогенезу та утворенню грануляції *in vivo*. Він відомий як типовий ангиогенний фактор, що активує різні етапи загоєння ран (Kaken, 2024). У клінічних дослідженнях виявлено, що рівень інфікування глибоких опікових ран другого ступеня був нижчим у групі, яка отримувала лікування фактором росту, порівняно з групою без такого лікування (Wei та ін., 2022). Терапевтичне використання факторів росту для гострих ран не лише прискорило їх загоєння, але й покращило якість загоєння, особливо у випадках глибоких ран (Wei та ін., 2022). Abdelhakim та ін. (Abdelhakim, Lin, Ogawa, 2020) також зазначають, що bFGF може запобігати утворенню патологічних рубців.

Ці результати можуть слугувати переконливим доказом на користь використання факторів росту для терапії не тільки запущених трофічних виразок, виразок діабетичної стопи та опіків, кількість яких у нашій країні висока навіть у мирний час, але також для лікування бойових поранень та опіків, в тому числі за умови атибіотикорезистентних інфекцій. З огляду на складнощі з евакуацією поранених та веденням бойових дій у польових умовах, ризик інфікування ран значно зростає, особливо на фоні підвищення стійкості до антибіотиків.

Дослідження також показали, що використання факторів росту фібробластів може сповільнювати процес старіння шкіри і, можливо, мати зворотний ефект на старіння шкіри (Fabi та Sundaram, 2014). Це робить фактори росту перспективними для включення до складу засобів догляду за шкірою, орієнтованих на боротьбу зі старінням. Високоякісне виробництво та очищення факторів росту для потреб косметології є важливим завданням та відкриває нові можливості для виходу на ринок з інноваційними продуктами.

Крім того, перспективним є використання rhbFGF у сільському господарстві, особливо в біотехнологічному секторі, для виробництва м'ясних (з м'язових клітин великої рогатої худоби), рибних та пташиних клітинних культур (МКК) (Chodkowska, Wódz, & Wojciechowski, 2022; Venkatesan та ін., 2022). А також для лікування ран в ветеринарії (Hu та ін, 2009)

Отже, метою нашої роботи є пошук та опис оптимально ефективною моделі для культивування стабільного людського рекомбінантного основного фактору росту фібробластів (FGF) промислових масштабів з максимальним виходом продукту високої якості та чистоти з низькою собівартістю. При цьому, у випадку застосування факторів росту для біомедичних цілей ступінь очистки їх повинен бути високим згідно до вимог чинного законодавства. Проаналізувавши потребу і потенціал застосування факторів росту, ми в нашій роботі запропонували оптимально ефективну модель для культивування стійкого людського рекомбінантного основного фактору росту фібробластів (rhbFGF), зокрема hbFGF146 у E. Coli, у промислових масштабах з максимальним виходом продукту високої якості та очистки, та приготування готового лікарського засобу на основі hbFGF146.

РОЗДІЛ 1. ОЗНАЙОМЛЕННЯ З ФАКТОРАМИ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ ТА ЇХ ЗНАЧЕННЯМ

1.1. Огляд можливостей застосування генно-інженерних факторів росту фібробластів у біотехнології, медицині та сільському господарстві

Фактори росту (GF) — це білки, які регулюють такі процеси, як ріст, диференціація та проліферація клітин. Активовані факторами росту сигнальні шляхи в клітині впливають на різні функції клітин, включаючи регенерацію тканин, запалення та ангиогенез (Nguyen et al., 2017; Lee, Silva, & Mooney, 2010). Фактори росту стали надзвичайно актуальними у медичній сфері для лікування таких захворювань, як: діабетична стопа, трофічні виразки, опіки, пролежні, та діабетична гангрена (Acosta та ін., 2006; Fernández-Montequín, 2009; Berlanga-Acosta, 2011). До ключових факторів росту, що широко застосовуються в клініці, належать епідермальний GF (EGF), васкулярний ендотеліальний GF (VEGF), кератиноцитний GF (KGF), інсуліноподібний GF (IGF) та фактор росту фібробластів (FGF) (Barrientos et al., 2008; Niu et al., 2018; Lin et al., 2015; Hui et al., 2018; Li et al., 2014). Наразі GF також використовуються у косметичних засобах для боротьби зі зморшками, старінням та випадінням волосся (Ha et al., 2017; Yang et al., 2015).

Фактори росту фібробластів (FGF) відіграють важливу роль у регенерації тканин переважно мезенхімального походження, загоєнні ран та ангиогенезі. Мутації в генах FGF асоціюються з низкою захворювань, включаючи рак та серцево-судинні хвороби (Yun et al., 2010). Родина FGF включає 22 білки, більшість із яких взаємодіють з трансмембранними рецепторами тирозинкінази FGFR1-4.

Кислий фактор росту фібробластів (aFGF) та основний фактор росту фібробластів (bFGF) є прототипними членами родини FGF, які відрізняються

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ОЗНАЙОМЛЕННЯ З ФАКТОРАМИ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ ТА ЇХ ЗНАЧЕННЯМ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пальона І.В.					13	12
Перевір.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

своїми ізоелектричними точками (DePhillips, Lenhoff, 2004). aFGF має високу експресію в мозку, сітківці, кістковому матриксі та остеосаркомах, тоді як bFGF виявляється в таких тканинах, як гіпофіз, нервова система, кора надниркових залоз, жовте тіло та плацента. Ці фактори росту сприяють проліферації клітин мезодермального походження, а також багатьох клітин нейроектодермального, ектодермального та ентодермального походження, і беруть участь у регуляції міграції клітин, диференціації та ангиогенезу (Yun et al., 2010).

bFGF та aFGF застосовуються в медицині, зокрема для лікування таких патологій, як діабетична стопа, трофічні виразки, опіки та пролежні (Acosta et al., 2006; Berlanga-Acosta, 2011; Gragnani et al., 2022).

hbFGF (також відомий як FGF-2) є неглікозилітованим білком, який виконує ключові біологічні функції (Powers et al., 2000; Barrientos et al., 2008). hbFGF має молекулярну масу 18 кДа і складається з 155 амінокислот (BioGPS, 2024) hbFGF схвалено для лікування ран шкіри в Китаї та пародонтиту, пролежнів і виразок шкіри в Японії (Hui et al., 2018a), і показує перспективи для лікування серцевих і нервових захворювань, а також для регенерації кісткової тканини (Li et al., 2021; Novais et al., 2021). Крім того, hbFGF використовується для лікування астми, хронічної обструктивної хвороби легень і запобігання утворенню патологічних рубців (Tan et al., 2020; Tiede, 2009). Він є перспективним біомаркером для діагностики різних видів раку (Akl et al., 2016). rhbFGF також широко використовується для підтримки стовбурових клітин у недиференційованому стані, що має високу клінічну та наукову цінність (Masuda et al., 2018). bFGF *in vitro* стимулює не лише проліферацію фібробластів, але й міграцію та проліферацію інших клітин, залучених до процесу загоєння ран через рецептор FGF, таких як ендотеліальні клітини судин, гладком'язові клітини та епітеліальні клітини. Також було виявлено, що bFGF посилює запальні реакції та сприяє ангиогенезу і формуванню грануляцій *in vivo*. Крім того, bFGF відомий як типовий ангиогенний фактор. Відповідно, його застосування розглядається як

ефективний засіб для стимулювання різних етапів загоєння ран (Kaken, 2024). Через високу клінічну терапевтичну цінність hbFGF необхідне великомасштабне отримання hbFGF з високою чистотою, стабільністю, активністю та виходом.

Людський кислий фактор росту фібробластів (haFGF) — це розчинний білок, що зв'язується з гепарином та належить до родини факторів росту фібробластів (також відомий як FGF1). Цей білок має молекулярну масу 15,8 кДа і складається зі 140 амінокислот. haFGF є потужним мітогеном, який стимулює ріст клітин мезодермального, ентодермального та нейроектодермального походження, що дозволяє йому відігравати важливу роль у регуляції ангиогенезу та формуванні нових кровоносних судин під час загоєння ран. Через це haFGF широко досліджується та використовується у лікуванні серцево-судинних захворювань і загоєнні ран (Yang та ін., 2015). В огляді, проведеному Wei та ін. у 2022 році, було показано, що використання факторів росту суттєво скорочує час загоєння ран, таких як поверхневі та глибокі опіки, травми та хірургічні ушкодження. Крім того, було встановлено, що фактори росту знижують ризик інфекцій та мінімізують патологічні рубці (Abdelhakim та ін., 2020). rhaFGF має значний терапевтичний потенціал у лікуванні резистентності до інсуліну та діабету 2 типу завдяки його здатності стимулювати проліферацію клітин (Suh та ін., 2014).

Стимулювання процесу загоєння ран є ключовим для відновлення бар'єрної функції пошкодженої шкіри. Продукти, що містять фактори росту, такі як епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту фібробластів (FGF) і гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулюючий фактор (GM-CSF), застосовуються вже протягом десятиліть. Проте систематичної оцінки їх ефективності та безпеки у лікуванні гострих шкірних ран наразі немає, що призвело до відсутності чітких вказівок і стандартів для їх оптимального застосування. У 2022 році було проведено систематичний огляд і метааналіз під керівництвом Wei та ін. (2022), метою якого було критично оцінити ефективність

та безпеку факторів росту для лікування гострих ран та надати рекомендації щодо оптимальних режимів застосування. В аналізі розглядали 281 дослідження, результати яких показали, що застосування факторів росту значно скоротило час загоєння гострих шкірних ран, включаючи поверхневі опіки. Застосування факторів росту не тільки прискорило загоєння ран, але й знизило частоту утворення рубців.

Особливо цікаві дані були отримані з 17 досліджень, що охопили 1389 пацієнтів і порівнювали рівень інфекцій глибоких опікових ран другого ступеня між групами, де використовували фактори росту, і групами без їх застосування. Результати свідчать про значно нижчий рівень інфікування серед пацієнтів, які отримували лікування із застосуванням факторів росту, що є важливим аргументом на користь їх використання в умовах бойових дій. У складних польових умовах, де ризик інфекцій високий через обмежену можливість своєчасної евакуації, застосування факторів росту може бути особливо ефективним, враховуючи зростання антибіотикорезистентності у воюючій країні з високим рівнем поранених бійців в госпіталях.

Також Wei та ін. (2022) підкреслюють, що використання факторів росту не лише сприяло швидшому загоєнню, але й забезпечувало якісніше загоєння у випадках глибоких ран, зменшуючи рівень рубцювання, що має клінічне значення. Це підтверджує, що коротший період загоєння ран суттєво знижує ризик утворення гіпертрофічних рубців, особливо при опіках другого ступеня. Дані свідчать, що, всупереч побоюванням про можливе «надмірне зростання» тканини, лікування факторами росту безпечно скорочує період загоєння на 5,63 дня і знижує ризик утворення гіпертрофічних рубців. Паралельні висновки представлені в дослідженні Abdelhakim та ін. (Abdelhakim, Lin, Ogawa, 2020), де зазначено, що bFGF сприяє профілактиці патологічних рубців через інгібування формування міофібробластів та стимуляцію апоптозу. Варто відзначити, що більшість досліджень, включених у метааналіз, були проведені в Китаї, що

можна розглядати як обмеження, оскільки географічне розширення досліджень могло б забезпечити ширше розуміння ефективності терапії факторами росту в різних умовах.

Космецевтичні продукти — це вироби, які поєднують властивості косметики та ліків. Вони містять біологічно активні компоненти, але використовуються в основному з косметичною метою, особливо для омолодження шкіри. До складу таких продуктів зазвичай входять пептиди та білки, зокрема фактори росту. Оскільки космецевтика не класифікується як лікарський засіб, її не потрібно піддавати строгим процедурам підтвердження ефективності, як це робиться з медичними препаратами (Hadmed & Castillo, 2016).

Космецевтика поєднує властивості фармацевтичних і косметичних засобів. Інтерес до застосування факторів росту в косметології обумовлений тим, що процеси старіння шкіри та її відновлення мають схожі механізми. Коли шкіра старіє або пошкоджується, активуються механізми, що залучають фактори росту. Оскільки їх рівень з віком знижується, метою використання космецевтичних засобів із факторами росту є заповнення дефіциту та стимуляція клітин, що відповідають за регенерацію шкіри, що може уповільнити старіння або навіть мати омолоджувальний ефект (Fabi, Sundaram, 2014).

Вважається, що фактори росту у космецевтиці підвищують синтез колагену та знижують його руйнування в шкірі, тому їхнє виробництво та очистка мають важливе значення для виходу на ринок косметологічних засобів.

Останнім часом розробляються біофармацевтичні косметичні засоби, що містять білки для терапевтичних цілей. Проте, у процесі їхнього виробництва існує ризик потрапляння білків клітини-господаря (НСР), які є побічними продуктами клітинної культури або ферментації. Найбільшою небезпекою недостатнього видалення НСР є їх здатність викликати серйозні імунні реакції у споживачів (DePalma, 2018).

Також існує ризик потрапляння неправильно згорнутих білків, агрегатів або молекул із небажаними посттрансляційними модифікаціями. Ці процеси можуть бути посилені факторами, такими як нагрівання під час виробництва. У той час як у фармацевтичній промисловості такі домішки суворо контролюються, у космецевтиці рекомбінантні білки не піддаються таким жорстким вимогам.

Фактори росту, зокрема haFGF та hbFGF, застосовуються в косметології, оскільки ті самі механізми активуються під час загоєння ран та старіння шкіри. Рівень факторів росту в шкірі знижується з віком, тому їх місцеве застосування допомагає компенсувати цей дефіцит і стимулювати процеси регенерації клітин, що може уповільнити процес старіння (Fabi & Sundaram, 2014). Фактори росту, що використовуються в космецевтиці, сприяють збільшенню вироблення колагену та зменшують його розпад. Для їх ефективного використання в косметології важливою є висока якість і очищення білків.

У косметології haFGF та hbFGF застосовуються для підтримки здоров'я шкіри, рівномірного розподілу пігменту та поліпшення її якості (Mehta & Fitzpatrick, 2007; Sundaram та ін., 2009).

Також фактори росту, зокрема фактори росту фібробластів (FGF), мають потенціал зниження виробничих витрат у сільськогосподарській сфері, особливо у виробництві культивованого м'яса, риби та птахів (Chodkowska, Wódz & Wojciechowski, 2022). Цей напрямок може стати перспективним для України у галузі високотехнологічного аграрного сектора. Клітинне сільське господарство, засноване на біотехнологіях, може значно зменшити викиди парникових газів, знизити споживання води та землі, а також зменшити ризики зоонозних інфекцій (Godfray et al., 2018). Цей напрямок для нашої країни у майбутньому вважаю перспективним, адже ми у майбутньому вбачаємо розвиток нашої країни, як країни з високотехнологічним аграрним типом економіки, з високою часткою доданої вартості в виробництві продуктів сільського господарства.

Вартість виробництва з використанням факторів росту значно знижує вартість середовищ для культивування клітин для виробництва культивованого м'яса та тканинної інженерії (Venkatesan et al., 2022).

Також перспективним напрямком є використання стабільного рекомбінантного основного фактору росту фібробластів для лікування ран в ветеринарії (Hu та ін, 2009).

1.2. Наявність на ринку пропозицій застосування факторів росту фібробластів та інших факторів росту у терапевтичних цілях

Fiblast® спрей (виробник Kaken Pharmaceutical Co., LTD, Японія) — це спрей, що містить рекомбінантний людський фактор росту фібробластів-2 (його ще називають рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів, rhbFGF). Хімічні властивості продукту включають неглікозильований одноланцюговий пептид з 154/153 амінокислотами, отриманими з *E. Coli*, з молекулярною масою 17 кДа та ізоелектричною точкою 10,1. У складі продукту міститься 1 мкг/0,01 мл/см² активної речовини. Перед використанням спрей потрібно розчинити. Ліофілізований порошок зберігає стабільність до трьох років при температурі нижче 10°C, а після розчинення – до двох тижнів при температурі нижче 10°C.

Fiblast® спрей використовується для лікування пролежнів, шкірних виразок, опіків і трофічних уражень, таких як діабетична стопа. Дослідження показали, що bFGF сприяє проліферації та міграції фібробластів, а також активує різні клітини, що беруть участь у процесі загоєння ран. Також було доведено, що bFGF підсилює запальні реакції та сприяє утворенню грануляційної тканини і ангиогенезу *in vivo*. Kaken удосконалила цей препарат на основі клінічних і доклінічних досліджень, підтвердивши його ефективність і безпеку для лікування шкірних уражень (Hadmed & Castillo, 2016).

Fiblast® спреї став першим у світі препаратом на основі людського bFGF, схваленим у червні 2001 року Міністерством охорони здоров'я Японії. Він використовується не лише для загоєння шкірних ран, але й у стоматології для лікування пародонтиту та переломів кісток. Трафермін (активна речовина) був спочатку розроблений компанією Scios Inc. у США, а ліцензію на його виробництво отримала Kaken у 1988 році.

З 2006 року препарат Fiblast® також постачається до Південної Кореї, а з 2007 року його використання поширилося на Північну Америку та Європу для лікування стоматологічних проблем і виразок за ліцензійними угодами (DePalma, 2018).

В Японії цей препарат широко використовується для лікування ран із застосуванням системи негативного тиску V.A.C. ATS® (Kinetic Concepts, Inc.), яка доступна завдяки національній системі медичного страхування.

На ринку рекомбінантних препаратів для зовнішнього застосування кислий фактор росту фібробластів (rhaFGF) представлений засобом Ivjiv (rhaFGF, 25,000 ОД, 100 ОД/см²) від Shanghai Tenry Pharmaceutical Co., Ltd (Китай). Цей спреї використовується для лікування трофічних виразок, діабетичної стопи та опіків 3 ступеня (Shanghai Tenry Pharmaceutical Co., Ltd, 2024). За останнє десятиліття попит на haFGF для терапевтичних та експериментальних цілей значно зріс, що стимулювало пошуки економічно ефективних методів виробництва цього білка з використанням різних систем експресії. Однак висока собівартість виробництва залишається ключовим бар'єром для подальшого розвитку та розширення ринку haFGF.

Рекомбінантні фактори росту, що використовуються в терапії, пропонуються в різних формах, таких як розчини, спреї, мазі та гелі. Ось ще декілька прикладів використання інших факторів росту для терапії таких станів, як діабетична стопа, трофічні виразки та опіки (Abdelhakim, Lin, Ogawa, 2020):

- Фактор росту тромбоцитів (PDGF), як у препараті Regranex® (Smith+Nephew, UK), використовується в формі гелю для місцевого лікування ран, зокрема діабетичної стопи. Він стимулює ріст і поділ клітин, а також сприяє ангиогенезу, але при збільшенні доз є ризик розвитку онкологічних захворювань (Steed, 2006; Papanas, & Maltezos, 2010; Rees та ін., 1999);
- Васкулярний ендотеліальний фактор росту (VEGF 165) також застосовується місцево для лікування діабетичної стопи, підсилюючи ангиогенез та стимулюючи проліферацію ендотеліальних клітин. Проте його ефективність при венозних і трофічних виразках є мінімальною, а більшість терапій VEGF зосереджена на лікуванні раку через блокування ангиогенезу в пухлинах (Galiano та ін., 2004; Mineur та ін., 2007; Chen, & Cleck, 2009);
- Епідермальний фактор росту (EGF) в ін'єкційній формі, як у препараті Heberprot-P® (CIGB, Cuba), застосовується для лікування опіків, виразок і діабетичної стопи. Він найбільш ефективний для лікування важких форм діабетичної стопи, сприяє проліферації та міграції кератиноцитів, підвищуючи міцність новоутвореної шкіри. Однак загоєнню можуть перешкоджати матричні металопротеїнази, які швидко руйнують фактори росту (Gainza, Villullas, Pedraz, 2015; Tiaka, Papanas, Manolakis, & Georgiadis, 2012);
- Ранозагоювальна мазь Ебермін (CIGB, Cuba), до складу якої входить епідермальний фактор роста та сульфадіазин срібла, що володіє широким спектром антимікробної дії: активний відносно грампозитивних і грамнегативних бактерій, грибів роду *Candida* і дерматофітів надає комплексну ранозагоювальну і бактерицидну дію. Мазь застосовується для лікування поверхневих і глибоких опіків шкіри різної тяжкості; трофічних виразок (в т.ч. при хронічній венозній

недостатності, облітеруючому ендартеріїті, цукровому діабеті, бешиховому запаленні); пролежнів; які довго не загоюються, ран, порушень цілісності шкіри при травмах, хірургічних і косметологічних втручаннях; відморожень; виразок, що розвиваються при введенні цитостатиків. Лікування і профілактика променевого (радіаційного) дерматиту (в т.ч. при проведенні поверхневої радіотерапії).

У сфері космецевтики є кілька прикладів продуктів, що базуються на таких факторах росту.

Косметичні продукти на основі FGF:

- Norelift (Франція): крем проти зморшок, призначений для стимулювання клітин шкіри, що забезпечує ефект омолодження, зменшення зморшок, за результатами дії подібний до дії ботокса.
- Cell Shock (Швейцарія): крем для області навколо очей, який сприяє поліпшенню стану шкіри, відновлює її сяйво та покращує текстуру.
- rh-bFGF Gaifu (Китай): містить 70 000 МО на флакон і використовується для поліпшення естетичного вигляду шкіри обличчя, яка потребує регенерації та для покращення стану хронічних ран, оскільки має ранозагоювальні властивості.
- Чеська компанія Enantis розробила стабілізовану форму FGF2 під назвою FGF2-STAB®, яка у 50 разів стабільніша за звичайний FGF2. Це дає економічну перевагу виробникам косметики завдяки меншій швидкості деградації та зниженню ризику алергічних реакцій через зменшення кількості стабілізаторів (Enantis, 2024).

Косметичні продукти на основі EGF:

- Біоефект (Ісландія): сироватка для стимулювання здатності шкіри до самооновлення.

- Терпролін (Італія): крем для обличчя, призначений для покращення стану шкіри, зокрема старіючої. EGF використовується в капсульованій формі для покращення ефективності.

Протягом 17 місяців війни в Україні, за даними американського видання *The Wall Street Journal*, близько 50 тисяч українців зазнали ампутацій кінцівок. Ці цифри базуються на оцінках німецької компанії *Ottobock*, одного з найбільших у світі виробників протезів, та її медичних партнерів (Pancevski, 2023). Окрім ампутацій, поширеними бойовими ушкодженнями є опіки, а у важко поранених нерідко виникають пролежні. Для ефективного лікування таких ушкоджень повинні застосовуватися лікарські засоби, що містять фактори росту, зокрема фактори росту фібробластів.

Спрей з рекомбінантним людським кислим фактором росту фібробластів (rh-aFGF) показав свою ефективність у період пандемії COVID-19. Через необхідність постійного носіння захисних масок медичні працівники стикалися з проблемою утворення пролежнів на обличчі, особливо в області вух та перенісся. Місцеве застосування rh-aFGF допомагало в лікуванні таких пролежнів, що було підтверджено результатами досліджень, проведених у лікарні *Tongji* в Китаї. Лікування з використанням rh-aFGF показало здатність уповільнювати розвиток пролежнів і пришвидшувати загоєння ран без помітних побічних ефектів (Pan, Dong, & Juan, 2020).

Щодо механізму дії rh-aFGF в численних дослідженнях було показано, що у процесі загоєння свіжих ран aFGF, який вивільняється макрофагами та ендотеліальними клітинами, стимулює проліферацію фібробластів і кератиноцитів, що сприяє виробленню колагену, протеаз та інших цитокінів, необхідних для відновлення тканин та загоєння як гострих, так і хронічних ран, включаючи опікові (Huang et al., 2011; Zheng et al., 2015; Ma et al., 2007). Було також виявлено, що bFGF пришвидшує загоєння шкірних ран і зменшує утворення рубців (Huang et al., 2016).

Основна мета нашої роботи полягає у розробці ефективної моделі для культивування факторів росту фібробластів (FGF), яка забезпечить високу якість продукту при мінімальних витратах. При цьому необхідно дотримуватися високих стандартів чистоти та відповідності чинному законодавству для використання факторів росту в біомедичних цілях.

РОЗДІЛ 2. СУЧАСНІ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ФАКТОРІВ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ

2.1. Визначення досягнень у виробництві факторів росту фібробластів

2.1.1. Системи експресії та їх придатність для промислового виробництва факторів росту фібробластів

Завдяки підвищенню попиту на фактори росту (GF), для економічно ефективного їх виробництва використовуються різноманітні системи експресії. Серед них виділяються *Escherichia coli* (Nguyen et al., 2017; Kumagai et al., 2019; Taktak-BenAmar et al., 2017; Sun et al., 2015; Nasiri et al., 2017), *Bacillus subtilis* (Li et al., 2019), клітини ссавців, бакуловірус (Mohseni et al., 2016), шовкопряд (Wu et al., 2004; Wang et al., 2015) і рослинні системи (Ha et al., 2017; Yang et al., 2015). Проте, низька продуктивність у клітинах ссавців та експресія в тілах включення в бактеріях є обмеженням для задоволення споживчого попиту на GF.

Основний фактор росту фібробластів (bFGF) людини існує у вигляді різних ізоформ — з високою (HMW) та низькою молекулярною масою (LMW). HMW ізоформи (22–34 кДа, 196-288 амінокислот) локалізуються в ядрі та функціонують незалежно від рецепторів FGF (Yu et al., 2007). LMW ізоформа, hbFGF155, яка має масу 18 кДа і складається з 155 амінокислот, виділяється в позаклітинне середовище та активує передачу сигналів через рецептори FGFR, що має важливе клінічне значення (Ibrahimi et al., 2004b).

За останні роки експресія hbFGF146 та hbFGF155 була досягнута в різних системах, включаючи *E. coli* (Feng et al., 2004; Chen et al., 2012; Rassouli et al., 2013, Rahman et al., 2020, Li et al., 2024), *Bacillus subtilis* (Kwong et al., 2013), дріжджі *Pichia pastoris* (Mu et al., 2018, Le et al., 2020), шовкопряд (Masuda et al., 2018) та рослини (Ding et al., 2006, Yang et al., 2018). *E. coli* залишається найбільш привабливим вибором для промислового виробництва hbFGF через свою

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. СУЧАСНІ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНІ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ФАКТОРІВ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пальона І.В.					25	15
Перевір.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ефективність і економічну доцільність.

2.1.1.1. Бактерії: *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS, *Bacillus subtilis*

У дослідженні Yu та ін. (Yu et al., 2021) було оптимізовано ген людського aFGF, який кодує haFGF135, і клоновано його у вектор pET3c, після чого введено в *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. Штам BL21 широко використовується як господар для експресії рекомбінантних білків із систем pET, оскільки в ньому відсутні протеази lon і ompT. Позначка DE3 означає, що цей штам є лізогеном λ DE3 і містить копію гена T7 РНК-полімерази, контрольованого промотором lacUV5. Крім того, штам pLysS пригнічує базальну активність T7 РНК-полімерази, зменшуючи небажану експресію до індукції IPTG.

Система pET є однією з найефективніших для експресії рекомбінантних білків в *Escherichia coli*, оскільки використовує T7 РНК-полімеразу, яка є дуже активною та селективною. Після індукції всі клітинні ресурси спрямовані на синтез цільового білка, досягаючи концентрації до 50% від загального білка в клітині за кілька годин (Mierendorf et al., 1998). Крім того, система підтримує низьку базальну експресію цільових генів у неіндукованому стані, що допомагає уникнути токсичних ефектів на клітини-господарі.

Li та ін. розробили процес збільшення виробництва зрілого hbFGF (146aa) шляхом використання високощільної клітинної ферментації та очищення у масштабі 500 літрів (Li et al., 2024). Ген hbFGF був клонований у вектор mpET-3c і введений у штам *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS. Цей штам показав високу стабільність і експресію hbFGF, що підтверджувалося високою біологічною активністю та ефективністю загоєння ран на моделях діабетичних щурів.

Українські дослідники Славченко І.Ю. та Кордюм В.А. (Славченко та ін., 2003) також успішно розробили систему біосинтезу bFGF людини в клітинах *E. coli*, яка включає використання фага лямбда для інфікування клітин BL21 (DE3). Після лізису клітин цільовий білок очищується за допомогою афінної

хроматографії на гепарин-сефарозі, досягаючи чистоти 98%. Біологічні дослідження підтвердили його здатність стимулювати ангиогенез.

Kwong та ін. використовували *Bacillus subtilis* як господаря для секреторної експресії hbFGF і досягли 40 мг/л секретованого білка з високою біоактивністю (Kwong et al., 2013).

Hu та ін. виявили, що *Bacillus subtilis* може ефективно експресувати рекомбінантні білки, використовуючи інтеїни для автокаталітичного розщеплення білкових злиттів, що дозволило досягти високого виходу bFGF (84 мг/л) з автентичною структурою (Hu et al., 2018).

2.1.1.2. Клітини ссавців: шовкопряду, дріжджів *Pichia pastoris*

Домашній шовкопряд має здатність синтезувати та виділяти значну кількість шовкових білків для створення кокона, що вказує на потенціал його використання як біореактора для масового виробництва екзогенних рекомбінантних білків. Дослідження Wang та ін. (Wang et al., 2013, 2014, 2017) підтверджують, що шовкова залоза шовкопряда може бути ефективною стратегією для виробництва біоактивного haFGF у його коконах. У роботі Wang та ін. (Wang et al., 2017) було продемонстровано успішну надекспресію рекомбінантних білків haFGF з природною біоактивністю у серициновому шарі коконів трансгенних шовкопрядів. Для цього використовували систему експресії *sericin1* (Wang et al., 2013), яка регулювала ефективну експресію haFGF у клітинах середньої кишки трансгенного шовкопряда. Експресійна касета haFGF, заснована на векторі *piggyBac20*, була інтегрована в геном шовкопряда. Синтезовані білки були секретовані у шар серицину в середній кишці, а потім обернені в шар шовку. Рівень експресії haFGF зріс у порівнянні з попереднім дослідженням (Wang et al., 2014), що підтверджує ефективність нової системи експресії.

Дослідження Masuda та ін. використовувало систему експресії на основі шовкопряда і бакуловірусу (silkworm-BEVS) для отримання рекомбінантного rhbFGF з афінними мітками на N або C-кінці (Masuda et al., 2018). Хоча білок rhbFGF успішно експресувався, його секреція у культуральне середовище була обмеженою. Після очищення білок мав вихід від 0,7 до 1,2 мг на личинку, а N-мічений rhbFGF показав перспективну біоактивність у тестах на проліферацію клітин ссавців.

Zhou та ін. розробили вектор для експресії рекомбінантного haFGF, специфічного для молочних залоз, з метою його великомасштабного виробництва у трансгенних корів, що дозволило б задовольнити медичні потреби. Це дослідження показало, що вектор успішно експресує функціональний haFGF, що вказує на можливість використання трансгенних тварин як біореакторів (Zhou et al., 2011).

Le та ін. досліджували виробництво білка rhFGF-2 у дріжджах *Pichia pastoris*, що містили кілька копій гена hbFGF. Найвищий рівень експресії білка спостерігався у штамів з 4 копіями гена. Після очищення чистота білка досягла 98,8%, а вихід становив 179,2 мкг з 200 мл культури, причому білок проявляв біологічну активність, подібну до комерційного rhbFGF (Le et al., 2020).

2.1.1.3. Бакуловірусні системи

Система експресії на основі *E. coli* є однією з найбільш популярних платформ для виробництва рекомбінантних білків. Серед основних переваг цієї системи виділяються швидке зростання клітин, економічна ефективність і невибагливість до поживного середовища, добре вивчена генетика і молекулярна біологія, а також висока продуктивність синтезу білків. Проте є низка серйозних обмежень, таких як відсутність посттрансляційних модифікацій (наприклад, глікозилування), помилки у згортанні білка, проблеми з секреторними

механізмами, а також утруднене утворення дисульфідних зв'язків (Mohseni та ін., 2016).

Ще однією альтернативною системою є експресійна система клітин ссавців, яка дозволяє уникнути багатьох недоліків, характерних для *E. coli*, зокрема неправильного згортання білків. Проте основним недоліком цієї системи є високі витрати на культивування клітин (Mohseni та ін., 2016).

Бакуловірусна система стала ще однією перспективною платформою для експресії рекомбінантних білків. Mohseni та ін. (Mohseni та ін., 2016) успішно експресували білок hVEGF121 у цій системі, клонуючи ген VEGF у вектор pFastBac-HTA, що дозволило трансформувати його в клітини DH10BAC. Після трансфекції екстрагованої рекомбінантної бакміди⁺ в клітини комах Sf9 експресію підтвердили методом вестерн-блоту із застосуванням специфічних антитіл. Для оцінки біологічної активності білка використовували тест на утворення трубок (tube formation assay).

2.1.1.4. Рослинні системи

Масляні тільця знаходять широке застосування в медичній, харчовій промисловості та інших галузях. Експресія гетерологічних білків в масляних тільцях має суттєві переваги, зокрема спрощений процес очищення і низьку вартість виробництва. У роботах, проведених Yang та ін. (Yang, та ін., 2015, Yang, та ін., 2018), був експресований білок bFGF у насінні рослини Гусимка звичайна (*Arabidopsis thaliana*) за допомогою технології злиття з олеозином. Конструкція вектора pOTV-bFGF містила злитий ген олеозин-bFGF і ген стійкості до глютофозинату для селекції трансгенних рослин. Методом квіткового занурення були отримані трансгенні лінії *A. thaliana*, а експресію білка підтвердили за допомогою методів SDS-PAGE і вестерн-блоттингу. За допомогою аналізу МТТ було продемонстровано, що білок олеозин-bFGF, експресований у масляних тільцях, стимулює проліферацію клітин NIH/3T3, а

експерименти на тваринах вказали на його здатність прискорювати загоєння ран та сприяти дозріванню грануляційної тканини.

Інша робота, виконана На та ін. (На та ін., 2017), продемонструвала успішну експресію рекомбінантного білка aFGF у тютюні *Nicotiana benthamiana*. Після інфільтрації агробактерією білок aFGF було виділено за допомогою афінної очистки. Оптимальний час збору листя для найвищої експресії рекомбінантного білка був встановлений на четвертий день після інфільтрації. Рівень експресії досягав 10 мкг aFGF на грам свіжої маси листя. Очищений білок значно підвищив виживаність клітин HaCaT і CCD-986sk після впливу ультрафіолету, а також збільшив синтез проколагену і зменшив утворення активних форм кисню в клітинах, що свідчить про його потенційне використання в косметичних або терапевтичних засобах проти фотостаріння шкіри.

2.2. Оцінка сучасних проблем, прогалин та обмежень у виробництві генно-інженерних факторів росту фібробластів

Протягом останнього десятиліття попит на рекомбінантний rhFGF (фактор росту фібробластів) для терапевтичного та дослідницького використання суттєво зріс, що стимулювало інтерес до розробки більш економічних і ефективних методів його виробництва за допомогою різних систем експресії. Проте високі витрати на його виготовлення залишаються суттєвою перешкодою для розширення ринку. Із кожним роком зростає потреба у масштабному виробництві біоактивного рекомбінантного фактора росту фібробластів людини через постійне зростання клінічного попиту на функціональні терапевтичні білки, що підвищує актуальність оптимізації його виробничих процесів.

2.3. Шляхи вдосконалення розробки генно-інженерних конструкцій та підвищення ефективності виробництва факторів росту фібробластів

Для підвищення розчинної експресії hbFGF використовувались різні стратегії злиття білків, серед яких застосування глутатіон-S-трансферази (GST) (Sheng та ін., 2003; Sekiguchi та ін., 2018), тіоредоксину (Trx) (Imsoonthornruksa та ін., 2015; Soleyman та ін., 2016), мальтозозв'язуючого білка (MBP) (Lemaitre та ін., 1995) і колагеноподібного білка (Sc12) (Rahman та ін., 2020). Однак деякі проблеми, як-от недостатня ефективність відщеплення білкових міток, високі витрати на використання протеази та тривалий процес обробки, обмежують можливість застосування цих стратегій у масштабних виробництвах. Відзначено, що виробництво hbFGF155 можливе у ферментерах об'ємом 40-150 літрів, але більш стабільного та метаболічно ефективного hbFGF146 досі обмежується виробництвом на рівні колб для струшування. Крім того, комерційні ціни на hbFGF залишаються високими, коливаючись у діапазоні від 1300 до 2000 доларів США за міліграм. З огляду на це та для задоволення зростаючих потреб як для експериментальних досліджень, так і для клінічних застосувань, дослідження Li та ін. (Li та ін., 2024) фокусувалося на великомасштабному виробництві зрілого hbFGF (146 амінокислот) за допомогою процесу ферментації з високою щільністю клітин у ферментері об'ємом 500 літрів. Подальші дослідження показали належні характеристики та біоактивність очищеного білка *in vitro*, а також його вплив на загоєння ран на моделі глибоких опіків у діабетичних щурів *in vivo*.

Коректне згортання рекомбінантного білка основного фактора росту фібробластів було продемонстроване в системі експресії еукаріота шовкопряда (Wang та ін., 2017). Оскільки екстракційний буфер з високим вмістом сечовини може денатурувати haFGF, білки після очищення піддавались процесу повторного згортання за допомогою редокс-системи глутатіону, відповідно до методології з попереднього дослідження (Hino, Tomita, & Yoshizato, 2006).

Повторно згорнуті білки haFGF мали аналогічну біоактивність до комерційного стандарту haFGF, тоді як білки, що не пройшли обробку глутатіоном, не демонстрували подібної активності. Це підкреслює ефективність використання окислювально-відновної системи глутатіону для коректного згортання haFGF у правильну конформацію (Wang та ін., 2017).

2.3.1. Розробка генетичних модифікацій для оптимальної експресії факторів росту фібробластів

Основний фактор росту фібробластів людини (hbFGF) існує у вигляді ізоформ з високою (HMW) та низькою (LMW) молекулярною масою. Ізоформи HMW, які мають маси 22 кДа (196 амінокислот), 22,5 кДа (201 амінокислота), 24 кДа (210 амінокислот) і 34 кДа (288 амінокислот), утворюються через чотири нетипові початкові сайти CUG (Florkiewicz та Sommer, 1989; Prats та ін., 1989; Florkiewicz та ін., 1991). Ці форми переважно знаходяться в ядрі клітин і функціонують незалежно від рецепторів FGF (FGFR) (Yu та ін., 2007).

У свою чергу, hbFGF155 — це ізоформа з низькою молекулярною масою, яка складається з 155 амінокислот і має масу 18 кДа (BioGPS, 2024; NIH, 2024). Ця форма синтезується з типовим стартовим кодоном AUG (Ibrahimi та ін., 2004a; Sørensen та ін., 2006). Низькомолекулярна ізоформа, hbFGF146, що становить основний акцент в нашій роботі, представляє білок масою 16,5 кДа, що складається зі 146 амінокислот і утворюється шляхом видалення N-кінцевого сегмента з 9 амінокислот (Okada-Ban та ін., 2000).

Ізоформи hbFGF146 і hbFGF155 зазвичай секретуються в позаклітинний простір, де активують передачу сигналів через FGFR, що має велике клінічне значення (Ibrahimi та ін., 2004b).

2.3.2. Підходи до покращення стабільності, розчинності та рівнів експресії факторів росту фібробластів

У дослідженні, проведеному Rahman та ін. (2020), було розроблено масштабований, ефективний та економічно вигідний метод виробництва рекомбінантного hbFGF. Як мітку злиття використали модифікований колагеноподібний білок (Scl2-M) із *Streptococcus pyogenes* для отримання рекомбінантного hbFGF. Після оптимізації процесу рівень експресії Scl2-M-hbFGF досяг 0,85 г/л у колбах для струшування та 7,7 г/л у ферментері з високою щільністю клітин при використанні гліцерину як вуглецевого джерела. Після одностадійного кислотного осадження та ентерокиназного розщеплення, кінцевий продукт очищали за допомогою іонообмінної хроматографії, досягаючи високої чистоти hbFGF (96%) з рівнем відновлення 55%. Ефективність та біологічну активність рекомбінантного hbFGF було підтверджено на клітинах фібробластів ліній L929 та BALB/c3T3. Цей підхід має великий потенціал для промислового виробництва hbFGF.

У дослідженні Yu та ін. (2021) для підвищення стабільності aFGF було розроблено скорочену версію rhaFGF (aFGF135), яка містить 135 амінокислот з теоретичною молекулярною масою 15,4 кДа. Порівняння біологічної активності показало, що різниця між aFGF135 і повнорозмірним білком була несуттєвою, водночас стабільність aFGF135 значно покращилась (Cheng і Kuo, 2011; Yang та ін., 2015).

Щодо факторів росту фібробластів (rhbFGF155), їх нестабільність є серйозною проблемою для застосування в медицині, косметичі та промисловості. Однак компанія Enantis розробила стабілізовану версію rhbFGF155 — FGF2-STAB®, яка є в 50 разів стабільнішою за звичайний rhbFGF155. У прокаріотичній системі експресії *Escherichia coli* BL21 (DE3) шляхом білкової інженерії було замінено 9 амінокислот у rhbFGF155, що призвело до підвищення температури плавлення білка на 20°C. Ця модифікація

забезпечує стабільність FGF2-STAB® більше ніж на 8 місяців при кімнатній температурі, у той час як нативний rhbFGF155 втрачає 70% активності за два тижні (Rahrovan, 2018; Dvorak, 2016). Стабілізація досягається завдяки структурним змінам білка без додаткових стабілізаторів, зберігаючи біологічну активність, що робить FGF2-STAB® економічно вигідним для виробників косметики та дозволяє зменшити ризик алергічних реакцій завдяки скороченню кількості стабілізаторів у продуктах (Enantis, 2024).

Експресійні плазміди рЕТ, які будуть використовуватися в рамках нашого дослідження для конструювання векторів-носіїв генетичної послідовності hbFGF146, є широко застосовуваними інструментами для виробництва рекомбінантних білків у клітинах *Escherichia coli*. Відбір і підтримка клітин, що містять плазмиду рЕТ, забезпечується завдяки генетичним фрагментам Tn3.1 (що кодує β-лактамазу, яка надає стійкість до β-лактамних антибіотиків) або Tn903.1 (що кодує аміноглікозид-3'-фосфотрансферазу, яка надає стійкість до аміноглікозидів). Ці плазміди ефективно підтримуються до та під час індукції виробництва рекомбінантних білків, але протягом тривалої індукції (наприклад, 20 годин) ефективність підтримки залежить від штаму-господаря та типу антибіотичної касети. Згідно з дослідженням Khananisho та ін. (2023), було запропоновано дві загальні рекомендації щодо підтримки плазмід рЕТ під час рекомбінантного виробництва: використовуйте штам із зниженою активністю РНК-полімерази T7 (наприклад, C41(DE3)) для тривалої індукції з будь-яким типом плазміди або штам BL21(DE3) із коротким часом індукції або касетою Tn903.1 для відбору за допомогою канаміцину.

Протягом останніх років було створено кілька ефективних систем злиття для оптимізації експресії та очищення білків. Серед них: мальтозозв'язувальний білок (MBP) (Pryor & Leiting, 1997; Nallamsetty & Waugh, 2006), глутатіон-S-трансфераза (GST) (Sheng et al., 2003; Sekiguchi et al., 2018), DsbA, білок A (NusA) (Nallamsetty & Waugh, 2006), тіоредоксин (Trx) (Soleyman et al., 2016) та багато

інших. Хоча ці стратегії часто покращують розчинність білків, виклики все ще залишаються, включаючи проблеми з розщепленням мітки злиття та низький вихід цільового продукту. Ідеальний тег для ф'южн-експресії повинен забезпечувати високу ефективність у підвищенні розчинної експресії та згортання білка, бути стабільним до протеазної деградації, легко видалятися та не впливати на біологічну активність білка (Song, 2013).

Еластиноподібний поліпептид (ELP) є важливою міткою злиття, яка активно використовується для отримання рекомбінантних білків. Особливістю ELP є його здатність до зворотного температурного переходу (ІТТ), що дозволяє здійснювати нехроматографічне очищення білків. ELP залишається розчинним за температури нижче температури переходу (T_t), але стає нерозчинним при підвищенні температури. Важливо, що ця властивість зберігається і при злитті з цільовим білком (Kowalczyk та ін., 2014). Окрім ELP, колагеноподібний білок Sc12 має подібні властивості, зокрема рН-залежну фазову зміну, що робить його перспективним партнером для синтезу білків. Ці властивості Sc12 (рН-залежна фаза) та ELP (температурна залежність) роблять їх привабливими для досліджень у сфері біомедицини, таких як очищення білків та доставка ліків (Peng та ін., 2012; Kowalczyk та ін., 2014).

У роботі Rahman та ін. (2020) був розроблений новий модифікований колагеноподібний білок (Sc12-M), злитий із hbFGF. Sc12, виділений із *Streptococcus pyogenes*, показав високу експресію в *E. coli* (19 г/л) (Peng та ін., 2014). Додатково до білка були додані домени для зв'язування інтегринів, гепарину, а також RGD-послідовність, що дозволило створити багатофункціональний Sc12-M, стійкий до протеолізу та розчинний. Рівень експресії Sc12-M-hbFGF сягнув 7,7 г/л, а hbFGF — 2,57 г/л при використанні періодичної ферментації з підживленням гліцерином. Метод очищення з використанням Sc12 ґрунтувався на рН-залежній фазовій зміні, що значно полегшило процес очищення. Це дозволило досягти високого виходу очищеного

рекомбінантного hbFGF (1,42 г/л). Дослідження показали, що рекомбінантний hbFGF демонструє високу мітогенну активність, подібну до стандартного bFGF. У цьому дослідженні було створено ефективну і економічну систему експресії для підвищення продуктивності hbFGF в *E. coli*. Була оптимізована ферментація для великомасштабного виробництва, і вперше застосовано рН-залежне осадження білка для очищення rhbFGF. Мітка Sc12-M також може бути використана як біомедичний матеріал (Peng та ін., 2012; Kowalczyk та ін., 2014). Цей метод (Rahman та ін., 2020) є перспективним для застосування у виробництві hbFGF у сільськогосподарських цілях для виробництва м'язевих клітинних культур, як зазначалось вище. Ми ж у своїй роботі детально розглянемо виробництво hbFGF146 для терапевтичних цілей.

2.3.3. Шляхи вирішення питань, пов'язаних з масштабованістю, економічною ефективністю та посттрансляційними модифікаціями генно-інженерних білків на прикладі факторів росту фібробластів

У дослідженні Yu та співавт. (Yu та ін., 2021) оптимізований людський ген aFGF, який кодує haFGF135, був інтегрований у вектор pET3c і введений у штам *Escherichia coli* BL21(DE3) plysS. Для підвищення рівня експресії та виходу білка було проведено оптимізацію параметрів ферментації: температуру, рН, концентрацію кисню, глюкози та хлориду амонію, а також час і концентрацію індуктора IPTG. Оптимізовані умови були реалізовані у великомасштабному ферментаційному процесі (30 л). Розділення та очищення rhaFGF135 було здійснено за допомогою іонообмінної та гепаринафінної хроматографії. Чистоту, молекулярну масу та пептидну карту білка було підтверджено методами ВЕРХ, ізоелектричного фокусування та мас-спектрометрії. Активність білка rhaFGF135 перевірили на клітинах NIH-3T3 і моделі діабетичних щурів з пораненням шкіри. На рівні ферментації 30 л вихід культури сягав $80,4 \pm 2,7$ г/л, а експресія білка становила $37,8\% \pm 1,8\%$. Чистота білка після очищення майже

досягла 100%, а вихід — $158,6 \pm 6,8$ мг/л. Дослідження показало, що rhaFGF135 зберігав потужну мітогенну активність. Описаний процес є стабільним і може використовуватися для промислового синтезу rhaFGF135.

У дослідженні Li та співавт. (Li та ін., 2024) була поставлена мета збільшити виробництво hbFGF (146aa) за допомогою ферментації з високою щільністю клітин у масштабі 500 л. Ген hbFGF клонували у вектор mpET-3c і ввели у штам *E. coli* BL21 (DE3) plysS. Оптимізація параметрів ферментації була проведена за допомогою дизайну Vox-Behnken, що дозволило досягти високого рівня експресії hbFGF ($28,2\% \pm 0,2\%$) та високого рівня отримання біомаси ($46,8 \pm 0,3$ г/л). Було розроблено триетапний протокол очищення білка з використанням хроматографії CM-Sepharose, гепаринової афінної хроматографії та SP-Sepharose. Чистота кінцевого продукту перевищувала 98%, а вихід hbFGF становив $114,6 \pm 5,9$ мг/л культури. Властивості очищеного білка підтвердили за допомогою електрофорезу, MALDI-TOF/MS та CD-спектроскопії. Очищений hbFGF146 демонстрував високу мітогенну активність і сприяв загоєнню ран у моделі щурів з діабетом і глибокими опіками другого ступеня. Цей підхід до виробництва є ефективним і забезпечує основу для промислового великомасштабного виробництва hbFGF.

2.3.4. Пропозиція оптимальних генно-інженерних конструкцій для промислового виробництва факторів росту фібробластів

У клітинах ссавців і бактерій часто спостерігається низька продуктивність білків та їхня експресія у вигляді тілець включення. Це ускладнює отримання факторів росту (GF) у таких системах, не задовольняючи споживчий попит. Тому існує потреба в створенні бактеріальної системи експресії, яка забезпечувала б високий вихід розчинних GF, які можна було б легко очистити до кінцевої форми. Одним з основних варіантів є система *Escherichia coli*, що активно використовується для виробництва рекомбінантних білків завдяки легкій

генетичній модифікації, швидкій експресії білка та високій швидкості росту (Rosano & Seccarelli, 2014). Проте система має кілька обмежень, таких як експресія білка в тільцях включення та неправильне згортання, що призводить до неактивних білків через некоректні дисульфідні зв'язки (Berkmen, 2012; Ke & Berkmen, 2014). Для подолання цих проблем були генетично модифіковані штами *E. coli*, що контролюють окисно-відновне середовище клітини (Lobstein et al., 2012).

Також існують методи підвищення розчинності білка за допомогою спеціальних білкових міток, таких як мальтозозв'язуючий білок (MBP), олеозин та HaloTag (Nguyen et al., 2017; Choi et al., 2018; Sun et al., 2015). Злиття білка з такими мітками допомагає уникнути проблем з розчинністю та покращує вихід білків у цитоплазмі *E. coli* (Kaplan et al., 2016).

У дослідженні Kim та ін. (2021) було представлено новий підхід для підвищення експресії GF. Для цього GF людини зливали з bNFh8, що сприяло підвищенню їх розчинності та продуктивності в *E. coli*. Цей метод дозволив отримати фактори росту з високою чистотою і збереженням біологічної активності, що демонструє перспективи для масштабного виробництва GF у промислових масштабах.

Дослідження, проведені Wang та ін. (2015, 2017), показують, що ремобілізація транспозона в геномі шовкопряда може бути ефективним методом отримання штамів з різними вставками, що відкриває можливість пошуку штамів із підвищеною експресією трансгенів. Для цього раніше був створений трансгенний шовкопряд, який стабільно експресував транспозазу piggyBac, з частотою транспозиції 61,5% (Wang та ін., 2017). Цей штам був схрещений з лінією, що експресувала haFGF, і ремобілізація piggyBac успішно була індукована до іншого локусу хромосоми шовкопряда. Деякі з отриманих F2 ліній показали підвищену експресію haFGF. Локуси цих мутантних ліній

ремобілізувалися в некодуючі області ДНК, що можна вважати "безпечними гаванями" для експресії генів (Wang та ін., 2017).

Завдяки використанню цієї стратегії, виробництво haFGF у штамів B10 зросло майже в п'ять разів, досягнувши 5,2% ваги кокона. Рекombінантні білки були очищені з екстракту кокона зі ступенем вилучення 55,8%. Після обробки білки відновлювали свою біологічну активність завдяки редокс-системі глутатіону. Аналізи показали, що отриманий haFGF ефективно сприяє проліферації клітин NIH/3T3 та їхній міграції, що свідчить про потенціал для загоєння ран. Один трансгенний шовкопряд здатний продукувати приблизно 2,6 мг рекombінантного haFGF (Wang та ін., 2017). Це дослідження демонструє можливість використання трансгенних шовкопрядів для масового виробництва біоактивного haFGF.

У дослідженні Yu та ін. (2021) оптимізований людський ген haFGF135 був інтегрований у вектор pET3c та експресований в *Escherichia coli* BL21(DE3) plysS. Параметри ферментації були оптимізовані для підвищення продуктивності на великомасштабному рівні (30 л). Це дозволило досягти рівня експресії $80,4 \pm 2,7$ г/л культури, а чистота кінцевого продукту досягла майже 100%, що підкреслює ефективність методу (Yu та ін., 2021).

У дослідженні Li та ін. (2024) було розроблено масштабований процес виробництва hbFGF у 500-літрових біореакторах, що відповідає вимогам для експериментальних і клінічних застосувань. Під час ферментації було досягнуто високої експресії білка з чистотою понад 98% та здатністю ефективно сприяти загоєнню ран (Li та ін., 2024).

РОЗДІЛ 3. ПІДХОДИ ДО ОЧИЩЕННЯ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ БІЛКІВ ФАКТОРА РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ ДЛЯ МОЖЛИВОСТІ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ У МЕДИКО-ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЦІЛЯХ ТА У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ

Останні досягнення у технологіях очищення факторів росту фібробластів (FGF) значно підвищили їх ефективність, вихід і якість, зробивши ці білки більш придатними для різних застосувань. Інновації у цій галузі сприятимуть доступності та ефективності FGF як у медичній сфері, так і в сільському господарстві.

Фактори росту (GFs) є ключовими компонентами середовищ для вирощування клітин і становлять понад 90% загальних витрат на культуральні середовища. У дослідженні Venkatesan (2022) було розроблено набір експресійних конструкцій та спрощений протокол для виробництва рекомбінантних GF, таких як FGF2, IGF1, PDGF-BB і TGF- β 1, в *Escherichia coli*. За допомогою цієї системи були отримані GF, які показали вищу ефективність порівняно з комерційними аналогами. Вартість виробництва GFs за допомогою цієї методології значно знизилася б витрати на культуральні середовища, що відкриває нові можливості для виробництва культивованого м'яса та тканинної інженерії.

Безсироваткові середовища (SFM), такі як Essential 8 (Chen et al., 2011), TeSR, FBM, стали доступні на ринку і використовуються для середовищ культивування клітин iPSC (Kuo et al., 2020) і сателітних клітин великої рогатої худоби (Stout et al., 2022). Хоча ці середовища усувають етичні проблеми, пов'язані з використанням FBS, вони можуть бути дорожчими, ніж традиційні

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ПІДХОДИ ДО ОЧИЩЕННЯ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ БІЛКІВ ФАКТОРА РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ ДЛЯ МОЖЛИВОСТІ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ У МЕДИКО-ТЕРАПЕВТИЧНИХ ЦІЛЯХ ТА У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пальона І.В.					40	5
Перевір.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

середовища з FBS. Однією з основних причин високих витрат є мітогенні фактори росту, такі як FGF2 і TGF- β 1, що становлять понад 95% загальних витрат на SFM (Specht, 2020).

Виробництво цих GF у бактеріальних системах, таких як *E. coli*, є складним через потребу в посттрансляційних модифікаціях або використання систем культури клітин ссавців (наприклад, CHO, HEK293) (Alexander et al., 1992; Zou & Sun, 2004). Ці фактори росту переважно еукаріотичного походження і, як правило, вимагають певного рівня посттрансляційної модифікації, такої як окислення або глікозилування, і правильне утворення дисульфідних зв'язків має важливе значення для згортання білків і дозрівання в їх біологічно активну конформацію. Попри досягнення у штамовій інженерії та вдосконалення експресії дисульфідвмісних білків (Bessette et al., 1999; Lobstein et al., 2012), використання *E. coli* для виробництва розчинних мітогенних GF залишається викликом, оскільки комерційне виробництво потребує правильної конформації білка.

Запропоновані стратегії значно знижують витрати на рекомбінантне виробництво GF та можуть мати значний вплив на зниження вартості безсироваткових середовищ у клітинному сільському господарстві (Venkatesan et al., 2022).

Одним із найбільш сучасних і ефективних методів очищення білка є метод очистки FGF1 і FGF2, запропонований у роботі (Kim et al., 2021). Автори зазначають, що отримання рекомбінантних FGF шляхом генної інженерії в *E. coli* із різними фьюжн-партнерами, як-от TrxA, 6HFh8, 6His (Kim et al., 2021; Gasparian et al., 2009; Куо et al., 2020), вимагає кількох етапів очищення та використання спеціалізованого хроматографічного обладнання. Проте, в роботі (Venkatesan et al., 2022) протестовано виробництво цих білків за допомогою одноетапного протоколу афінної хроматографії з іммобілізованим металом (IMAC), який передбачає розщеплення протеазної мітки TEV і її видалення за

допомогою тієї ж афінної смоли, що використовувалася на початковій стадії очищення (деталі наведені у методах STAR). Додаткові особливості методології включають використання синтетичних кодон-оптимізованих генів і вибірку 21 ортолога послідовності (5 FGF1, 16 FGF2) для забезпечення різноманітності амінокислотних послідовностей. Ця стратегія дозволила успішно експресувати та очищати 5 білків FGF1 і 16 FGF2 із наземних (велика рогата худоба, кури, вівці, людина) і водних (атлантичний лосось, нільська тилляпія, лосось чавич) видів тварин. Вихід очищеного білка FGF2 варіював від 7 мг/л для *Bos taurus* (бик) до 36 мг/л для *Oryzias latipes* (рисова риба), що підкреслює значну варіативність у виходах ортологів FGF при однакових умовах експресії.

Очищення генно-інженерних білків, таких як фактори росту фібробластів (FGF), є важливим для їх використання в медицині, терапії та сільському господарстві. Протягом останнього десятиліття було розроблено низку інноваційних підходів для підвищення ефективності та чистоти очищення FGF.

Ось кілька ключових підходів:

- Афінна хроматографія. Афінна хроматографія залишається основним методом очищення FGF завдяки її високій специфічності. Афінна хроматографія Ni-NTA (нікель-нітрилотріоцтова кислота) часто використовується для очищення FGF з гістидиновою міткою (His-tag), забезпечуючи надійний метод очищення (Spriestersbach et al., 2015). Гепаринова афінна хроматографія також ефективна завдяки високій спорідненості FGF до гепарину. У дослідженні (Bolten et al., 2020) рекомбінантний hFGF-2 був отриманий в *Escherichia coli* та очищений за допомогою трьох стадій хроматографії, включаючи сильну катіонообмінну хроматографію, гепаринову афінну хроматографію та аніонообмінну хроматографію для полірування. Гепарин, використовуваний для афінної хроматографії, має тваринне походження, проте синтетичні ліганди забезпечують альтернативу завдяки відтворюваним результатам. Альтернативні

ліганди можуть застосовуватися в мультимодальних або псевдоафінних системах.

- Іонообмінна хроматографія. Іонообмінна хроматографія розділяє білки за зарядом, забезпечуючи високу роздільну здатність. Аніонообмін та катіонообмін підходять для очищення FGF залежно від ізоелектричних точок білків. У роботі (Sauer et al., 2019) продемонстровано, що FGF-2 може бути очищеним до високої чистоти за допомогою двоетапного процесу з використанням CM-SFF і Toyopearl-Нexyl-650С.

- Ексклюзійна хроматографія (SEC). SEC або гель-фільтраційна хроматографія застосовується для розділення білків за розміром і часто використовується як заключний етап для досягнення високої чистоти (Hong et al., 2012).

- Хроматографія гідрофобної взаємодії (HIC). HIC використовує гідрофобні властивості білків для їх розділення та може бути корисною для очищення FGF в м'яких умовах, що зберігають біоактивність білка (Ewonde et al., 2024).

- Мультимодальна хроматографія. Мультимодальна хроматографія поєднує різні методи розділення, такі як іонообмін і гідрофобну взаємодію, підвищуючи чистоту і селективність. Протягом останніх років її ефективність як альтернативи традиційним методам була продемонстрована багатьма авторами (Halan, 2019).

- Афінна хроматографія з іммобілізованим металом (IMAC). IMAC широко використовується для очищення FGF з гістидиновою міткою через спорідненість металів і гістидинових залишків. IMAC може працювати з нативними білками без необхідності спеціальних міток, що є перевагою у складних сумішах (Charlton & Zachariou, 2008).

- Мембранна хроматографія. Цей метод забезпечує високу швидкість потоку та здатність зв'язування, що підходить для великомасштабних процесів очищення (Liu, Wickramasinghe, & Qian, 2016).

- Водні двофазні системи (ATPS). ATPS передбачає поділ білків між двома водними фазами, пропонуючи економічний метод очищення, що забезпечує збереження активності білків (González-González & Ruiz-Ruiz, 2017).

Забезпечення високої чистоти та біоактивності FGF є критичним для їх терапевтичного застосування, що робить методи очищення одним з найважливіших етапів для масштабованого виробництва.

РОЗДІЛ 4. ПОТЕНЦІЙНІ ДОСЯГНЕННЯ, МАЙБУТНІ НАПРЯМКИ, НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ ТА ЇХНІЙ ПОТЕНЦІЙНИЙ ВПЛИВ НА ВИРОБНИЦТВО ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ БІЛКІВ ФАКТОРІВ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ

Розчинний bFGF155 має водорозчинну природу, але швидко розкладається *in vivo*, що зумовлює його короткий період напіввиведення (Edelman, Nugent, & Karnovsky, 1993). Для зменшення цієї деградації були запропоновані різноманітні форми препарату. Дослідження, проведене Сян та ін., продемонструвало, що ліпосоми, інкапсульовані з bFGF (bFGF-lip), значно прискорюють загоєння глибоких опіків другого ступеня у щурів, на відміну від терапії, яка використовує пусті ліпосоми (Xiang et al., 2011).

Дослідження, здійснене у Департаменті пластичної та реконструктивної хірургії Вищої школи медицини Кіотського університету, виявило, що штучна дерма з мікросферами, які містять біорозкладний желатин із bFGF, стимулює проліферацію фібробластів і ангиогенез у ранах повної товщини у морських свинок (Kawai, Suzuki, Tabata, Ikada, & Nishimura, 2000). Подальші експерименти цієї наукової групи показали, що імплантація колагенових губок із гелем, збагачених bFGF, значно прискорює утворення дермоподібної тканини у ранах мишей (Kanda et al., 2011). Аналогічно, лікування пролежнів у діабетичних мишей цією методикою демонструвало пришвидшену епітелізацію та ангиогенез (Kanda et al., 2014). У 2013 році група завершила перше рандомізоване клінічне дослідження, яке довело, що штучна дерма з уповільненим вивільненням bFGF протягом 10 днів суттєво покращує загоєння хронічних виразок (Morimoto et al., 2013).

Інша наукова робота досліджувала вплив імплантації желатинового

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ПОТЕНЦІЙНІ ДОСЯГНЕННЯ, МАЙБУТНІ НАПРЯМКИ, НОВІ ТЕХНОЛОГІЇ ТА ЇХНІЙ ПОТЕНЦІЙНИЙ ВПЛИВ НА ВИРОБНИЦТВО ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ БІЛКІВ ФАКТОРІВ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пальона І.В.				45	5	
Перевір.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

гідрогелю з контрольованим вивільненням bFGF на моделі ран шкіри мишей. Було виявлено, що цей підхід значно покращує неоваскуляризацію при підшкірній імплантації в ділянку спини мишей (Tabata, & Ikada, 1999; Tabata, Nagano, & Ikada, 1999). Желатиновий каркас забезпечував контрольоване вивільнення фактора росту, що сприяло ефективнішому загоєнню ран.

Дослідження Matsumoto та ін. порівнювало ефективність желатинових листів із bFGF і традиційного спрею bFGF у моделі загоєння ран у мишей. Результати показали, що група з bFGF-желатином демонструвала краще загоєння, швидше закриття ран і формування зрілого колагену, ніж група зі спреєм (Matsumoto et al., 2013).

Однак, результати рандомізованого подвійного сліпого пілотного дослідження, в якому порівнювалося місцеве застосування bFGF із плацебо у пацієнтів із діабетичними нейротрофічними виразками стопи, не продемонстрували значного покращення загоєння складних хронічних виразок (Richard et al., 1995). Водночас продукт HeberprotP, що містить рекомбінантний людський епідермальний фактор росту, показав значну ефективність у лікуванні таких ран. У ретроспективному клінічному дослідженні (n=29), пацієнти, які отримували HeberprotP, демонстрували коротший період лікування та вищу частоту загоєння у порівнянні з контрольною групою (n=22) (Özker, 2023).

Цікавою розробкою є ін'єкційний гідрогель HA@MnO₂/FGF-2/Exos, що поєднує місцеву ін'єкцію з комплексною терапією ран. Він створює захисний бар'єр із тривалим антибактеріальним ефектом і прискореним гемостазом. Крім того, вивільнення FGF-2 і екзосом стимулює ангиогенез і епітелізацію, забезпечуючи прискорене загоєння ран (Xiong et al., 2022).

Дослідження Dvorak та ін. (2018) використовувало *in silico* підхід для покращення стабільності та економічності виробництва FGF2. Результатом став FGF2-STAB®, стабілізований фактор росту з унікальною термостабільністю, що

зберігає біологічну активність навіть за тривалого зберігання при 37 °C (Dvorak et al., 2018).

Використання стабілізованого фактора росту FGF2-STAB® відкриває нові перспективи у клінічному застосуванні, як для місцевого лікування, так і для його інтеграції у біоматеріали. Результати, отримані Dvorak та співавторами (2018), підтверджують ефективність стабілізації білків шляхом раціональної біоінженерії. Ця стратегія сприяє розвитку терапевтичних засобів, зокрема для регенеративної медицини, лікування онкологічних захворювань та метаболічних розладів.

У публікації Vojtova та ін. (2021) описані каркаси з колагену, модифіковані хітозановими волокнами та FGF2-STAB®. Їх безпека та ефективність були підтвержені в експериментах на тваринній моделі кролика. Тестування *in vitro* продемонструвало високу ангіогенну активність FGF2-STAB® порівняно з FGF2 дикого типу, за відсутності токсичного впливу на клітини. Дослідження *in vivo* підтвердило переваги використання цих каркасів у реконструкції шкіри, зокрема біорезорбцію матеріалу, зменшення запальних реакцій та якісну грануляцію тканин.

Окрім цього, FGF2-STAB® може комбінуватися з іншими активними компонентами, наприклад, антибактеріальними наночастинками. Проте дослідження виявили антагоністичний ефект високих концентрацій наночастинок селену (SeNPs) та FGF2-STAB® щодо метаболічної активності клітин шкіри (Vojtova та ін., 2021). Оптимальні концентрації добавок для каркасів були встановлені на рівні 1 мкг/мл FGF2-STAB® і 1 мкг/мл SeNP (Muchová та ін., 2021).

Дослідницька група Vojtova наразі проводить рандомізовані клінічні дослідження для оцінки ефективності цього білка у лікуванні опікових ран та регенерації тканин. Попередні результати свідчать про успішність застосування

матеріалів із FGF2-STAB® у різних умовах, зокрема з використанням як повністю розсмоктуваних, так і тимчасових каркасів (Vojtova та ін., 2023).

Виробництво генно-інженерних білків, таких як фактор росту фібробластів (FGF), значно просунулося за останнє десятиліття завдяки новим технологіям та інноваційним підходам. Ці досягнення не тільки підвищили ефективність і продуктивність виробництва FGF, але й відкрили нові можливості для терапевтичного застосування. Ось деякі ключові досягнення, майбутні напрямки та потенційний вплив цих досягнень:

- Покращені системи експресії, такі, як CRISPR/Cas9. Використання системи CRISPR/Cas9 для редагування геному може дозволити внести точні модифікації в клітинах-господарях, оптимізуючи їх для більшої експресії FGF.
- Оптимізовані клітини-господарі, про які ми говорили вище, такі як мікробні господарі, клітини ссавців, бакуловіруси
- Покращені методи очищення. Наприклад, афінні мітки. Використання афінних міток і вдосконалених методів хроматографії оптимізувало процес очищення, підвищивши чистоту та вихід продукту.
- Інновації в низхідній обробці. Зростаюче впровадження одноразових технологій біообробки, зниження експлуатаційних витрат завдяки безперервній біообробці, збільшення використання комп'ютерних технологій наступного покоління в біотехнологіях і сплеск використання біосимілярів є ключовими тенденціями, що формують такі підходи, як одноразові технології та безперервна обробка, які зменшили виробничі витрати та покращили масштабованість.
- Розглянуті вище підходи до білкової інженерії були використані для підвищення стабільності, розчинності та біологічної активності FGF, створення злитих білків із покращеною фармакокінетикою та можливістю цільової доставки робить фактори росту фібробластів більш ефективними для терапевтичного використання.

Серед майбутніх напрямків та нових технологій можна виділити такі, як:

- Безклітинний синтез білка. Ми про нього згадували, коли описували роботу Zhou та ін. (Zhou та ін., 2011), де було показано, що сконструйований вектор успішно експресує функціональний FGF1, таким чином потенційно дозволяючи створювати трансгенних корів, які будуть використовувати молочні залози як біореактори. Це дозволить швидко та масштабовано виробляти FGF без потреби в живих клітинах, зменшуючи ризик зараження та спрощуючи процес виробництва.

- Штучний інтелект (AI) і машинне навчання (ML) можуть оптимізувати виробничі процеси, передбачаючи оптимальні умови для експресії та очищення білка (Goshisht, 2024).

- Удосконалені конструкції біореакторів. Біореактори наступного покоління, включаючи перфузійні біореактори та мікрофлюїдні системи, пропонують покращений контроль над виробничим середовищем, що призводить до вищого виходу продуктів і більш сталої якості продукції.

- Технології Omics - інтеграція геноміки, протеоміки та метаболоміки може забезпечити глибше розуміння клітинних процесів, забезпечуючи подальшу оптимізацію експресійних систем та умов виробництва.

РОЗДІЛ 5. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

5.1. Характеристика біотехнологічного продукту

Фактори росту фібробластів (FGF) є потужними регуляторами клітинної проліферації та диференціювання, маючи важливе значення в біомедицині для нормального розвитку, підтримання тканин, загоєння ран та ангіогенезу. Вони активно використовуються для лікування ран, різних захворювань та стимуляції росту волосся (Barrientos та ін., 2008; Niu, Li, Ding, Dong, & Wang, 2018; Lin та ін., 2015; Hui, Jin, Li, Liu, & Wang, 2018; Li та ін., 2014; Mallela, 2010; Schneider, & Sledge, 2007; Gibbs, 2000). Останнім часом FGF знаходять застосування і в косметичних засобах проти зморшок, старіння, випадіння волосся та для регенерації тканин (Ha та ін., 2017; Yang та ін., 2015; Żerańska та ін., 2016; Choi та ін., 2018). Мутації в генах FGF пов'язують із такими захворюваннями, як рак, серцево-судинні хвороби, остеоартрит, діабет, хвороба Паркінсона та гіпофосфатемія (Yun та ін., 2010).

Родина людських факторів росту фібробластів FGF нараховує 22 члени, позначені від FGF-1 до FGF-23 (за винятком FGF-15). Майже всі FGF, крім чотирьох (FGF11, FGF12, FGF13, FGF14), зв'язуються з трансмембранними рецепторами тирозинкінази FGFR1, FGFR2, FGFR3 та FGFR4. Кислий FGF (aFGF, FGF-1) і основний FGF (bFGF, FGF2) є прототипами родини FGF, названими через їх різні ізоелектричні точки (DePhillips, Lenhoff, 2004). Кислий aFGF високо експресується в мозку, сітківці, кістковому матриксі та остеосаркомах, тоді як основний bFGF зустрічається в таких тканинах, як гіпофіз, нервова тканина, надниркові залози, жовте тіло та плацента.

Кислі та основні FGF, що входять до складу затверджених лікарських засобів, стимулюють проліферацію клітин мезодермального походження, а також нейроектодермального, ектодермального та ентодермального

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пальона І.В.					50	17
Перевір.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

походження. Вони відіграють важливу роль у модуляції клітинної проліферації, міграції, диференціювання та ангиогенезу (Yun та ін., 2010).

мРНК гена bFGF має кілька сайтів поліаденілування і може бути транслювана альтернативно з не-AUG (CUG) та AUG кодонів, утворюючи п'ять ізоформ з різними властивостями. Ізоформи, ініційовані CUG, локалізуються в ядрі і відповідають за внутрішньокринний ефект, тоді як AUG-ініційована форма цитозольна і забезпечує паракринні та аутокринні ефекти bFGF (Yu, Ferrari, Galloway, Mignatti, Pintucci, 2007). Людський bFGF демонструє ізоформи з високою (HMW) та низькою молекулярною масою (LMW). HMW-ізоформи hbFGF, які містять 22 кДа (196 амінокислот), 22,5 кДа (201 амінокислота), 24 кДа (210 амінокислот) і 34 кДа (288 амінокислот), генеруються через чотири нетипові стартові сайти CUG (Florkiewicz та Sommer, 1989; Prats та ін., 1989; Florkiewicz та ін., 1991). Ці ізоформи розташовані в ядрі і функціонують незалежно від рецепторів FGF (FGFR) (Yu та ін., 2007). Натомість, ізоформа низькомолекулярного hbFGF (hbFGF155) має молекулярну масу 18 кДа і складається з 155 амінокислот (BioGPS, 2024). Вона утворюється за рахунок стандартних стартових сайтів AUG (Ibrahimi та ін., 2004a; Sørensen та ін., 2006). Крім того, зрілий hbFGF (hbFGF146) є білком із молекулярною масою 16,5 кДа і складається зі 146 амінокислот, виникаючи через укорочення N-кінцевого сегмента hbFGF155 на 9 амінокислот (Okada-Ban та ін., 2000). Зазвичай hbFGF146 або hbFGF155 секретуються в позаклітинне середовище і діють через активацію передачі сигналів FGFR, що має значні клінічні значення (Ibrahimi та ін., 2004b). Робота Yu та ін. (Yu, Ferrari, Galloway, Mignatti, Pintucci, 2007) розкриває послідовність hbFGF155 (NIH, 2024b).

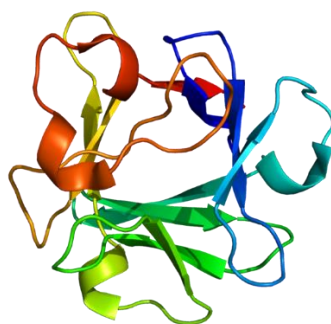


Рис.5.1. 3D структура білка bFGF. На основі рендерингу PyMOL PDB (Zhu та ін., 1991)

5.2. Розрахунок річної потужності виробництва

5.2.1. Актуальність власного виробництва генно-інженерних факторів росту фібробластів

До початку повномасштабної агресії Росії проти України, в країні налічувалося близько 1,2 млн пацієнтів із діабетом (дані Центру медичної статистики МОЗ України, 2014 рік). З цієї кількості, від 8% до 25% хворих страждали на діабетичну стопу, що становить щонайменше приблизно 96 тис. пацієнтів. При цьому, близько 10% із них потребували ампутації нижніх кінцівок, тобто приблизно 10 тис. осіб (Золотухіна, 29.04.2020).

За даними Центру медичної статистики МОЗ України за 2014 рік, захворюваність на діабетичну гангрену, флебіти та тромбофлебіти (включно з діабетичною стопою) виглядала наступним чином:

- діабетична гангrena — 5,2 тис. пацієнтів;
- флебіти, тромбофлебіти — 282 тис. пацієнтів;
- опіки — 35,2 тис. пацієнтів.

За даними Центру громадського здоров'я МОЗ України (Центр громадського здоров'я МОЗ України, 23.07.2020), близько 70% усіх щорічних ампутацій до початку агресії РФ були спричинені ускладненнями діабету. До того ж, 60% ампутацій, пов'язаних із діабетичною стопою, можна було б

уникнути, якби було доступне лікування виразок біологічними продуктами, зокрема факторами росту (Acosta et al., 2006).

Фармацевтичні компанії Куби, Китаю та Японії розробили продукти з факторами росту, що використовуються для лікування виразок діабетичної стопи, трофічних виразок, опіків та інших ран, які довго не загоюються. До таких продуктів належать Fiblast Spray, Regroth Dental Kit, RH-BFGF, Regranex®, VEGF 165, Heberprot-P®, Gaifu, Ivjiv (Berlanga et al., 2013; Kitamura et al., 2016; Luo, Liu, & Li, 2020). Ці препарати зареєстровані як лікарські засоби та доступні у вільному продажу, однак у ЄС вони не зареєстровані.

В Україні реєстрація таких продуктів ускладнена через високі вимоги до реєстрації референтних біологічних продуктів та біосимілярів, якщо вони не зареєстровані в Європейському Союзі відповідно до чинного законодавства України. Відповідно до Закону України «Про лікарські засоби», референтний лікарський засіб — це лікарський засіб, зареєстрований в Україні або в Європейському Союзі, на основі якого порівнюється генеричний засіб для державної реєстрації.

За даними американського видання The Wall Street Journal, за 17 місяців війни близько 50 тисяч українців втратили кінцівки (Pancevski, 2023). Такі ураження, як опіки та пролежні у поранених, могли б ефективно лікуватися препаратами на основі факторів росту, зокрема факторів росту фібробластів.

Під час пандемії спрей на основі кислих факторів росту фібробластів (rh-aFGF) показав свою ефективність у лікуванні пролежнів, спричинених носінням масок, що також підтверджує його терапевтичний потенціал (Pan, Dong, & Juan, 2020). Крім того, рекомбінантні фактори росту фібробластів можуть бути використані в косметичних продуктах для регенерації шкіри та усунення зморшок.

Таким чином, враховуючи потреби в терапевтичних продуктах на основі rhbFGF у вигляді спреїв, гелів, мазей та ін'єкцій, річна потреба в них для українського ринку становить:

- діабетична гангрена — 5,2 тис. пацієнтів;
- флебіти, тромбофлебіти — 282 тис. пацієнтів;
- опіки — 35,2 тис. пацієнтів;
- діабетична стопа — 96 тис. пацієнтів.

Загалом, потенційна кількість пацієнтів у мирний час становила б 418,4 тис. Однак із огляду на 50 тис. ампутацій, спричинених війною (Pancevski, 2023), можна прогнозувати, що потреба в rhbFGF під час війни значно зросте.

5.2.2. Розрахунок річної потреби рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів

Наступним кроком порахуємо кількість пацієнтів, які потребують лікування факторами росту фібробластів, відкинувши тих, у яких ураження невеликі, знаходяться на початковій стадії. Отже, для терапевтичних цілей, для території України, можна навести наступні розрахунки щодо кількості пацієнтів у мирний час:

1) у нас близько 100 000 хворих на цукровий діабет, які мають виразки стопи. Близько 30% - 30 000 реальні і потребують лікування:

1-ша група 50% хворих (15 000) – виразки менше 1 см в діаметрі;

2-а група 30% хворих (9 тис.) – виразки близько 2 см в діаметрі;

3-я група 20% хворих (6 тис.) – виразки більше 2 см в діаметрі;

2) опіки – потенціал ринку становитиме 16500 пацієнтів;

3) трофічні виразки – потенціал ринку 75000 пацієнтів.

Таким чином, загальна кількість потенційних пацієнтів складає 121,5 тис. Їх поділяють на три групи в залежності від ступеня ураження пацієнтів, що потребують лікування факторами росту фібробластів у мирний час (Kaken, 2024)

Поділ пацієнтів на групи за площею ураження

Поділ пацієнтів на групи за площею ураження	% пацієнтів від загальної кількості пацієнтів, що належать до різних груп за площею ураження	Кількість пацієнтів у групі	Необхідна кількість rhbFGF на курс лікування, мкг	Необхідна загальна кількість rhbFGF, г
1-ша група, площа ураження до 5 см	50%	60,8 тис	250 (30 мкг на добу)	15,1
2-га група, площа ураження до 10 см	30%	36,5 тис	500 (60 мкг на добу)	18,2
3-тя група, площа ураження до 10 см множинні	20%	24,3 тис	750 (90 мкг на добу)*	18,2

*добова доза не повинна перевищувати 1000 мкг на добу і курс лікування не повинен перевищувати 28 днів (Kaken, 2024)

Тобто загальний річний ринковий потенціал необхідності факторів росту фібробластів в Україні для терапевтичних цілей у мирний час дорівнює 51,5 г на рік.

За перший рік можна охопити 10% пацієнтів, які потребують терапії, це становитиме 5,15 г rhbFGF на рік. Кожен наступний рік очікується зростання кількості потреби в продукті на 10%.

У вибраній нами моделі отримання rhbFGF кінцева концентрація очищеного продукту становить 114.6 ± 5.9 mg/L (Li та ін., 2024).

Беручи до уваги потреби, що вирости під час активних бойових дій, ми можемо припустити, що потреба у продукті для терапевтичних може подвоїтися.

Для потреб космецевтики, потрібно взяти до уваги, що допустимі концентрації rhbFGF в косметичних формах у 10 разів менше, ніж в терапевтичних продуктах. В Україні приблизно 5 млн жінок знаходяться у віці 40+, з якого починають застосовувати антивікову косметику. Якщо припустити, що 20% (1 млн жінок) з них користуються кремами проти зморшок, і припустити, що з цієї кількості 1% (10000 жінок) придбають засіб проти зморшок з вмістом 0,001% rhbFGF. Середньостатистична жінка витрачає приблизно 180 мл крему на рік, з урахуванням, що упаковка крему 50 мл, то одній жінці на рік потрібно 3 упаковки крему. Якщо припустити, що в упаковці крему проти зморшок 25 мкг rhbFGF, то потрібно буде 750 мг rhbFGF на рік, що досить мала кількість, порівняно з терапевтичними потребами.

З огляду на можливість виходу з нашим продуктом на ринки Казахстану та Узбекистану, у рахуванням схожої кількості, та структури населення, захворюваності та потреб, можна припустити, що сумарна кількість продукту для цих двох країн буде такою самою, як в Україні. Тоді річна потреба в продукті rhbFGF для цих двох країн становитиме 5,2 г rhbFGF146 на рік. В таблиці 5.2 ми наводимо розрахунок п'ятирічного прогнозу продажів rhbFGF146 в Україні в мирний час, Узбекистані та Казахстані з урахуванням того, що в перший рік продажів ми зможемо охопити 10% пацієнтів, що потребують лікування продуктом rhbFGF146, і кожного наступного року кількість продажів буде рости на 10%.

**П'ятирічний прогноз продажів rhbFGF146 в Україні в мирний час,
Узбекистані та Казахстані**

Прогноз продажів rhbFGF в Україні в мирний час, Узбекистані та Казахстані (PK)	1й рік	2й рік	3й рік	4й рік	5й рік
Україна, rhbFGF, г	5,2	5,7	6,3	6,9	7,6
PK, Узбекистан, rhbFGF, г	5,2	5,7	6,3	6,9	7,6
Сума, г (m)	10,4	11,4	12,6	13,8	15,2
Кількість культуральної рідини в л (X), з урахуванням фінальної концентрації очищеного rhbFGF 114.6 ± 5.9 мг/л X=m/(114.6 ± 5.9 /1000)	91	100	110	120	133
Дохід, млн USD	2,1	2,3	2,5	2,8	3

З урахуванням того, що на сьогодні комерційна доступність hbFGF146 знаходиться в діапазоні від 700 до 1000 доларів США за 1 мг, навіть за припущення, що ми будемо продавати вироблений нами rhbFGF значно дешевше, 200 доларів США за 1 мг, річний дохід від продажу rhbFGF може коливатись у межах 2-3 млн доларів США на рік, що є непоганим показником доходності від реалізації продукту для фармацевтичного підприємства.

5.2.3. Розрахунок масштабу, частоти та об'єму річного виробництва рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів

У сучасних біофармацевтичних компаніях обсяг біоферментаторів, що використовуються для виробництва фармацевтичних білків, таких як моноклональні антитіла та інші рекомбінантні білки, може варіюватися в

широких межах. Однак типові обсяги для великомасштабного комерційного виробництва зазвичай потрапляють у такі діапазони:

Маломасштабне виробництво та пілотні дослідження:

Від 5 до 100 літрів: ці менші об'єми часто використовуються на ранніх стадіях досліджень, розробки процесів і пілотних досліджень.

Середньосерійне виробництво:

Від 100 до 1000 літрів: ферментери середнього масштабу використовуються для виробництва матеріалів для клінічних випробувань і для процесів, які ще не повністю масштабовані до комерційних рівнів.

Масштабне комерційне виробництво:

Від 1000 до 20 000 літрів: великомасштабні біореактори є робочим інструментом комерційного біофармацевтичного виробництва. Обсяги в діапазоні від 2000 до 15000 літрів є звичайними для багатьох промислових процесів.

Від 10 000 до 25 000 літрів: деякі з найбільших комерційних біореакторів можуть досягати від 20 000 до 25 000 літрів, особливо на підприємствах, призначених для виробництва популярних біопрепаратів.

З урахуванням розрахованих нами річних потреб, ми будемо застосовувати середньосерійне виробництво. А саме 200 літровий біореактор, який буде завантажуватися раз на рік. Нижче наведено схему розрахунку необхідного нам геометричного об'єма ферментера.

Загальна потреба в продукті rhbFGF для ринків України, РК, Узбекистану в мирний час: 104 г



В 1й рік можна охопити 10% пацієнтів rhbFGF в Україні, РК, Узбекистані: $104 \times 0,1 = 10,4$ г



Кожен наступний рік очікується зростання продажів на 10%. На 5й рік прогноз продажів в Україні, РК, Узбекистані буде: $10,4 \times 1,1^4 = 15,2$ г



Фінальна концентрація очищеного rhbFGF, що продукується *Escherichia coli* BL21 (DE3) plysS $114,6 \pm 5,9$ мг/л. Враховуючи це, кількість культуральної рідини:
 $V_f = 15,2 / 0,1146 = 132,6$ л



Річний об'єм цільового продукту rhbFGF ми отримуємо протягом одного циклу протягом доби. Враховуючи це, геометричний об'єм ферментера:
 $V_T = V_f / K_{зап} = 132,6 / 0,6 = 221$ л = **200** л

$K_{зап}$ - коефіцієнт заповнення ферментера (0,6-0,8);

V_T – геометричний об'єм ферментера;

V_f – об'єм культуральної рідини.

Рис.5.2. Схему розрахунку геометричного об'єма ферментера.

5.2.4. Обґрунтування вибору експресійної моделі для виробництва рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів

У дослідженні Rahman та ін. (2020) було успішно розроблено просту та економічно вигідну систему експресії, що підвищує розчинність і продуктивність рекомбінантного hbFGF у *E. coli*, відмінну від інших дорогих хроматографічних методів очищення. Отримана концентрація hbFGF становила 1,42 г/л, що є найвищим показником серед усіх розглянутих методів. По-перше, оптимізовано умови ферментації для великомасштабного виробництва Sc12-M-hbFGF. По-друге, уперше застосовано рН-залежну зміну фази на основі осадження білка для отримання rhbFGF, що є значною перевагою використання білкового злиття з Sc12-M. Також було впроваджено економічно ефективну одностадійну хроматографію для високоефективного виробництва рекомбінантного hbFGF. Загалом, необхідно знайти ідеальний ф'южн-тег, який покращує розчинну експресію та згортання, полегшує очищення, стійкий до протеазної деградації, легко видаляється і не впливає на біоактивність білка, а також підходить для великої кількості білків. Використання такого способу виробництва рекомбінантного hbFGF могло б мати застосування у сільському господарстві для вирощування м'язових клітинних культур. У нашій роботі ми детально розглядаємо виробництво hbFGF146 для терапевтичних цілей.

Попри це, проблеми, як-от недостатнє розщеплення мітки злиття, висока вартість протеаз та тривалий процес обробки, залишаються перешкодами для масштабного виробництва білків із мітками злиття. Наприклад, хоча hbFGF155 було успішно отримано у ферментаціях об'ємом від 40 до 150 л, hbFGF146 досі виробляють лише у колбах для струшування. Окрім цього, комерційний доступ до високоочищеного hbFGF146 пов'язаний із високими витратами, які становлять від 1300 до 2000 доларів США за міліграм. У нашій роботі, для задоволення зростаючого попиту на дослідження та клінічні застосування, ми пропонуємо впровадити процес ферментації та очищення з високою щільністю

клітин у масштабі 200 літрів для великомасштабного виробництва hbFGF (146 а.к.).

Через значний фармакологічний потенціал hbFGF, але складність його отримання з природних джерел у великих кількостях, було зроблено чимало спроб для розробки ефективних методів виробництва цього білка. Наразі hbFGF успішно виробляється у різних організмах, як-от *E. coli*, *Bacillus subtilis*, дріжджі *Pichia pastoris*, *A. thaliana* та соя. Деякі з цих білків експресувалися із використанням ф'южн-міток, як-от GST, His, Trx та Scl2. Zhang та ін. (2002) та Feng та ін. (2004) описали процес виробництва hbFGF155 у ферментації *E. coli* об'ємом 40 літрів, а Wang та ін. (2007) досягли виробництва цього білка у масштабі 150 літрів. Rassouli та ін. (2013), Dong та ін. (2021) та Soleyman та ін. (2016) експресували hbFGF146, hbFGFK18S/S69C 146 та Trx-hbFGF146 у колбах для струшування. У новіших дослідженнях Yang та ін. (2018), Hu та ін. (2018) та Le та ін. (2020) hbFGF146 було отримано у *A. thaliana*, *Bacillus subtilis* та *Pichia pastoris* відповідно. Однак є нестача досліджень великомасштабної ферментації та очищення hbFGF в *E. coli*, особливо для hbFGF146. У роботі Li та ін. (Li та ін., 2024) представлено надійний процес ферментації в масштабі 500 літрів із пілотним очищенням, що дає змогу отримати високоякісний та активний hbFGF146 у великих кількостях. Ми також керувалися цим дослідженням (Li та ін., 2024), враховуючи наші потреби та можливості виробництва hbFGF для застосування у сільському господарстві для вирощування м'язових клітинних культур. У таблиці 5.3 наведено порівняння продуцентів, використання яких на сьогоднішній день було найбільш ефективним в плані отримання кількості та чистоти отриманого продукту та масштабу ферментаційного процесу. При цьому перевага була надана саме тому продуценту, умови культивування якого дозволяли проводити масштабний ферментаційний процес отримання субстанції hbFGF146 у великих об'ємах (200 л і більше) та з найвищою концентрацією отриманого фінального очищеного продукту, оскільки вартість середовища у

даному випадку для різних продуцентів приблизно одного порядку і не є високою (приблизно 250 грн/л для *E. coli* BL21 (DE3)plysS (Li та ін., 2024), приблизно 450 грн/л для *Bacillus subtilis* 1A751 (Hu та ін., 2018), приблизно 20 грн/л для *Pichia pastoris* (Mu та ін., 2008) за цінами 2024 року, найбільш дороговартісним у складі середовищ є IPTG - індуктор T7 промотора (4 грн за 1 мг)), основне збільшення собівартості продукту відбувається за рахунок високовартісної очистки продукту за допомогою промислової хроматографії. Кінцевавартість продукту на ринку коливається у межах 700 – 1000 USD за 1 мг. Витрати на R&D є основною складовою високої ціни продукту.

Таблиця 5.3

Порівняння біологічних агентів

Продуцент	Особливості конструкції	Умови культивування	Масштаб ферментації	Концентрація rhbFGF
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)plysS (Li та ін., 2024)	T7 конструкт пригнічує синтез нецільових білків, накопичує менше оцтової кислоти, має вищу щільність клітинної культури за інші продуценти	Середовище з канаміцином г/л: триптон, 4.0 NaCl, 23.0 дріжджовий екстракт, 3.0 K ₂ HPO ₄ , 1.0 KH ₂ PO ₄ , 0.08 NH ₄ Cl, 2.0 глюкоза, 0.013 CaCl ₂ , 0.6 MgSO ₄ , 0.005 вітамін B1; +30% розчину глюкози, T=37°C, pH=7.0, DO 30%, t=10 год, 0,2 mM IPTG; Ціна 1 л ~ 250 грн	500 л	114 мг/л
<i>Pichia pastoris</i> (Mu та ін., 2008)	pPICZa експресійний вектор	ВММУ середовище: 1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 100 mM фосфат калію, pH 6,0, 1,34% дріжджового азотистого, 4 x 10 ⁻⁵ % біотину і 1% метанолу; T=30 °C, t=72 год, 10 мл метанолу щоденно; Ціна 1 л ~ 20 грн	2 л	91 мг/л
<i>Bacillus subtilis</i> 1A751 (Hu та ін., 2018)	грам+ не містить ендотоксинів, Ssp DnaB інтеїн, рM2-CellBD-DnaBbFGF експресійний конструкт	ММВЛ середовище в г/л: триптон 10; дріжджовий екстракт 10; NaCl 10; гліцерин 2; K ₂ HPO ₄ , 0,5; KH ₂ PO ₄ , 2,5; (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 2,0; MgSO ₄ , 1,0; розчин слідів металів, 1,0 мл/л; канаміцин, 70 мг/л, T=37°C, pH=6.8, +2 мл 50% розчину глюкози кожні 30 хв, DO 30%, t=6год, 0,5 mM IPTG; Ціна 1 л ~ 450 грн	2 л	84 мг/л

Таким чином наш вибір був за продуцентом *E. coli* BL21 (DE3)plysS, оскільки застосування T7 промоторного конструкту надавало переваги у отриманні найбільшого виходу біомаси та найбільшої кінцевої концентрації очищеного фінального продукту hbFGF146.

Комерційний штам *E. coli* BL21 (DE3)plysS і плазміда pET3c широко застосовуються для виробництва рекомбінантних білків, зокрема hbFGF. Попередні дослідження показали, що плазміда з промотором T7 забезпечує найвищі рівні експресії hbFGF в *E. coli* порівняно з промоторами trc, tac та λ PR за умов індукції IPTG (Mirzahoseini et al., 2004). Як бактерію-господаря було обрано *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS, оскільки вона містить невелику плазмиду, що кодує лізоцим T7. Цей лізоцим ефективно пригнічує синтез нецільових білків, не знижуючи при цьому рівень цільового білка. У порівнянні з *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3) накопичує значно менше оцтової кислоти та має на 25% вищу щільність клітинної культури (Yu та ін., 2021). Враховуючи необхідність уникати ампіцилінрезистентного гена у векторних конструкціях, у дослідженні Li та ін. (Li та ін., 2024) було модифіковано плазмиду pET3c, замінивши ген стійкості до ампіциліну на ген стійкості до канаміцину.

5.2.5. Загальна схема виробництва рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів

Загальну схему виробництва рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів в бактерії *E. coli* в штамі BL21 (DE3)plysS за допомогою ферментації можна схематично зобразити як на рис.5.3.



Рис.5.3. Загальна схема виробництва рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів в бактерії *E. coli* в штамі BL21 (DE3)plysS.

5.3. Конструювання вектора експресії та початкові етапи ферментації рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів

Відповідно до послідовності кДНК bFGF146 людини, отриманої з бази даних NCBI (номер доступу GenBank NM_002006.5), Li та ін. (2024) створили уточнену генну конструкцію 438 bp, яка кодує hbFGF (номер доступу GenBank OQ447501) шляхом ПЛР з перекриттям, а потім ампліфікували її стандартними методами ПЛР. Амплікони піддали розщепленню рестриктазами Nde I та BamH I при 37°C протягом 4 годин, після чого субклонували у модифіковану плазмиду pET3c-Kan (mpET-3c), отримавши рекомбінантну плазмиду mpET-3c/hbFGF. Автентичність конструкції підтверджували аналізом рестрикційних ферментів і секвенуванням. Далі плазмиду mpET-3c/hbFGF трансформували в комерційно доступний штам *E. coli* BL21 (DE3) plysS. Аналіз на резистентність підтвердив, що штам *E. coli* BL21 (DE3) plysS, трансформований pET3c-Kan, успішно ріс у середовищі LB з додаванням 300 мкг/мл канаміцинсульфату. Позитивні клони було відібрано за допомогою скринінгу на стійкість до канаміцину при концентрації 300 мкг/мл. Смуга, яка відповідала гену hbFGF, була помічена між 250 і 500 bp після розщеплення рестриктазами, що свідчило про успішну інтеграцію гена hbFGF у плазмиду mpET-3c. Крім того, після індукції спостерігалася стабільна експресія білка hbFGF, яку можна було ідентифікувати за білковою смугою між 14,3 і 20,1 кДа. Автентичність hbFGF також була підтверджена за допомогою моноклонального антитіла проти людського bFGF. Окрім цього, генетична стабільність штаму була перевірена після 30 поколінь, і штам *E. coli* BL21 (DE3) plysS-mpET3c/hbFGF продемонстрував високу стабільність без втрат плазмід. Важливо зазначити, що не спостерігалось змін у структурі плазмиди або зниження рівня експресії hbFGF для даного штаму. Крім того, штам залишався стабільним протягом 12 місяців при $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Li та ін., 2024).

Отже, поетапне культивування штаму *E. coli* BL21 (DE3) *plysS-mpET3c/hbFGF146* зі збільшення масштабу культивування з виходом на промисловий ферментаційний процес можна описати наступним чином. Плазмиду *mpET-3c/hbFGF* трансформували в штам *E. coli* BL21 (DE3) *plysS*. Успішну трансформацію було підтверджено стійкістю до канаміцину (300 мкг/мл). Позитивні клони відібрали для подальшого аналізу. Далі позитивні колонії вирощували в 5 мл стерильного середовища LB з канаміцином (100 мкг/мл) при 37°C і струшуванні (200 об/хв). Індукцію IPTG (1 мМ) проводили при OD600 = 0,8–1,2, продовжуючи культивування ще 4 години. Відібрано штам з найвищою експресією *hbFGF* для оптимізації ферментації. Оптимізацію здійснювали в колбах об'ємом 250 мл, використовуючи посівний штам у середовищі LB (100 мкг/мл канаміцину). Індукцію IPTG проводили при OD600 = 0,8–1,2. Умови: рН 6,8–7,0, температура 36–38°C, глюкоза 2 г/л, кисень > 25%. Посівний штам вирощували у 650 мл середовища LB з канаміцин сульфатом, потім переносили у 6,5 л середовища для ампліфікації 10-12 годин, а згодом у ферментаційне середовище (130 л у ферментері 200 л, (співвідношення 1:20, об/об), яке містило наступні компоненти (в г/л): 17,0 триптон, 4,0 NaCl, 23,0 дріжджовий екстракт, 3,0 K₂HPO₄, 1,0 KH₂PO₄, 0,08 NH₄Cl, 2,0 глюкози, 0,013 CaCl₂, 0,6 MgSO₄ та 0,005 вітаміну B₁). Через 2 години інкубації вводили 30% (маса/об.) розчин глюкози з різною швидкістю. Індукцію IPTG (0,2 мМ) після 5 годин інкубації проводили при OD600 = 19–24, рН 6,3–6,7, 38°C. Розчин кисню підтримували > 25%. Через 1 годину після початку індукції додавали джерело азоту, яке містило наступні компоненти (в г/л): 4,0 NaCl, 17,0 триптон, 23,0 дріжджовий екстракт, 4,0 MgSO₄, 3,0 K₂HPO₄ та 1,0 KH₂PO₄. Оскільки цільовий продукт є внутрішньоклітинним, після 5 годин індукції клітини збирали шляхом центрифугування при 16000 об/хв протягом 30 хвилин при температурі 4°C, а осад зберігали при -20°C.

РОЗДІЛ 6. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ

6.1.Опис етапів виділення та очищення субстанції людського рекомбінантного основного фактора росту фібробластів

Осаджені клітини ресуспендували у 20 мМ охолоджену буфері трис-НСІ (рН 8,0), що містив 0,05 М NaCl, 10 мМ EDTA-2Na і 10% гліцерину у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм). Після обробки під високим тиском при 200–300 бар один раз і 800–900 бар двічі, супернатант збирали центрифугуванням при 9000 об/хв протягом 30 хвилин. Далі супернатант наносили на колонку CM-Sepharose (φ8×20 см, об'єм шару 1000 мл), попередньо збалансовану, зі швидкістю 50 мл/хв і промивали 5 об'ємами колонки буфером А (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,1 М NaCl і 10% гліцерину) при такій самій швидкості. Елюювання білка проводили буфером В (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,36 М NaCl і 10% гліцерину) об'ємом 1,5–3 CV при 50 мл/хв. Після цього розчин завантажували на афінну колонку з гепарином (φ5,0×25 см, об'єм шару 500 мл) при швидкості 20 мл/хв. Після промивання буфером С (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,60 М NaCl і 10% гліцерину) в об'ємі 3,5 CV, елюювання білка виконували буфером D (20 мМ РВ, рН 7,5, 2,0 М NaCl і 10% гліцерину) об'ємом 1,4–2,0 CV при швидкості 20 мл/хв. Отриманий білковий розчин змішували з буфером Е (20 мМ РВ, 10% гліцерин) у співвідношенні 1:7 (об'єм/об'єм) та завантажували на колонку SP-Sepharose (φ5,0×13 см, об'єм шару 250 мл) зі швидкістю 20 мл/хв. Після промивання 2,5 CV буфером F (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,25 М NaCl і 10% гліцерину), цільовий білок елюювали буфером H (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,50 М NaCl і 10% гліцерину) об'ємом 3,0–4,0 CV та зберігали при –70 °С ± 5 °С.

Концентрацію білка hbFGF визначають за методом біцинхонінової

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ОТРИМАННЯ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Пальона І.В.						67	27
Перевір.	Стабніков В.П.					Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

кислоти (BCA), а чистоту оцінюють за допомогою SDS-PAGE, RP-HPLC та SEC-HPLC (чіткі основні піки при повинні бути в районі 17,520 і 13,126 хвилини відповідно, що вказує на високу чистоту білка (>99%)). Значення pI очищеного hbFGF визначали електрофорезом з ізоелектричним фокусуванням (IEF) (pI повинен становити 9,8), а біологічну активність оцінювали на клітинах NIH-3T3 методом МТТ. Крім того, автентичність очищеного hbFGF підтверджувалась компанією Applied Protein Technology Co., Ltd. (Шанхай, Китай) за допомогою MALDI-TOF/MS (молекулярна маса повинна становити 16,4 кДа), N/C-кінцевого секвенування та спектру кругового дихроїзму (CD) (Li та ін., 2024).

Слід зауважити, що, оскільки спостерігалась димеризація цільового білку після перших етапів хроматографії, і було виявлено, що після афінної хроматографії з гепарином димеризація або мультимеризація hbFGF збільшувалась, то для вирішення цієї проблеми додавали гліцерин у концентрації 10% (мас./об.), щоб зменшити або усунути димеризацію hbFGF шляхом підвищення в'язкості розчину. Однак, оскільки гліцерин знижує адсорбційну здатність гепарину на колонці, концентрацію NaCl у буфері врівноваження було знижено з 0,72 М до 0,6 М у пілотних експериментах з очищення для покращення виходу білка. Хроматографія на колонці SP-Sepharose використовувалась як заключний етап очищення, що дозволило ефективно розділити мономери та мультимери hbFGF, забезпечуючи, що вміст мультимерів у кінцевому продукті був меншим за 2%.

Особливості процесу очищення hbFGF включають комбінацію CM-Sepharose та афінної колонкової хроматографії з гепарином. Вдосконалення включали: 1) додавання 10% (мас./об.) гліцерину до буферу; 2) використання SP колонкової хроматографії для розділення мономерів та мультимерів. Відомо, що hbFGF є білком, що зв'язується з гепарином, із високою спорідненістю та pI 9,6, тому комбінація CM-Sepharose та афінної колонкової хроматографії з гепарином є оптимальною для очищення hbFGF, що підтверджується попередніми

дослідженнями (Feng та ін., 2004). Однак Platonova та ін. (2014) зазначили, що hbFGF, очищений за допомогою гепарину, може димеризуватися, тоді як очищення без гепарину цього не спричиняє. Для усунення димерів або мультимерів hbFGF, Li та ін. (2024) впровадили дві основні модифікації: перше – додавання 10% (мас./об.) гліцерину до буферу для зниження утворення мультимерів шляхом підвищення в'язкості; друге – використання SP колонкової хроматографії для ефективного розділення мономерів та мультимерів hbFGF на основі їх зарядових характеристик, що додатково збільшило чистоту білка.

Після проходження етапів хроматографії на CM-Sepharose, афінної хроматографії з гепарином та SP-Sepharose було успішно отримано високоякісний hbFGF. Очищений білок демонстрував стабільність протягом 9 місяців при $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ і протягом 2 тижнів при $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Коефіцієнти виходу для кожного етапу очищення становили $2,2\% \pm 0,4\%$, $77,4\% \pm 5,6\%$ і $81,7\% \pm 7,8\%$ відповідно (таблиця 6.1). За результатами аналізу SDS-PAGE, чистота hbFGF після кожного етапу очищення становила $75,9\% \pm 5,0\%$, $91,2\% \pm 5,9\%$ та $98,9\% \pm 0,9\%$ (таблиця 6.1). Кінцевий вихід очищеного hbFGF досяг $114,6 \pm 5,9$ мг/л культурального середовища, що є вищим у порівнянні з попередніми дослідженнями (таблиця 5.3).

6.2. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання субстанції цільового продукту.

Обґрунтування відділення культуральної рідини від біомаси.

Відокремлення бактеріальної біомаси від культурального середовища є ключовим етапом у багатьох біотехнологічних і мікробіологічних процесах. Існують різні методи поділу, кожен з яких має свої переваги та недоліки. Залежно від вимог щодо повноти відділення дисперсної фази та властивостей культуральної рідини, використовуються такі процеси, як фільтрація,

центрифугування, сепарація і рідше флотація (Карлаш, Красінько, 2022). Найпоширеніші методи розділення наведені нижче:

1. Центрифугування — це процес розділення неоднорідних систем у полі відцентрових сил. У мікробіологічній промисловості цей метод широко застосовується для відділення суспензій на рідку і тверду фази, що включають мікроорганізми, ферменти, амінокислоти та інші продукти біосинтезу. Центрифуги поділяються на осаджувальні (О), фільтруючі (Ф), комбіновані (К) та сепаратори (С) (Карлаш, Красінько, 2022).

Переваги центрифугування:

- Висока продуктивність завдяки відцентровим силам.
- Компактність обладнання.
- Швидкість процесу, особливо на великомасштабних рівнях.
- Забезпечення чистоти біомаси.

Недоліки центрифугування:

- Високі початкові інвестиції та експлуатаційні витрати.
- Значне енергоспоживання для високошвидкісних операцій.
- Ризик пошкодження біомаси та можливе перегрівання клітин.

2. Фільтрація заснована на затриманні біомаси через пористу перегородку. Існують барабанні, стрічкові, тарілчасті, карусельні фільтри та інші, які можуть працювати під вакуумом або при надлишковому тиску. Використовується переважно для відділення біомаси, коли метаболіти розчинені у рідині (Карлаш, Красінько, 2022).

Переваги фільтрації:

- Простота та доступність методу.
- Низька вартість порівняно з центрифугуванням.
- Легкий процес автоматизації.

Недоліки фільтрації:

- Менша ефективність для дрібних бактерій.

- Засмічення фільтрів, що вимагає регулярного технічного обслуговування.
- Складнощі з обробкою біомаси високої щільності.

3. Седиментація — осадження частинок внаслідок зміни фізико-хімічних умов. Метод широко застосовується для виробництва ферментів.

Переваги седиментації:

- Простота та низька вартість.
- Відсутність механічного стресу на клітини.

Недоліки седиментації:

- Повільний процес.
- Обмежена ефективність для дрібних частинок.

4. Флокуляція — процес, за якого утворюються флокули для відділення частинок.

Переваги флокуляції:

- Висока ефективність при правильному підборі реагентів.
- Відносно низька вартість обладнання та хімікатів.

Недоліки флокуляції:

- Введення хімікатів, що може викликати необхідність додаткового очищення продукту.
- Можливе пошкодження біомаси за несприятливих умов.

5. Мембранне розділення включає мікрофільтрацію, ультрафільтрацію та інші методи, що дозволяють затримувати колоїдні домішки, мікроорганізми та бактерії. Цей метод є ефективним для розділення продуктів, розчинених у рідині (Карлаш, Красінько, 2022).

Переваги мембранного розділення:

- Висока чистота та відсутність механічного стресу на клітини.
- Можливість забезпечення герметичності процесу.

Недоліки мембранного розділення:

- Високі витрати на мембрани та їх заміну.
 - Необхідність високого тиску для процесів ультрафільтрації.
6. Преципітація — випадання осаду при додаванні реагентів.

Переваги преципітації:

- Простота та доступність методу.
- Ефективність при використанні правильних реагентів.

Недоліки преципітації:

- Введення хімічних речовин, які можуть забруднювати продукт.

7. Флотація — використовується для відокремлення частинок, що утворюють агломерати із бульбашками газу (Карлаш, Красінько, 2022).

Переваги флотації:

- Висока ефективність для клітин, що прилипають до бульбашок.
- Відносна щадність до клітин.

Недоліки флотації:

- Можливе забруднення хімічними реагентами.
- Складне налаштування та керування процесом.

Придатність кожного методу визначається специфічними вимогами процесу, характеристиками бактеріальної культури, необхідним рівнем чистоти біомаси, масштабом операції та економічною доцільністю. В окремих випадках для підвищення загальної ефективності можна комбінувати різні методи (наприклад, спочатку використовувати центрифугування, а потім – фільтрацію). Для досягнення оптимальних результатів кожен метод може вимагати налаштування під конкретні бактеріальні штами та умови культивування. Обираючи метод для відділення бактеріальної біомаси від культурального середовища, необхідно враховувати ці переваги й недоліки з урахуванням вимог і обмежень процесу, щоб забезпечити ефективне відділення біомаси з мінімальним впливом на життєздатність бактерій і якість кінцевого продукту.

Оскільки кількість продукту залежить від обсягу біомаси, яку потрібно відокремити з мінімальними втратами, фільтрація в цьому випадку є непридатною. Для відділення біомаси від культуральної рідини доцільніше застосовувати фільтрувальне центрифугування. Цей метод має декілька переваг:

- не потребує використання дорогих фільтрувальних елементів,
- забезпечує мінімальні втрати активних речовин під час обробки,
- легший для автоматизації процес, оскільки обладнання компактніше, а його очищення простіше.

Отже, з огляду на викладене, для відділення біомаси рекомбінантної бактерії *E.coli* від культуральної рідини найбільш придатним є центрифугування. Через малий розмір бактеріальних клітин і необхідність мінімізувати втрати біоматеріалу, для розділення клітин і рідини потрібна велика відцентрова сила. Крім того, цей тип фільтрації має високий коефіцієнт корисної дії та знижений ризик пошкодження клітинних мембран. Значний об'єм культуральної рідини потребує високопродуктивного процесу, який може забезпечити центрифугування. Оскільки обсяг культуральної рідини, який утворюється за одну ферментацію, є відносно невеликим, і для відділення біомаси потрібні 16000 об/хв, можна використовувати центрифугу GEA Westfalia Separator hycon, яка підтримує потрібну низьку температуру 4°C.

Обґрунтування методу дезінтеграції (гомогенізації) біомаси.

Наступним етапом виділення та очищення цільового білка є гомогенізація біотехнологічно культивованих клітин.

Для вибору схеми виділення і очищення цільового продукту мікробного синтезу велике значення має локалізація цільового продукту. У випадку, коли цільовий продукт внутрішньоклітинний, схема наступна: дезінтеграція клітин, виділення цільового продукту з дезінтеграту (видалення уламків клітин, екстракція, осадження, концентрування, кристалізація тощо), сушіння.



Рис. 6.1. Методи руйнування мікробної клітини (Geciova, Bury, Jelen, 2002)

Повне руйнування клітинної стінки та вивільнення всіх внутрішньоклітинних компонентів вимагає розщеплення таких структурних елементів, як пептидоглікан у грамнегативних бактерій та глюкан у дріжджів (Middelberg, 1995). Механічні методи забезпечують неспецифічне руйнування, тоді як немеханічні методи (фізичні, хімічні та ферментативні) є більш вибірковими та м'якими. На рисунку 6.1 наведені основні методи руйнування мікробних клітин.

Механічні методи. Ці методи ґрунтуються на підданні клітин інтенсивному стресу через високий тиск, перетирання під час швидкого перемішування зі скляними кульками або за допомогою ультразвуку (Engler, 1985). Механізми механічного руйнування включають кавітацію, зсув або удар (Sauer, Robinson, & Glick, 1989). Охолодження клітинної суспензії під час обробки необхідне для усунення тепла, що виникає в результаті розсіювання механічної енергії (Engler, 1985). Метод гомогенізації високим тиском або мікрофлюїдизація можна масштабувати для промислового використання.

Кульовий млин. Початково використовуваний у лакофарбовій промисловості, кульовий млин був адаптований для руйнування клітин у лабораторних та промислових умовах. Він є ефективним для різних мікроорганізмів і має декілька дизайнів. Основна конструкція включає обертальний вал з мішалками, що переміщують скляні кульки, які, в свою чергу, стикаються з клітинами. Вибір діаметра кульок впливає на ефективність (Kula & Shutte, 1987). Зазвичай оптимальним вважається завантаження кульок на 80–85%, оскільки більше завантаження спричиняє підвищене виділення тепла (Kula & Shutte, 1987). Для руйнування бактерій використовують кульки діаметром 0,10–0,15 мм, а для дріжджів — 0,25–0,75 мм (Middelberg, 1995). Промислові кульові млини можуть використовувати кульки діаметром більше 0,4–0,6 мм через потребу у механізмі відокремлення кульок від суспензії (Kula & Shutte, 1987). Оптимальна ефективність руйнування досягається при 40–50% вмісті вологої маси у бульйоні, що подається в камеру (Middelberg, 1995). Для розриву клітин дріжджів, а особливо цвілевих грибів, кульовий млин працює значно краще, ніж для бактерій (Middelberg, 1995). Невеликі розміри бактеріальних клітин утруднюють їх руйнування, оскільки вони приблизно у 10 разів менші за клітини дріжджів (Shutte et al., 1983). Для підвищення ефективності процесу і скорочення його тривалості можна застосовувати два або більше млинів послідовно, що збільшує середній час перебування замість зниження швидкості потоку (Kula & Shutte, 1987).

Ультразвукова обробка є одним із найпоширеніших методів дезінтеграції клітин у лабораторних умовах (Engler, 1985). Звукові хвилі з частотою понад 15–20 кГц здатні спричинити як інактивацію, так і руйнування клітин у суспензії за умови високої акустичної потужності. Цей процес зумовлений кавітацією, де напруження зсуву створюється в'язкими вихорами від ударних хвиль, спричинених вибухом кавітаційних бульбашок. Вихори великого розміру, порівняно з клітинами, переміщують клітини без руйнування, а менші вихори

здатні викликати руйнівне напруження. Так, великі клітини зазнають більш інтенсивного впливу від руйнівних вихорів, ніж малі.

Константа швидкості руйнування клітин має тенденцію збільшуватися зі зростанням потужності, але зменшується із зростанням об'єму суспензії (в діапазоні 2,5–10 мл). Основна частина ультразвукової енергії, поглинутої клітинною суспензією, перетворюється на тепло, тому контроль температури є необхідним (Chisti & Moo-Young, 1986). Недостатнє охолодження поблизу ультразвукового зонда може призвести до деградації ферментів через теплову денатурацію (Chisti & Moo-Young, 1986; Engler, 1985). Ультразвукові камери проточного типу доступні для обробки більших об'ємів, але метод залишається малоефективним для пілотного або промислового застосування.

Гомогенізація під високим тиском. Руйнування клітин у гомогенізаторі високого тиску відбувається шляхом пропускання суспензії під великим тиском через регульований клапан із вузьким отвором. Ефективність цього методу визначається робочим тиском і кількістю проходів через клапан (Engler, 1985), а також температурою суспензії та конструкцією клапана (Keshavarz-Moore, Hoare, & Dunnill, 1990). Основна конструкція складається з насоса, що проштовхує суспензію через клапан, де вона розширюється, ударяючись об кільце (Middelberg, 1995). Результатом є неспецифічний розрив клітинної стінки, що є ефективним способом руйнування дріжджових клітин. Робочий тиск часто обмежений, щоб уникнути дезактивації термочутливих білків, що може збільшити кількість проходів (Kula & Shutte, 1987). У фармацевтичній і біотехнологічній промисловості гомогенізатори високого тиску застосовуються для промислового руйнування бактерій і дріжджів. Однак при екстракції термочутливих матеріалів необхідне зовнішнє охолодження через можливе перегрівання.

Фізичні методи дезінтеграції. Серед методів фізичного руйнування з потенціалом для масштабного використання варто відзначити декомпресію, що

включає введення субкритичного або надкритичного газу під тиском з наступним швидким зниженням тиску, осмотичний шок та термоліз. Однак ці методи мають обмежену ефективність і застосовність (Middelberg, 1995).

Хімічне проникнення. Клітинна стінка мікроорганізмів може бути зроблена проникною за допомогою різноманітних хімічних речовин, таких як антибіотики, детергенти та інші агенти. Однак хімічне проникнення з використанням детергентів або розчинників не призводить до вивільнення внутрішньоклітинних ферментів і може спричинити забруднення продукту активними речовинами, що ускладнює подальші процеси очищення (Somkuti et al., 1998).

Ферментативний лізис. Ферментативне руйнування клітин має перевагу у специфічності й м'якості. Автоліз і використання літичних ферментів є альтернативними методами, які можуть знайти промислове застосування (Chisti & Moo-Young, 1986; Middelberg, 1995). Наприклад, лізоцим використовується для лізису пептидогліканових шарів грампозитивних бактерій. Для грамнегативних бактерій його ефективність підвищується за допомогою ЕДТА (Salisbury, 1989).

Серед сотень методів дезінтеграції більшість є механічними (Карлаш, Красінько, 2022). Кожен метод має свої переваги та обмеження:

Приклади популярних методів гомогенізації клітин, їхні переваги й недоліки

Механічна гомогенізація

Переваги:

- Підходить для клітин зі щільними оболонками, також зручний для великих обсягів.
- Широко застосовується для різноманітних клітин і тканин.
- Регулювання параметрів, таких як тиск і кількість проходів, дає змогу контролювати ступінь гомогенізації.

Недоліки:

- Виділяє тепло, що може зашкодити термолабільним молекулам.
- Сили зсуву іноді пошкоджують тендітні молекули та структури.
- Вимагає дорогого обладнання та може призводити до варіацій між партіями.

Ультразвукова обробка

Переваги:

- Делікатне руйнування клітин із мінімальним нагріванням.
- Ефективний для руйнування міцних клітинних стінок та мембран.
- Підходить для обробки різних об'ємів і виконується швидко.

Недоліки:

- Обмежений масштаб, важко використовувати на промисловому рівні.
- Може викликати кавітацію, що шкодить чутливим молекулам, та потребує спеціального обладнання.

Гомогенізація під високим тиском

Переваги:

- Висока ефективність у руйнуванні клітин з мінімальним тепловиділенням.
- Підтримує цілісність чутливих до тепла сполук і підходить для масштабних операцій.

Недоліки:

- Потребує складного обладнання та значної енергії, а також ретельної оптимізації процесу для кожного типу клітин.

Хімічна гомогенізація (з використанням ПАР, ферментів)

Переваги:

- Щадний метод порівняно з механічними, що вибірково руйнує мембрани.

- Простота застосування та відносно легкий процес.

Недоліки:

- Можливі залишки реагентів, які можуть вплинути на подальшу очистку продукту.
- Обмеження у масштабуванні через змінну активність реагентів.

Літичні ферменти

Переваги:

- Ніжний метод, що підходить для субклітинних структур та діє на широкий спектр мікроорганізмів.
- Застосовують очищені препарати, як-от лізосубтилін, для дріжджів, грибів, бактерій.

Недоліки:

- Висока вартість ферментних препаратів.
- Відсутністю масштабного виробництва високоочищеної продукції (Карлаш, Красінько, 2022).

Кожен метод має свої специфічні переваги й недоліки, тож вибір залежить від особливостей завдання, типу клітин і кінцевої мети. При виготовленні вакцин або гормонів, як, наприклад, інсуліну, часто використовують дво- чи трикратний проходи і двоступеневу гомогенізацію на 900-1200 бар (Карлаш, Красінько, 2022). У нашій роботі обрано метод трикратної гомогенізації клітин високим тиском, що включає перший прохід на 200-300 бар і два наступних на 800-900 бар, для гомогенізації рекомбінантних клітин E. coli з метою отримання внутрішньоклітинного білка. Такий підхід дає змогу ефективно руйнувати клітинні стінки, не порушуючи цілісності білка, що є критичним для подальших застосувань. Правильне налаштування параметрів гомогенізації (тиск, кількість циклів) сприяє максимальному виділенню білка без додавання сторонніх біомолекул, які могли б ускладнити очищення продукту.

Гомогенізація під високим тиском дозволяє уникнути ризику теплової денатурації та є економічно виправданим методом. Обладнання для цього методу здатне працювати в різних діапазонах тиску та масштабується відповідно до потреб виробництва. Узгодженість умов (тиск, кількість проходів) між партіями є важливою для стабільного виходу білка. Метод забезпечує високу якість продукту та знижує ризики коагуляції чи розшарування продукту (Карлаш, Красінько, 2022).

Вибраний метод гомогенізації сумісний з наступними хроматографічними етапами очищення білка. Ефективне видалення клітинних уламків після гомогенізації має вирішальне значення для забезпечення чистоти екстрагованих білків.

Експлуатаційні витрати пов'язані з обладнанням для гомогенізації під високим тиском, споживанням енергії та обслуговуванням є сумісними з потребами гомогенізації культивованих клітин у м'який спосіб та з збереженням нативної форми цільового білка.

Отже, вибір двоступінчатої гомогенізації під високим тиском при 200-300 бар одиноразовий прохід, а потім 800-900 бар дворазовий прохід для гомогенізації рекомбінантних клітин *E. coli* для екстракції внутрішньоклітинного білка передбачає досягнення високої ефективності руйнування клітин, збереження цілісності цільового білка, масштабованості, економічної ефективності та відповідність нормативним вимогам. Оптимізація цих факторів забезпечує успішне виділення цільового білка і подальшу його обробку для різних біотехнологічних і фармацевтичних застосувань.

Гомогенізатор являє собою мультиплунжерний насос, що нагнітає продукт у гомогенізуючий клапан спеціальної конструкції, що створює необхідний тиск для мікронізації часточок продукту. У гомогенізуючому клапані часточки піддаються одночасно впливу чотирьох сил: турбулентності, кавітації, ударного навантаження та напруги зрушення. Сукупність цих факторів приводить до

ефективного подрібнювання часток. У нашій роботі ми плануємо застосувати гомогенізатор GEA.

Обґрунтування методу очищених цільових білків.

Отримання очищених цільових білків з гомогенізованих клітин *E. coli* передбачає використання різних методів, кожен з яких має свої особливості. Ось кілька популярних методів, разом з їхніми перевагами та недоліками:

Осадження солями або органічними розчинниками:

Плюси:

- Метод є простим та швидким у виконанні.
- Зазвичай використовуються недорогі солі та органічні розчинники.
- Підходить для обробки як малих, так і великих об'ємів лізату.

Мінуси:

- Не завжди забезпечує високу чистоту білків і може осаджувати небажані домішки.
- Суворі умови осаження можуть призводити до денатурації цільових білків.
- Деякі білки можуть не осаджуватись цим методом.

Хроматографія (наприклад, афінна хроматографія, іонообмінна хроматографія): Це метод, що базується на розподілі компонентів між рухомою та нерухою фазами. Нерухома фаза представлена твердим сорбентом, а рухома фаза — рідиною або газом, що проходить через нерухому фазу (іноді під тиском). Компоненти суміші пересуваються уздовж стаціонарної фази. Швидкість їх переміщення залежить від сили взаємодії з поверхнею сорбенту.

Плюси:

- Динамічний розподіл.
- Використання різних типів взаємодій забезпечує селективний розподіл широкого спектра речовин.

- Можливість застосування додаткових полів (гравітаційного, електричного, магнітного) для розширення хроматографічних можливостей.
- Поєднує розподіл і визначення кількох компонентів одночасно.
- Забезпечує високу чистоту завдяки специфічним взаємодіям з лігандами.
- Універсальність: може бути адаптована для різних білків.
- Масштабність: підходить для лабораторного і промислового очищення.

Мінуси:

- Вартість: може бути дорогою через вартість колонок і смол.
- Складність: вимагає досвіду у наповненні колонок та оптимізації елюції.
- Для очищення деяких білків може знадобитися кілька хроматографічних етапів.

Обернено-фазова хроматографія:

Плюси:

- Висока роздільна здатність на основі гідрофобності.
- Корисна для очищення гідрофобних білків або пептидів.
- Можливість масштабування.

Мінуси:

- Обмежена специфічність для деяких білків.
- Може вимагати спеціального обладнання.

Електрофорез у гелі (наприклад, SDS-PAGE):

Плюси:

- Висока роздільна здатність для розділення білків.
- Можливість виділення певних білкових смуг з гелю.
- Аналітичний підхід для оцінки чистоти білка.

Мінуси:

- Обмеження у масштабі виробництва.
- Необхідність обережного поводження та тривалих процедур.
- Складнощі з виділенням великих білків.

Ультрафільтрація:

Плюси:

- Ефективне концентрування білків.
- Зазвичай щадний метод для білків.
- Підходить для великих обсягів лізату.

Мінуси:

- Мембрани можуть забруднюватись, що знижує ефективність.
- Може не забезпечити розподіл на основі специфічних взаємодій.
- Високі витрати на якісні мембрани.

Солюбілізація та рефолдинг (для тілець включення):

Плюси:

- Можливість відновлення білків з тілець включення.
- Забезпечує відносно чистий білок після повторного згортання.
- Корисно для нерозчинних білків.

Мінуси:

- Процес може бути складним та трудомістким.
- Може призвести до нижчого виходу порівняно з іншими методами.

Отже, вибір методу очищення залежить від властивостей цільового білка, таких як розмір, заряд і гідрофобність, а також від вимог до масштабу та чистоти. Часто для досягнення високої чистоти та виходу використовують комбінацію методів, наприклад, початкове осадження з наступною хроматографією. Важливо зважати на вартість матеріалів, обладнання та робочої сили в контексті бажаної чистоти і виходу.

У нашому випадку рекомбінантний фактор росту фібробластів потребує високої чистоти, а загальна потреба в цьому продукті є досить незначною. Оскільки продукт є дорогим і потребує високої чистоти, планується його використання в формі спрею. Тому найбільш прийнятними методами для отримання високоякісного продукту з високою чистотою та ефективністю є використання послідовних хроматографічних методів: іонообмінна хроматографія в колонці з CM-сефарозою, SD-сефарозою та афінна хроматографія з гепарином.

Іонообмінна хроматографія є методом, що дозволяє розділяти іони та полярні молекули на основі їхнього заряду. Вона може бути використана для розподілу заряджених молекул, включаючи великі білки. Взаємодія між зразком та сорбентом базується на кулонівських взаємодіях. Сорбент має іонні функціональні групи, які взаємодіють з іонами протилежного заряду.

Афінна хроматографія є методом, що базується на специфічних взаємодіях між білком і лігандом, пов'язаним з матрицею. Цей метод відзначається високою селективністю і дозволяє очищати біомолекули в кілька тисяч разів. Афінна хроматографія забезпечує очищення, яке важко або неможливо досягти іншими методами (Карлаш, Красінько, 2022).

Очищення білка hbFGF здійснюється шляхом послідовного використання колонок CM-Sepharose, афінної хроматографії з гепарином і SP-Sepharose. Колонки CM-Sepharose, heparin-Sepharose CL-6B та SP-Sepharose були вибрані компанією GE Healthcare (Сполучені Штати) для зменшення кількості димерів у фінальному продукті.

Обґрунтування методу зберігання цільових білків.

Отриманий білок hbFGF продемонстрував стабільне зберігання протягом 9 місяців при $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ і 2 тижні при $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Li та ін., 2024), що є

прийнятним для невеликих об'ємів АФІ високовартісного продукту, як у випадку нашого продукту.

6.3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

В роботі Li та ін., на яку ми спираємося в наших розрахунках, дано короткий опис процесу очищення hbFGF (Середня \pm SD) (Li та ін., 2024).

Таблиця 6.1

Короткий опис процесу очищення hbFGF

Етапи очищення	Об'єм очищення (mL)	Загальна кількість протеїну (mg)	Цільовий протеїн (mg)	SDS-PAGE чистота (%)	Відновлення (%)
Бактеріальний лізат	8000 \pm 0 (893.6 \pm 23.2 g)*	153,420 \pm 28,430.8	37,532.5 \pm 6097.8	24.6 \pm 1.8	—
СМ-Сефароза	1422 \pm 278.3	3236.6 \pm 97.8	2458.4 \pm 223.6	75.9 \pm 5.0	2.2 \pm 0.4
Афінна хроматографія з гепарином	274.8 \pm 23.1	2501.7 \pm 141.9	2279.0 \pm 133.4	91.2 \pm 5.9	77.4 \pm 5.6
SP-Сефароза	858.5 \pm 88.3	2036.3 \pm 92.9	2013.9 \pm 93.6	98.9 \pm 0.9	81.7 \pm 7.8

* Мокра вага бактерій для одноразового процесу очищення.

Кінцева концентрація очищеного rhbFGF146: 114.6 \pm 5.9 мг/л культури

Культуру переносили в ферментаційне середовище об'ємом 130 л у ферментер об'ємом 200 л, через 5 годин після індукції, після центрифугування бактерії вагою 7797 \pm 73 г збирали та зберігали при -20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C, вони залишались життєздатними протягом 9 місяців.

а. об'єм культуральної рідини (КР) з однієї ферментації: **130л;**

b. кінцева концентрація цільового очищеного продукту у КР: **0,1146 ± 0,0059 г/л**;

c. вага зібраних після центрифугування бактерій: **7797 ± 73 г**;

d. концентрація біомаси у КР: **46,8 ± 0,3 г/л**;

e. рівень експресії hbFGF: **28,2% ± 0,2%**;

f. втрати протеїну (у %) на стадіях виділення цільового продукту: **98%**

Таблиця 6.2

Орієнтовні величини втрат цільового продукту залежно від стадії виробництва

№ З/П	Стадія виділення	Цільовий протеїн (мг) на одне завантаження стадії виділення	Величина втрат загального протеїну, %
	Клітини у ферментері	46207	
1.	Фільтрування, центрифугування, сепарування	43897	5
2.	Осадження солями, розчинниками	39507	10
3.	Утворення бактеріального лізату	37533	5
4.	Хроматографічне виділення на CM-Сефарозі	2458	98
5.	Афінна хроматографія з гепарином	2279	22
6.	Хроматографічне виділення на SP-Сефарозі	2014	18
7.	Сушіння (ліофільне)	1812	10
8.	Подрібнення, просіювання, фасування	1722	5

Таблиця 6.3

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати, (Разом 94%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 1 Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина (E. coli BL21 (DE3)plysS 46,8 ± 0,3 г/л культури)	130 л	-	130 л	Збірник КР 200 л, 4С
ТП 2 Відокремлення біомаси						
2	ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини	Біомаса (волога)	7,797кг	0,3 кг (2%)	7,4 кг	Центрифуга 16000 об/хв, 30 хв, 4С, (поділ біомаси на 7 рівних частин по 1057г) ручне перенесення шести рівних частин біомаси в морозильник -20С та одну частину в збірник об'ємом 10 л
		Фугат	-	-	122,6 л	На утилізацію
ТП 3 Дезінтеграція (гомогенізація) біомаси						
3	ТП 3.1. Ресуспензування осаду	20 мМ охолоджений Трис-НСІ буфер (рН 8,0): 0,05 NaCl 10мМ EDTA-2Na, 10% гліцерин (1:10 маса/об'єм)	8 л	-	-	Збірник об'ємом 10 л за допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10 л подається до гомогенізатора GEА, що являє собою мультиплунжерний насос високого тиску 800-900 бар
		Вологий осад біомаси	1057 г	1%	1046г	

Продовження таблиці 6.3

4	ТП 3.2. Гомогенізація	Гомогенат	9 л	5%	8,6 л	гомогенізатор GEA: мультиплунжерний насос високого тиску 800-900 бар; дезінтегрована біомаса за допомогою насосу подається до реактору змішувача об'ємом 10 л
ТП 4 Отримання супернатанту з цільовим продуктом						
5	ТП 4.1. Перемішування гомогенату	Гомогенат	8,6 л	2%	8,4 л	Реактор змішувач об'ємом 10 л; перекачується за допомогою відцентрового насосу продуктивністю 10л до центрифуги
6	ТП 4.2. Видалення осаду центрифугуванням	Гомогенат	8,4 л	3%	8,15 л	Центрифуга продуктивністю 9000 об/хв, за допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10л перенесення в збірник об'ємом 10 л
		Супернатант	8,15 л	2%	8 л	Збірник об'ємом 10 л; за допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10л перенесення в CM-Sepharose колонку хроматографа
		Осад, що містить залишки і уламки клітин	-	-	750г	На утилізацію

ТП 5 Очищення rhbFGF						
7	ТП 5.1. Хроматографічне очищення rhbFGF на колонці CM-Sepharose	Супернатант	8 л	-	-	CM-Sepharose хроматографічна колонка (d8x20 см, об'єм шару 1000 мл) зі швидкістю потоку 50 мл/хв
		Промивання колонки 5 об'ємами колонки буфером А: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,1 М NaCl, 10% гліцерин	5 л	-	-	
		Розчин буфера з незв'язаними білками супернатанту	-	-	12 л	Утилізація
		Промивання колонки 3 об'ємами колонки буфером В для елюювання: 20 фосфатний буфер (рН 7,5), 0,36 М NaCl, 10% гліцерин	3 л	-	-	CM-Sepharose хроматографічна колонка (ф8x20 см, об'єм шару 1000 мл) зі швидкістю потоку 50 мл/хв; Очищений розчин rhbFGF надходить в збірник обсягом 10 л.
		Загальна кількість протеїну	153,448 г	98%	3,238 г	
		Кількість rhbFGF	37,533г	98%	2,459 г	
		Очищений розчин rhbFGF	-	2%	3 л	Очищений розчин rhbFGF зі збірника обсягом 10 л за допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10л переноситься в колонку хроматографа з гепарином

Продовження таблиці 6.3

8	ТП 5.2. Афінне хроматографічне очищення rhbFGF на колонці з гепарином	Очищений розчин rhbFGF	3л	-	-	Хроматографічна колонка з гепарином (φ5x25 см, об'єм шару 500 мл) зі швидкістю потоку 20 мл/хв
		Промивання колонки 3,5 об'ємами колонки буфером С: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,6 М NaCl, 10% гліцерин	1,75л	-	-	
		Розчин буфера з незв'язаними білками супернатанту	-	-	4,25 л	Утилізація
		Промивання колонки 2 об'ємами колонки буфером D для елюювання: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,36 М NaCl, 10% гліцерин	1л	-	-	Хроматографічна колонка з гепарином (φ5x25 см, об'єм шару 500 мл) зі швидкістю потоку 20 мл/хв; Очищений розчин rhbFGF надходить в збірник обсягом 10 л.
		Загальна кількість протеїну	3,238 г	22%	2,502 г	
		Кількість rhbFGF	2,459 г	22%	2,28 г	
		До очищеного розчину rhbFGF додали буфер E: 20 мМ фосфатний буфер, 10% гліцерин у співвідношенні 1:7 (об'єм:об'єм)	7,16 л	2%	8 л	Очищений розчин rhbFGF з буфером E зі збірника обсягом 10 л за допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10л переноситься в SP-Sepharose колонку хроматографа

Закінчення таблиці 6.3

9	ТП 5.3. Хроматографічне очищення rhbFGF на колонці SP-Sepharose	Очищений розчин rhbFGF	8л	-	-	SP -Sepharose хроматографічна колонка (φ5x13 см, об'єм шару 250 мл) зі швидкістю потоку 20 мл/хв
		Промивання колонки 2,5 об'ємами колонки буфером F: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,25 М NaCl, 10% гліцерин	0,65 л	-	-	
		Розчин буфера з незв'язаними білками супернатанту	-	-	8,4 л	Утилізація
		Промивання колонки 4 об'ємами колонки буфером H для елюювання: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,5 М NaCl, 10% гліцерин	2 л	-	-	SP -Sepharose хроматографічна колонка (φ5x13 см, об'єм шару 250 мл) зі швидкістю потоку 20 мл/хв
		Загальна кількість протеїну	2,502 г	18%	2,036 г	
		Кількість rhbFGF	2,28 г	18%	2,014 г	
			Очищений розчин rhbFGF	-	2%	2л
ТП 6 Зберігання цільового продукту						
10	Зберігання очищеного розчину rhbFGF	Очищений розчин rhbFGF	2 л	-	-	Зберігання цільового продукту в морозильній камері з температурою -70±5°С протягом 9 місяців

6.4. Специфікація обладнання для етапу виділення та очищення цільового продукту

Таблиця 6.4

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
З-1	Збірник з кожухом 100 л	1 шт	Металева ємність з кожухом для підтримання температури 4°C, оснащена перемішуючим пристроєм з нижнім спуском
Н-2 Н-5 Н-9 Н-13 Н-16 Н-19	Насос відцентровий	6 шт	Продуктивність 0,3м ³ /год
Ц-3 Ц-10	Безперервна центрифуга з автоматичним шнековим вивантаженням осаду	2 шт	Продуктивність 0,2 м ³ /год; GEA Westfalia Separator hycon, що підтримує задану низьку температуру
З-4 З-8 З-12 З-15 З-18	Збірник 10 л	5 шт	Металева ємність, оснащена перемішуючим пристроєм з нижнім спуском
Г-6	Гомогенізатор GEA Lab Homogenizer PandaPLUS 1000	1 шт	Максимальний тиск 1000 бар. Продуктивність 0,2 м ³ /год
Н-7 Н-11 Н-21	Насос регулювальний (змінної продуктивності): з одним напрямком потоку (нереверсійний)	3 шт	Продуктивність 0,3 м ³ /год

Закінчення таблиці 6.4

ХК-14	Хроматографічна колонка для іонообмінної хроматографії з СМ-сефарозою	1 шт	СМ-Sepharose колонки компанії GE Healthcare (United States); Розмір: 8x20см; Продуктивність 0,3 м ³ /год
ХК-17	Хроматографічна колонка для афінної хроматографії з гепарином	1 шт	Heparin-Sepharose CL-6B колонки компанії GE Healthcare (United States); Розмір: 5x25см; Продуктивність 0,12 м ³ /год
ХК-20	Хроматографічна колонка для іонообмінної хроматографії з SP-сефарозою	1 шт	SP-Sepharose колонки компанії GE Healthcare (United States); Розмір: 5x13см; Продуктивність 0,12 м ³ /год
М-22	Морозильна камера	1 шт	Лабораторний морозильник з ультра низькою температурою на 50 л. (-10...-86°C) горизонтальний компанії Glewdoor, модель DW-HW50

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ

7.1. Етапи виділення та очищення субстанції

Технологічна схема виділення і очищення субстанції генно-інженерного білка фактору росту фібробластів включає в себе технологічний процес, а саме: відділення біомаси, дезінтеграція (гомогенізація) біомаси, отримання супернатанту з цільовим продуктом, хроматографічне очищення та зберігання продукту.

Технологічну схему виділення та очищення білка наведено в графічній частині кваліфікаційної роботи.

ТП 1 Зберігання культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у збірнику (З-1) на 200 л при температурі 4-8 °С для подальшого відділення та очищення рекомбінантного людського базового фактору росту фібробластів.

ТП 2 .Відділення біомаси

ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина через насос Н-2 подається до безперервної центрифуги з автоматичним шнековим вивантаженням осаду Ц-3. Вмикається режим 16000 об/хв на 30 хвилин. Центрифуга розділяє біомасу і фугат. Біомаса поділяється на 7 рівних частин по 1057 г. Далі відбувається ручне перенесення шести рівних частин біомаси в морозильник при $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ та одну частину в збірник об'ємом 10 л (З-4), що знаходиться, як і інше обладнання для виділення і очистки продукту, в холодному приміщенні при температурі 4С. Отриманий фугат подається на знешкодження.

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Пальона І.В.					94	7
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

ТП 3 Дезінтеграція (гомогенізація) біомаси

ТП 3.1. Ресуспензування осаду

В збірнику об'ємом 10 л (З-4) за умови додавання до вологого осаду масою 1057 г 20 мМ охолодженого Трис-НСІ буферу (рН 8,0): 0,05 NaCl 10мМ EDTA-2Na, 10% гліцерину (1:10 маса/об'єм) у обсязі 8 л відбувається ресуспендування осаду протягом 20 хв.

За допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10 л (Н-5) ресуспендований вологий осад біомаси (9 л) подається зі збірника (З-4) до гомогенізатора GEA (Г-6), що являє собою мультиплунжерний насос високого тиску.

ТП 3.2. Гомогенізація

В гомогенізаторі GEA, що являє собою мультиплунжерний насос високого тиску 800-900 бар (Г-6) відбувається гомогенізація біомаси рекомбінантного людського базового фактору росту фіброблостів один раз при тиску, що дорівнює 200-300 бар, та два рази при тиску 800-900 бар. Далі дезінтегрована біомаса за допомогою насосу (Н-7) подається до реактору змішувача об'ємом 10 л (З-8).

ТП 4 Отримання супернатанту з цільовим продуктом

ТП 4.1. Перемішування гомогенату

В реакторі змішувачі об'ємом 10 л (З-8) відбувається перемішування дезінтегрованої біомаси протягом 20 хв, яка в подальшому перекачується за допомогою відцентрового насосу продуктивністю 10 л (Н-9) до центрифуги (Ц-10).

ТП 4.2. Видалення осаду центрифугуванням

Центрифугування відбувається в центрифугі (Ц-10) при 9000 об/хв, протягом 30 хв. Далі супернатант з цільовим білком рекомбінантним людським базовим фактором росту фібробластів переноситься за допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10 л (Н-11) в збірник об'ємом 10 л (З-12).

Супернатант зі збірника об'ємом 10 л (З-12) за допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10 л (Н-13) переноситься в CM-Sepharose колонку хроматографа (d8x20 см, об'єм шару 1000 мл) (ХК-14).

Осад, що містить залишки і уламки клітин вручну відправляється на утилізацію.

ТП 5 Очищення rhbFGF

ТП 5.1. Хроматографічне катионообмінне очищення rhbFGF на колонці CM-Sepharose

Наступним кроком відбувається промивання CM-Sepharose хроматографічної колонки (ХК-14) (d8x20 см, об'єм шару 1000 мл) з супернатантом від ТП 4.2 5-ма об'ємами колонки буфером А: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,1 М NaCl, 10% гліцерин, зі швидкістю потоку 50 мл/хв.

Розчин буфера з незв'язаними білками супернатанту утилізується.

Наступним кроком відбувається промивання CM-Sepharose хроматографічної колонки (d8x20 см, об'єм шару 1000 мл) 3 об'ємами колонки буфером В для елюювання: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,36 М NaCl, 10% гліцерин, зі швидкістю потоку 50 мл/хв. Очищений розчин rhbFGF надходить в збірник (З-15) обсягом 10 л.

Далі за допомогою відцентрового насоса (Н-16) продуктивністю 10 л відбувається перекачування очищеного розчину rhbFGF зі збірника (З-15) в колонку хроматографа з гепарином (ХК-17), зі швидкістю потоку 20 мл/хв.

ТП 5.2. Афінне хроматографічне очищення rhbFGF на колонці з гепарином

Наступним кроком відбувається промивання хроматографічної колонки з гепарином (d5x25 см, об'єм шару 500 мл) (ХК-17) 3,5 об'ємами з очищеним розчином rhbFGF буфером С: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,6 М NaCl, 10% гліцерин, зі швидкістю потоку 20 мл/хв.

Розчин буфера з незв'язаними білками супернатанту утилізується.

Наступним кроком відбувається промивання хроматографічної колонки з гепарином (d5x25 см, об'єм шару 500 мл) (ХК-17) 2 об'ємами буфером D для елюювання: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,36 М NaCl, 10% гліцерин, зі швидкістю потоку 20 мл/хв. Очищений розчин rhbFGF надходить в збірник (З-18).

До очищеного розчину rhbFGF в збірнику (З-18) додають буфер E: 20 мМ фосфатний буфер, 10% гліцерин у співвідношенні 1:7 (об'єм:об'єм).

Далі за допомогою відцентрового насоса (Н-19) продуктивністю 10 л відбувається перенесення очищеного розчину rhbFGF зі збірника (З-18) в SP - Sepharose колонку хроматографа (ХК-20).

ТП 5.3. Хроматографічне катіонообмінне очищення rhbFGF на колонці SP-Sepharose

Наступним кроком відбувається промивання SP-Sepharose хроматографічної колонки (d5x13 см, об'єм шару 250 мл) (ХК-20) з очищеним розчином rhbFGF 2,5 об'ємами буфером F: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,25 М NaCl, 10% гліцерин, зі швидкістю потоку 20 мл/хв.

Розчин буфера з незв'язаними білками супернатанту утилізується.

Наступним кроком відбувається промивання SP-Sepharose хроматографічної колонки (d5x13 см, об'єм шару 250 мл) 4 об'ємами буфером H для елюювання: 20 мМ фосфатний буфер (рН 7,5), 0,5 М NaCl, 10% гліцерин, зі швидкістю потоку 20 мл/хв.

Далі за допомогою відцентрового насоса продуктивністю 10 л (Н-9) відбувається перенесення очищеного розчину rhbFGF в морозильну камеру з температурою $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$ (М-22).

ТП 6 Зберігання цільового продукту

ТП 6.1. Зберігання rhbFGF в морозильній камері

Зберігання цільового очищеного розчину rhbFGF в морозильній камері відбувається з температурою $-70\pm 5^{\circ}\text{C}$ (М-22) протягом 9 місяців.

7.2. Контрольовані параметри на етапі виділення та очищення субстанції цільового продукту

Контрольовані параметри на етапі виділення та очищення субстанції цільового продукту були наступними по стадіям:

Центрифугування зібраної культуральної рідини:

Технологічний контроль:

- швидкість обертання центрифуги $v=1600$ об/хв;
- час центрифугування $t= 30$ хв;
- температура $T= 4^{\circ}\text{C}$.

Ресуспензія:

Хімічний контроль:

- $\text{pH}= 8,0$.

Гомогенізація:

Технологічний контроль:

- тиск $P=200-300$ бар (1 раз)
- тиск $P=800-900$ бар (2 рази)
- температура $T= 4^{\circ}\text{C}$.

Центрифугування:

Технологічний контроль:

- швидкість обертання центрифуги $v=9000$ об/хв;
- час центрифугування $t= 30$ хв;
- температура $T= 4^{\circ}\text{C}$.

Катіонна хроматографія на колонці CM-Sepharose:

Технологічний контроль:

- швидкість проходження супернатанта $v=50$ мл/хв
- температура $T=4^{\circ}\text{C}$.

Промивання колонки буфером А:

Хімічний контроль:

- $\text{pH}=7,5$.

Технологічний контроль:

- швидкість проходження буфера $v=50$ мл/хв.

Елюювання білка буфером В:

Хімічний контроль:

- $\text{pH}=7,5$.

Технологічний контроль:

- швидкість проходження буфера $v=50$ мл/хв.

Афінна хроматографія з гепарином:

Технологічний контроль:

- швидкість проходження супернатанта $v=20$ мл/хв;
- температура $T=4^{\circ}\text{C}$.

Промивання колонки буфером С:

Хімічний контроль:

- $\text{pH}=7,5$.

Технологічний контроль:

- швидкість проходження буфера $v=20$ мл/хв.

Елюювання білка буфером D:

Хімічний контроль:

- рН= 7,5.

Технологічний контроль:

- швидкість проходження буфера $v=20$ мл/хв.

Катіонна хроматографія на колонці SP-Sepharose:

Технологічний контроль:

- швидкість проходження супернатанта $v=20$ мл/хв
- температура $T= 4^{\circ}\text{C}$.
-

Промивання колонки буфером F:

Хімічний контроль:

- рН= 7,5.

Технологічний контроль:

- швидкість проходження буфера $v=20$ мл/хв.

Збір цільового білка буфером H:

Хімічний контроль:

- рН= 7,5.

Технологічний контроль:

- швидкість проходження буфера $v=20$ мл/хв.

Зберігання цільового білка в морозильнику:

Технологічний контроль:

- температура $T= -70^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$.

РОЗДІЛ 8. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КІНЦЕВОЇ ФОРМИ ПРЕПАРАТУ З ЛЮДСЬКИМ ФАКТОРОМ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ

8.1. Обґрунтування виробничих умов та кінцевої форми лікарського препарату

Вище в роботі нами були детально розглянуті наступні подукти з вмістом факторів росту, що присутні зараз на світовому ринку:

- Fiblast®Spray (Kaken Pharmaceutical Co., Японія) -спрей з рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів (rhbFGF) для лікування дермальних виразок, опіків та діабетичної стопи. Використовується для місцевого загоєння ран, ефективність підтверджена клінічно. Випускається також як гель для регенерації періодонтальної зв'язки.
- rhbFGF Gaifu (Китай)- космецевтичний продукт із заявленим ефектом загоєння хронічних ран. Містить 70,000 МО/флакон.
- FGF2-STAB® (Enantis, Чехія) - стабілізована форма rhbFGF, в 50 разів стійкіша за звичайний bFGF. Економічно вигідна для косметики (креми, гелі, сироватки) із мінімальним ризиком алергічних реакцій з рекомендованою концентрацією – 10 мкг/мл.
- Ivjiv (rhaFGF, Китай) - спрей для лікування трофічних виразок, діабетичної стопи та опіків 3-го ступеня.
- Ебермін (CIGB, Куба) -ранозагоювальна мазь із епідермальним фактором росту та сульфадіазиним срібла. Застосовується для лікування опіків, трофічних виразок, пролежнів та радіаційного дерматиту.
- Regranex® (Smith+Nephew, UK)- фактор росту тромбоцитів (PDGF), в формі гелю для місцевого лікування ран, зокрема діабетичної стопи.
- Heberprot-P® (CIGB, Куба) - епідермальний фактор росту (EGF) в формі ін'єкцій, застосовується для лікування опіків, виразок і

НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ													
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.		Пальона І.В.											
Перевір.		Стабніков В.П.											
Реценз.													
Н. Контр.													
Затверд.		Стабніков В.П.											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; padding: 2px;">Літ.</td> <td style="width: 20%; padding: 2px;">Арк.</td> <td style="width: 60%; padding: 2px;">Аркушів</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">101</td> <td style="padding: 2px;">15</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center; padding: 5px;">Кафедра БТМ</td> </tr> </table>					Літ.	Арк.	Аркушів		101	15	Кафедра БТМ		
Літ.	Арк.	Аркушів											
	101	15											
Кафедра БТМ													
РОЗДІЛ 8. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ КІНЦЕВОЇ ФОРМИ ПРЕПАРАТУ З ЛЮДСЬКИМ ФАКТОРОМ РОСТУ ФІБРОБЛАСТІВ													

діабетичної стопи.

Отже, рекомбінантні терапевтичні фактори росту доступні в різних формах – розчин для ін'єкцій, спрей, мазь і гель. Розглянемо особливості кожної лікарської форми.

Розчин для ін'єкцій

Технологія парентеральних препаратів характеризується складним багатостадійним процесом, що передбачає як основні, так і допоміжні етапи. Розчини для ін'єкцій виготовляються в спеціальних приміщеннях з класом чистоти 1 або 2 відповідно до всіх правил асептики. Приготування водних або не в'язких ін'єкційних розчинів здійснюється масооб'ємним способом, використовуючи закритий реактор з сорочкою і перемішувачем. Якщо густина розчинника значно відрізняється від густини води, застосовують гравіметричний метод, беручи за масою як лікарську речовину, так і розчинник. Розчинення повільно розчинних або важко розчинних лікарських засобів проводять нагріванням і перемішуванням (Лич, 2017).

Стадія приготування розчину включає наступні етапи: розчинення, ізотонування, стабілізація, додавання консерванту та фільтрація. Залежно від характеристик АФІ, такі етапи, як ізотонування, стабілізація, додавання консерванту і фільтрація, можуть бути виключені.

В ході технічного процесу виробництва розчинів для ін'єкцій обов'язково проводиться проміжний (поетапний) контроль якості, тобто після кожного технологічного етапу проводять відбраковування ампул, флаконів чи гнучких контейнерів, які не відповідають певним вимогам. Таким чином, після розчинення (ізотонізації, стабілізації і т.д.) контролюється якісний і кількісний склад фармацевтичної субстанції, значення рН розчину і щільність, а обсяг наповнення контейнера вибірково перевіряється після операції наповнення. Рідкі парентеральні лікарські засоби контролюються за наступними показниками якості - опис, прозорість/кольоровість, ідентифікація, об'єм, що витягається,

значення рН, супровідні домішки, стерильність, апірогенність чи бактеріальні ендотоксини, наявність механічних включень, аномальна токсичність, а також кількісне визначення (Лич, 2017).

Однак в розрізі місцевого застосування ін'єкційна форма лікарського препарату є не зовсім доцільною, оскільки при парентеральному способі введення препарату відбувається порушення цілісності шкірного покриву для чого вимагається залучення медичного працівника, і важкість застосування при великих площах ураження.

Мазь

Термін «мазь» охоплює велику групу лікарських засобів, які відрізняються за складом і дією та мають в'язко-еластично-пластичну консистенцію. Разом з тим, Державна Фармакопея України визначає мазі як м'які лікарські засоби для місцевого застосування, призначені для місцевої лікувальної чи захисної дії або для проникнення діючих сполук через шкіру. Мазі складаються з основи та рівномірно розподіленій в ній лікарської сполуки (Лич, 2017).

Мазь повинна володіти певними структурними і механічними (реологічними) властивостями, такими як еластичність, пластичність, в'язкість, період релаксації. Фармакологічна дія мазі багато в чому залежить від структурних і механічних властивостей, які є критеріями для визначення якості мазі, як при виробництві, так і при зберіганні. М'яка консистенція мазі забезпечує зручність їх застосування за рахунок її нанесення на шкіру, слизові оболонки і виділення з них лікарських сполук.

Технологія виробництва мазей на хіміко-фармацевтичних заводах складається з таких етапів (Лич, 2017):

- санітарна обробка приміщень;
- відповідна підготовка сировини та матеріалів (активних та допоміжних речовин, контейнерів, первинного та вторинного пакування тощо);
- додавання лікарських речовин до основи;

- здійснення гомогенізації мазей;
- стандартизація готової мазі;
- фасування, маркування та пакування (Лич, 2017).

Гель

Гель являє собою м'яку лікарську форму (МЛФ) для місцевого застосування, однофазну, двофазну або багатофазну дисперсійну систему з рідким дисперсійним середовищем, і реологічні властивості гелю залежать від присутності невеликої кількості гелеутворюючого агента (Лич, 2017).

Серед переваг гелів як МЛЗ виділяють: легкорозчинність, швидку засвоюваність, здатність до незамерзання, не плавляться та не розтікаються за впливу сонячних променів, виявляють більшу тривалість активності, малотоксичні, можна застосовувати тривалий час, завдяки складу не спричиняють появу жирних плям, доставляють активні речовини в глибокі шари шкіри.

Окрім цього, гелі вирізняються значними перевагами, у порівнянні з мазями, а саме: одночасний вплив на кілька систем організму, різноманіття фармакологічних властивостей, простота виробництва, значення рН близьке до рН шкіри, швидкий та рівномірний розподіл, можливість введення до складу гідрофільних сполук.

Однак гелі мають і недоліки:

- 1) дифузія діючих речовин відбувається повільніше, ніж в мазевих основах
- 2) не всі діючі речовини переходять у гель і тому не можуть бути використані в цій лікарській формі
- 3) гель є нестабільною лікарською формою і при зберіганні розшаровується на високомолекулярні сполуки (ВМС) і водну фазу

- 4) дифузія діючої речовини з гелю в тканини відбувається більш повільно, ніж з розчину. Ця властивість дозволяє досягти пролонгованої дії препарату.
- 5) гелі мають виражену системну дію, що не завжди є позитивним ефектом, особливо при реєстрації продукту у якості медичного виробу.

Технологічний процес виробництва гелів схожий з процесом одержання мазей (Лич, 2017):

- 1) санітарна підготовка виробництва;
- 2) відповідна підготовка сировини та матеріалів (активних та допоміжних речовин, контейнерів, первинного та вторинного пакування тощо);
- 3) додавання лікарських речовин до основи;
- 4) гомогенізація гелю;
- 5) стандартизація гелю;
- 6) фасування, маркування та пакування.

Контроль якості гелів передбачає опис, здійснення ідентифікації, визначення однорідності, розміру часток, домішок, герметичності, значення рН, кислотного та перекисного числа, кількісне визначення АФІ, мікробіологічних параметрів, сторонніх домішок, контроль пакування, маркування (Лич, 2017).

Спрей

Спреї для шкіри є інноваційним інструментом, який демонструє великий потенціал для доставки активних речовин з метою лікування гострих і хронічних ран (Pleguezuelos-Beltrán та ін., 2022).

Спреї для шкіри мають значні переваги, порівняно зі звичайними засобами для загоєння ран, такі як легкість нанесення, можливість обробки великих ранових ділянок, а також однорідний розподіл розпилюваного матеріалу по всій ураженій ділянці шкіри (Pleguezuelos-Beltrán та ін., 2022).

У класичному варіанті виробництво розчинів у формі спреїв складається з декількох стадій: приготування розчину активного компонента (концентрату),

очищення його від нерозчинних домішок, фасування у відповідні контейнери, їх перевірка на міцність та герметичність, стандартизація, маркування пакування для наступного транспортування.

Концентрати-розчини виробляються аналогічно звичайним розчинам лікарських речовин, тобто в реакторах, що оснащені сорочкою і перемішувачем. Очищення розчинів від домішок реалізують проведенням відстоювання, фільтрування чи центрифугуванням (Лич, 2017).

Таким чином, форма спрею для обробки вражених ділянок шкіри є найкращою серед розглянутих, оскільки забезпечує легкість нанесення, можливість обробки великих ранових ділянок, однорідний розподіл, а технологія їх отримання є простою та не потребує особливих умов виробництва.

8.2. Обґрунтування технології отримання спрею

Визначившись з лікарською формою (спрей для місцевого застосування) на наступному етапі слід обґрунтувати технологію виробництва готового лікарського засобу.

Лікарський засіб містить 250 мкг рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів (rhbFGF146) на 2,5 мл розчинника. Склад лікарського засобу наступний:

- Ліофілізований препарат: 1 флакон містить 250 мкг рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів; допоміжні речовини: едетат натрію гідрат (ЕДТА), сахароза, регулятор рН;
- Розчинник: бензалконію хлорид.

Спершу розглянемо відсоткові співвідношення допоміжних компонентів для одержання ліофілізату.

Наукові спостереження засвідчують, що введення ЕДТА у кількості 0,05% сприятливо впливало на збереженість активної речовини у ході ліофілізаційного висушування (Townsend та ін., 1990).

Сахароза зазвичай використовується як стабілізатор для захисту білкових сполук під час сублімаційного сушіння та зберігання. Приймаємо вміст сахарози 3% (Renteria Gamiz та ін., 2019).

Значення рН до 4,8-5,4 будемо доводити за допомогою соляної кислоти. Прийmemo приготування 6% розчину, який будемо додавати у кількості 0,2% до розчину для ліофілізації. Очищену воду доливають до загального об'єму розчину rhbFGF146, який буде піддаватись ліофілізації, а саме 2,5 мл.

В якості розчинника пропонується використовувати бензалконію хлорид.

Наукові дані засвідчують, що розчин бензалконію хлориду призначений для зовнішнього застосування. До складу зовнішнього розчину входить 0,06-0,12% бензалконію хлориду. Розчин бензалконію хлориду при зовнішньому застосуванні може ефективно покращити всмоктування активних інгредієнтів в ураженій частині, забезпечує антибактеріальну дію, запобігає органій токсичності та шкірній алергії, вирішує проблеми недостатнього всмоктування та нестабільності лікарської композиції в цілому («Benzalkonium chloride solution for external use and preparation method thereof: pat. CN108420789B», China, 2020)

Прийmemo, що супровідний розчинник міститиме 0,1% бензалконію хлориду.

8.3. Матеріальний розрахунок на серію виробництва лікарського засобу

Розрахуємо кількості та склад препарату на серію 8 000 флаконів.

Якщо 1 флакон спрею після внесення розчинника містить 2,5 мл готового препарату для місцевого застосування, тоді для приготування серії з 8000 флаконів потрібно приготувати таку кількість продукту:

$$\frac{2,5 \times 8000}{1000} = 20 \text{ л}$$

Якщо в 2,5 мл препарату міститься 250 мкг рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів, то в 20 л:

0,0025 л – 0,00025 г rhbFGF146
20 л – 2 г rhbFGF146 в 2 л розчину

Таблиця 8.1

Вміст допоміжних речовин на серію 20 л

Компонент	Вміст	Розрахунок
ЕДТА	0,05%	$\frac{20 \times 0,05}{100} = 0,01$ кг
Сахароза	3%	$\frac{20 \times 3}{100} = 0,6$ кг
6% соляна кислота	0,2%	$\frac{20 \times 0,2}{100} = 0,04$ л
Вода очищена	До 20 л	17,35 л

Слід відмітити, що ліофілізат слід розводити у такій кількості супровідного розчинника, яка є аналогічною об'єму розчинника для приготування розчину для подальшої ліофілізації. Тому будемо готувати 20 л розчину для ліофілізації та 20 л розчину бензалконію хлориду як супровідного розчинника.

Отже, на приготування 20 л 0,1% супровідного розчинника треба внести таку кількість бензалконію хлориду:

$$\frac{20 \times 0,1}{100} = 0,02 \text{ кг}$$

Тоді кількість очищеної води складе $20 - 0,02 = 19,98$ л.

Отже, процес виготовлення лікарського засобу полягатиме в наступному: приготування розчину лікарського засобу; фільтрація і наповнення флаконів; ліофілізація; пакування та маркування; а також тестування та зберігання («Report on the Deliberation Results», 2016).

Процес виробництва супровідного розчинника для відновлення полягатиме в наступному: приготування розчину лікарського засобу; фільтрація

і наповнення; зберігання; пакування та маркування; а також тестування та зберігання («Report on the Deliberation Results», 2016).

8.4. Обґрунтування вибору упаковки

Приготовані розчини поступають на фасування у первинне пакування.

Широко використовуються контейнери, в яких для розпилення вмісту за допомогою стисненого повітря використовується мікронасос (механічний дозатор/пульверизатор), вкручений у горловину контейнера. У цьому випадку високий гідравлічний тиск, що створюється насосом, у поєднанні з малою площею поперечного перерізу клапана призводить до утворення дрібнодисперсного струменя (для цього використовується лазерна технологія). (Лич, 2017).

Саме такий тип упаковки нам підходить для розробки шкірного спрею.

В залежності від матеріалу, з якого вироблено контейнер, їх можна розділити на металеві, скляні, пластикові та комбіновані. Кожен тип характеризується своїми перевагами та недоліками. При використанні контейнерів основними міркуваннями є вартість, доступність матеріалів, необхідних для виробництва, і можливість наповнення контейнера конкретним продуктом. Місткість контейнерів варіюється від 3 мл до 3 літрів, тоді як скляна тара може бути до 300 мл (Лич, 2017).

Металеві контейнери найчастіше виготовляють з алюмінію, а внутрішню поверхню покривають захисним лаком. Для цього використовують різні полімерні матеріали, антикорозійні лаки або сополімери. Більшість лікарських засобів не можна поміщати в металеві контейнери. Для пакування цих речовин слід застосовувати більш інертні матеріали. Скляна тара може бути покрита зверху захисною полімерною оболонкою, яка може утримувати уламки в разі розбиття.

Крім того, скляна тара повинна бути хімічно і термічно стійкою, не мати внутрішніх напружень у склі, мати рівномірну товщину стінок і дна, а також рівну поверхню.

Пластикові контейнери з поліпропілену, нейлону, поліетилену, поліформальдегіду, дельрину та целюлози також є досить поширеними. Однак, незважаючи на свої численні переваги, пластик є проникним для деяких речовин (Лич, 2017).

Отже, для лікарського препарату на основі рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів найкращим рішенням буде використання скляного флакону.

Лікарський засіб являє собою одноразовий комбінований продукт, що складається з блоку для приготування/дозування розчину та механічного пульверизатора в комплекті. Блок для приготування/дозування розчину являє собою скляний флакон з ліофілізованим продуктом (містить активну лікарську речовину) та скляний флакон із супутнім розчинником («Report on the Deliberation Results», 2016).

Скляні флакони мають бути закупорені гумовими пробками та алюмінієвими ковпачками для збереження належності якості препарату при зберіганні (Laurent, 2021). Приймаємо пакування механічного пульверизатора у пакет з полімерного матеріалу. Такий тип упаковки забезпечить відповідність кліматичним параметрам транспортування та зберігання, резистентність до фізичних навантажень і непроникність для впливів навколишнього середовища.

Система, представлена ліофілізатором, розчинником та механічним пульверизатором, має бути упакована у вторинне пакування.

Пачки - один з найпоширеніших видів споживчого пакування. Їх виробництво проводять у відповідності з вимогами стандарту чи робочими кресленнями, призначеними для певних типів медичних препаратів, що затверджені в установленому порядку.

Пачки можуть бути виготовлені з двох склеєних або зшитих аркушів чи смужок паперу/картону в умовах збереження якості та цілісності медичного препарату. Не допускають розривів, вм'ятин, плям, відшарувань картону, бульбашок, подряпин або інших дефектів, що погіршують якість або зовнішній вигляд пачки. Краї розпакованих упаковок повинні бути рівно обрізані, без розривів та відшарувань картону.

Картонна коробка широко використовується в якості вторинного пакування. Такий пакувальний матеріал компактно зберігає товари, їх легко і зручно переміщати. Картон - це безпечний матеріал, не забруднює довкілля, придатний для вторинної переробки та відповідає високим вимогам нормативної документації для медичної продукції. Така упаковка надзвичайно міцна і водночас легка (Баранова та ін., 2017).

Узагальнюючи вищенаведену інформацію, приймаємо, що ліофілізат, розчинник та механічний пульверизатор будуть поміщені у картонні коробки разом з листівкою-вкладкою.

8.5. Специфікація обладнання для виробництва спрею з рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів

Таблиця 8.2

Специфікація обладнання для виробництва спрею з рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
Д-1	Дозатор ваговий	1	Ваговий дозатор для сипких продуктів NPF-1000. Діапазон дозування 10-1000 г. Тип – періодичної дії. Похибка дозування – 0,5. Робоча температура 10-40 °С. Компанія: «Hualian Machinery Group» (Китай) («Ваговий дозатор NPF-1000», 2024)

Продовження таблиці 8.2

<p>P-2 P-7</p>	<p>Реактор 23 л</p>	<p>2</p>	<p>Реактор загальним об'ємом 23 л; робочий об'єм – 20 л. Обладнаний сорочкою. Матеріал сталь нержавіюча марки AISI 316 L та AISI 304. Габаритні розміри (довжина x ширина x висота) - 1085x600x1150 мм. Швидкість обертання мішалки 0-500 об/хв. Компанія: «Промвіт» (Україна) («Лабораторний реактор робочим об'ємом 20 л РС-20.00.000 РС»), 2024)</p>
<p>H-3 H-8</p>	<p>Насос</p>	<p>2</p>	<p>Фармацевтичний насос SANIBOXER. Максимальна продуктивність насосу до 120 л/хв. Самовсмоктування рідин до 4 м. Здатність до самовсмоктування на суху (без попередньої заливки трубопроводу). Швидка регуляція при збереженні високого тиску. Точне регулювання швидкості без втрат тиску. Можливість сухого ходу без нанесення шкоди насосу. Є сертифікованим (міжнародний санітарний сертифікат 3A), виготовляється з нержавіючої сталі марки 316 з механічним поліруванням (коефіцієнт шершавості 0,8 мкм). Компанія: «DEBEM» (Італія) («Санітарний Фармацевтичний насос SANIBOXER»), 2024)</p>
<p>Ф-4 Ф-9</p>	<p>Фільтр патронний</p>	<p>2</p>	<p>Картриджі з поліетилсульфону фармацевтичного класу високої чистоти серії PPES для стерильної фільтрації. Ступінь фільтрації – 0,2 мкм. Можливість тривалої дезобробки гарячою водою та циклів парової стерилізації на місці для максимального терміну служби. Довжина – 50,8 см. Максимальна робоча температура 80°C. Усі поліпропіленові компоненти відповідають специфікаціям біологічної безпеки за USP, клас VI. Компанія: «Global Filter» (США) («PPES-Series Pharmaceutical Grade Polyethersulfone»), 2024)</p>

Закінчення таблиці 8.2

ФМ-5 ФМ-10	Фасувальна машина	2	Машина для наповнення флаконів моделі МУХУ-4. Машина використовує шприцевий насос і має точність +/- 0,3%. Дозування – 2-30 мл. Вихід – 50-100 шт/хв. Швидкість вакуумного відкачування 10 м ³ /год. Компанія: «Shanghai Marya Pharmaceutical Engineering and Project Co., Ltd.» (Китай) («Vial Filling Machine», 2024)
ЛС-6	Ліофільна сушарка	1	Фармацевтична сублимаційна сушарка Telstar. Підходить як для мало-, так і великосерійного виробництва – від 1 до 60 м ² . Завантаження полиці до -45°C. Продуктивність – до 600 флаконів за хвилину. Компанія: «Syntegon Technology GmbH» (Німеччина) («Freeze dryer by Telstar», 2024)
ПМ-11	Пакувальна машина	1	Фармацевтична машина пакування в картонні коробки. Забезпечує автоматичне пакування (складання 1-4 рази) та маркування. Відповідає вимогам GMP. Вся зовнішня витяжка машини складається з високоякісної нержавіючої сталі 304 і алюмінієвого сплаву. Машина використовує метод горизонтального картонування. Компанія: «Shanghai Marya Pharmaceutical Engineering and Project Co., Ltd.» (Китай) («Pharmaceutical Cartoning Machine», 2024)

8.6. Опис технологічного процесу виробництва спрею з рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів

ДР 1. Приготування регулятора рН

ДР 1.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти

В хімічну колбу обсягом 100 мл мірним циліндром на 50 мл вносять 33,5 мл очищеної води. Потім лабораторною піпеткою на 10 мл в колбу обережно вносять 6,5 мл 37% розчину соляної кислоти. Обережно перемішують розчин за допомогою скляної палички протягом 3-5 хв.

Готовий розчин кислоти зберігають під витяжною шафою, подають до стадії *ТП 2.1.*

ТП 2. Підготовка розчину препарату для ліофілізації

ТП 2.1. Змішування компонентів

За допомогою вагового дозатора Д-1 до реактора Р-2 відважують та подають наважки компонентів - 0,01 кг ЕДТА та 0,6 кг сахарози; 2 г субстанції рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів в 2 л розчину також вносять до Р-2. По трубопроводу із сектору підготовки води подають до реактора Р-2 воду очищену в кількості 17,35 л, кількість контролюють витратоміром. Проводять перемішування в режимі 100-150 об/хв.

Потім через патрубок реактора вносять орієнтовно 0,04 л соляної кислоти від *ДР 1.1*, за допомогою датчика рН контролюють значення рН на рівні 4,8-5,4. Протягом орієнтовно 15-20 хв продовжують перемішування в режимі 100-150 об/хв.

Далі насосом Н-3 приготований розчин подають на фільтрування.

ТП 2.2. Фільтрування розчину для ліофілізації

Приготований розчин від Р-2 насосом Н-3 подають на патронний фільтр Ф-4 для фільтруючої стерилізації. Розмір пор фільтра становить 0,2 мкм. Фільтрування закінчують, коли весь об'єм розчину пройде фільтрацію.

Потім фільтрат спрямовують до фасувальної машини ФМ-5.

ТП 2.3. Фасування розчину у флакони

Після фільтра Ф-4 очищений розчин подають на автоматичну фасувальну машину ФМ-5. Із сектору підготовки тари надходять підготовані скляні флакони та закупорювальні засоби. Проводять розлив розчину у флакони по 2,5 мл та наступне закупорювання пробками. Після цього закупорені флакони спрямовують на ліофільне висушування.

ТП 3. Висушування

ТП 3.1. Ліофільне висушування

Закупорені флакони від *ТП 2.3* направляють на ліофільне висушування до сушарки ЛС-6. Флакони заморожують при температурі $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 год. Потім відкривають холодний конденсатор, відкривають вакуумну систему. Дистиляція починається з нагрівання, потім процес швидко припиняють. Після цього флакони висушують в ЛС-6 за температури $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 8 год (pat. CN102389402B, China, 2012).

Здійснюють закупорювання флаконів в атмосфері азоту по завершенню процесу, передають їх на пакування до стадії *ПМВ 5.1*.

ТП 4. Приготування розчинника

ТП 4.1. Змішування компонентів

На технічних вагах у лабораторному стакані зважують 0,02 кг бензалконію хлориду. Вручну вносять до реактора Р-7. По трубопроводу із сектору підготовки води подають до реактора Р-7 воду очищену в кількості 19,98 л, кількість контролюють витратоміром. Проводять перемішування в режимі 100-150 об/хв.

Далі насосом Н-8 приготований розчин подають на фільтрування.

ТП 4.2. Фільтрування розчинника

Приготований розчин від Р-7 насосом Н-8 подають на патронний фільтр Ф-9 для фільтруючої стерилізації. Розмір пор фільтра становить 0,2 мкм. Фільтрування закінчують, коли весь об'єм розчину пройде фільтрацію.

Потім фільтрат спрямовують до фасувальної машини ФМ-10.

ТП 4.3. Фасування розчинника у флакони

Після фільтра Ф-9 профільтрований розчинник подають на автоматичну фасувальну машину ФМ-10. Із сектору підготовки тари надходять підготовані скляні флакони та закупорювальні засоби. Проводять розлив розчину у флакони по 2,5 мл та наступне закупорювання пробками. Після цього закупорені флакони спрямовують на пакування у вторинну упаковку до *ПМВ 5.1*.

ПМВ 5. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 5.1. Пакування та маркування

До пакувальної машини ПМ-11 подають закупорені флакони з ліофілізатором від *ТП 3.1* та закупорені флакони з розчинником від *ТП 4.3*. Зі складу подають пакувальний матеріал та механічні пульверизатори. Здійснюють пакування та наносять маркування. На етикетці зазначають: спосіб застосування; запобіжні заходи; кількість активної речовини в 1 дозі препарату.

ПМВ 5.2. Відвантаження

Промарковані коробки з лікарським препаратом від *ПМВ 5.1* поміщають у групове пакування, після чого відбирають зразки для здійснення контролю якості та направляють на склад.

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Сучасні методи контролю виробництва субстанції

Концентрацію білка hbFGF146 визначали за допомогою методу біцинхонінової кислоти (BCA), який широко використовується для оцінки білкової концентрації у розчинах. Принцип цього методу полягає в хелатуванні іонів міді в присутності білка, що спричиняє реакцію з біцинхоніновою кислотою і утворення фарбованого комплексу. Інтенсивність забарвлення цього комплексу прямо пропорційна концентрації білка і може бути виміряна спектрофотометрично.

Чистоту білка rhbFGF146 оцінювали за допомогою методів SDS-PAGE, RP-HPLC та SEC-HPLC:

- **SDS-PAGE** (електрофорез у поліакриламідному гелі з додаванням додецилсульфату натрію) — це метод, який дозволяє розділяти білки за молекулярною масою. Він використовується для перевірки чистоти білка: чим менше сторонніх домішок, тим чіткіші піки на електрофореграмі. Аналіз кожного етапу очищення rhbFGF показав чистоту 75%, 91% та 99% відповідно.

- **RP-HPLC** (обертальна високоефективна рідинна хроматографія зі зворотною фазою) розділяє білки за їх гідрофобністю. Використовується для перевірки чистоти білка, оскільки дозволяє відокремлювати його від інших молекул, зокрема домішок. Для rhbFGF146 основний пік спостерігається на 17 хвилині, що свідчить про чистоту понад 99%.

- **SEC-HPLC** (гель-фільтраційна високоефективна рідинна хроматографія) застосовується для поділу білків за розміром. Цей метод є корисним для перевірки однорідності білка і відсутності його агрегатів. Основний пік rhbFGF146 реєструється на 13 хвилині, що також вказує на чистоту понад 99%.

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пальона І.В.			РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					117	7
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Для оцінки **ізоелектричної точки (pI)** очищеного hbFGF146 використовували електрофорез з ізоелектричним фокусуванням (IEF). Ця методика розділяє білки в градієнті рН, дозволяючи кожному білку зупинятися в точці з нульовим зарядом, яка відповідає його pI. Ізоелектрична точка hbFGF146 становить 9,8.

Біологічну активність можна дослідити на клітинах NIH-3T3 за допомогою тесту **МТТ**: цей метод, який використовує 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліумбромід, оцінює активність білка, зокрема, його вплив на життєздатність клітин. Основний принцип методу полягає в здатності живих клітин перетворювати МТТ у пурпуровий кристалічний продукт, який потім аналізують спектрофотометрично.

Модель тварини та експериментальний дизайн. Дослідження можна провести на самцях щурів вагою 250 г із високим рівнем глюкози ($\geq 11,1$ ммоль/л), у яких створюється модель глибокої опікової рани (діаметр 2,2 см, площа 3,8 см²) (Hui et al., 2018; Yu et al., 2021). Щурів розміщують поодиноці та випадково розподіляють на три групи: контрольну негативну, контрольну позитивну та групу hbFGF (по 12 тварин у кожній групі). Негативна контрольна група отримує фізіологічний розчин (0,2 мл кожні два дні), тоді як позитивна контрольна група та група hbFGF обробляються ринковим препаратом hbFGF (Gaifu®) або очищеним hbFGF у дозі 150 МО/см² кожні два дні. Процес загоєння рани контролюється на 0, 7, 10, 14, 21, 24 і 28 дні для подальшого аналізу площі. Швидкість загоєння обчислюється за формулою $R_i = (A_0 - A_i)/A_0$, де A_0 – початкова площа рани, а A_i – площа рани у відповідний день. На 14 день з кожної групи відбирають шість щурів для евтаназії, щоб отримати зразки шкіри навколо рани для біохімічного аналізу (вимірювання FGF-1, TGF- β 1, гідроксипроліну) та гістологічного аналізу (фарбування Н&Е, трихромний аналіз за Массоном, ІНС).

Підтвердження автентичності очищеного hbFGF.

- **MALDI-TOF/MS** (матрично-активована лазерна десорбційна / іонізаційна часопротітна мас-спектрометрія): використовується для визначення молекулярної маси білка. Зіставлення отриманої маси з теоретичною (відповідно до амінокислотної послідовності) підтверджує правильність структури білка. Мас-спектрометрія дозволяє визначати фрагменти білка (MS/MS) і порівнювати їх із теоретичними пептидами, що забезпечує високий ступінь точності ідентифікації. Пікове значення для rhbFGF має становити 16,5 кДа.

- **Секвенування N- і C-кінців:** цей метод визначає послідовність амінокислот на кінцях білка. Порівняння отриманих даних із теоретичною послідовністю, отриманою з генетичної інформації або інших методів, підтверджує автентичність білка. Пептидне картування після розщеплення трипсином, Glu-C і хімотрипсином має дати 100% відповідність для hbFGF146; послідовність N-кінцевих 15 амінокислот очищеного hbFGF146 — PALPEDGGSGAFPPGHFK, що узгоджується з базою NCBI.

- **Спектроскопія кругового дихроїзму (CD)** (Li та ін., 2024): метод оцінює структурну організацію білка та виявляє зміни конформації. Пропускання ліво- і право-поляризованого світла через зразок rhbFGF визначає збереження структури білка на довжинах хвиль 190-260 нм. Очікується, що CD-спектр очищеного hbFGF146 покаже позитивний сигнал на 227 нм і негативний на 204 нм, що є характерним для β -збагачених білків типу β -II (Alibolandi and Mirzahoseini, 2011; Dvorak et al., 2018; Krzyscik et al., 2022).

9.2. Методи контролю готового лікарського засобу

1. Опис

Зовнішній вигляд визначають візуально. Ліофілізат являє собою висушену субстанцію у формі таблетки від білого до молочного кольору. Розчинник являє собою прозорий розчин без видимих механічних включень.

2. Ідентифікація

Автентичність очищеного hbFGF можна підтвердити за допомогою:

- **MALDI-TOF/MS** (матрично-активована лазерна десорбційна / іонізаційна часопролітна мас-спектрометрія): використовується для визначення молекулярної маси білка. Зіставлення отриманої маси з теоретичною (відповідно до амінокислотної послідовності) підтверджує правильність структури білка. Мас-спектрометрія дозволяє визначати фрагменти білка (MS/MS) і порівнювати їх із теоретичними пептидами, що забезпечує високий ступінь точності ідентифікації. Пікове значення для rhbFGF146 має становити 16,5 кДа.

- **Секвенування N- і С-кінців:** метод дозволяє визначити послідовність амінокислот на N- та С-кінцях білка. Порівняння отриманої послідовності з теоретичною послідовністю, яка була передбачена відповідно до генетичної інформації або інших методів секвенування, допомагає підтвердити правильність синтезу білка. Пептидне картування після розщеплення трипсином, Glu-C і хімотрипсином має дати 100% відповідність для hbFGF146; послідовність N-кінцевих 15 амінокислот очищеного hbFGF146 — PALPEDGGSGAFPPGHFK, що узгоджується з базою NCBI.

- **Спектроскопія кругового дихроїзму (CD)** (Li та ін., 2024): метод оцінює структурну організацію білка та виявляє зміни конформації. Пропускання ліво- і право-поляризованого світла через зразок rhbFGF146 визначає збереження структури білка на довжинах хвиль 190-260 нм. Очікується, що CD-спектр очищеного hbFGF146 покаже позитивний сигнал на 227 нм і негативний на 204 нм, що є характерним для β -збагачених білків типу β -II (Alibolandi and Mirzahoseini, 2011; Dvorak та ін., 2018; Krzysciak та ін., 2022).

3. Значення рН

Всі вимірювання проводяться при однаковій температурі в діапазоні від 20°C до 25°C. При необхідності враховують температурну корекцію відповідно до інструкцій виробника. Прилад калібрується з використанням буфера з

гідрофталату калію (первинного стандарту) і буфера з відмінним значенням рН. Показники приладу для 3-го буфера з проміжним значенням рН не повинні перевищувати 0,05 одиниць рН від табличного значення рН даного розчину. Електроди поміщають в досліджуваний розчин і вимірюють рН в тих же умовах, що і для буфера.

Значення рН зчитують з дисплею рН-метра. рН готового спрею має становити від 4,8 до 5,4 (ДФУ, 2015).

4. Визначення виходу вмісту контейнера

Щонайменше чотири контейнери витримують при 25°C до вирівнювання внутрішнього тиску і окремо зважують кожен з точністю до 0,01 г. Вміст кожного контейнера відбирають, періодично натискаючи на клапан протягом 5 секунд з паузою між кожним натисканням до припинення виділення препарату. Кожен контейнер знову зважують. Обчислюють масу вивільненого вмісту (ДФУ, 2015).

5. Стерильність

Випробування проводять з використанням методу мембранної фільтрації. Застосовують целюлозно-нітратні мембранні фільтри з номінальним розміром пор не більше 0,45 мкм розміром 50 мм. Фільтраційну установку та мембранні фільтри стерилізують відповідним способом. Конструкція фільтраційної установки повинна забезпечувати умови асептики за внесення й фільтрування лікарського засобу, а також в ході видалення мембранного фільтра для подальшого перенесення його у поживне середовище; або установка має передбачати проведення інкубування посівів безпосередньо в ній після додавання поживного середовища.

Перед початком дослідження слід пропустити крізь мембранний фільтр стерильний розчинник - нейтральний розчин 1 г/л м'ясного чи казеїнового пептону зі значенням рН $7,1 \pm 0,2$.

Весь вміст флакона з випробовуваним розчином поміщають на мембранний фільтр. Одразу фільтрують. Мембранний фільтр поміщають у поживне середовище чи розрізають його на дві рівні частини в асептичних умовах, кожну з яких розташовують у відповідне поживне середовище. Проводять інкубування посівів близько 14 діб за температури 30 - 35 °С для виявлення бактерій і за температури від 20 - 25 °С для виявлення грибів відповідно.

Досліджуваний лікарський препарат вважається стерильним у разі невиявлення росту мікроорганізмів при візуальному обліку (ДФУ, 2015).

6. Умови зберігання

Зберігати в оригінальній упаковці в захищеному від світла місці, недоступному для дітей.

7. Термін придатності і температура зберігання

3 роки при кімнатній температурі. Термін придатності після першого відкриття – 2 тижні при температурі не вище 10 °С.

9.3. АНД на спрей з рекомбінантним людським основним фактором росту фібробластів

Продукт являє собою рекомбінантний людський основний фактор росту фібробластів у формі спрею.

Форма випуску: спрей для зовнішнього застосування.

Склад:

- Ліофілізований препарат: 1 флакон містить 250 мкг рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів; допоміжні речовини: едетат натрію гідрат (ЕДТА), сахароза, регулятор рН;
- Розчинник: бензалконію хлорид.

Показання: призначений для лікування дермальних виразок, таких як пролежні та виразки шкіри (опікова хвороба, виразка гомілки).

Особливості застосування: розчиняють безпосередньо перед використанням.

Таблиця 9.1

**АНД на лікувальний спрей на основі генноінженерного білку
рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів**

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Ліофілізат являє собою висушену субстанцію у формі таблетки від білого до молочного кольору. Розчинник являє собою прозорий розчин без видимих механічних включень.	За п. 1, візуально
Ідентифікація	Відповідає	За п. 2
Значення рН	Від 4,8 до 5,4	За п. 3, ДФУ 2.2.3.
Визначення виходу вмісту контейнера	2,5 мл	За п. 4, ДФУ
Стерильність	Має бути стерильним	За п. 5, ДФУ 2.6.1
Умови зберігання	Зберігати в оригінальній упаковці в захищеному від світла місці, недоступному для дітей	За п. 6
Термін придатності	3 роки. Термін придатності після першого відкриття – 2 тижні.	За п. 7

РОЗДІЛ 10. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

10.1. Опис до деклараційного патенту на корисну модель

ЛІКАРСЬКИЙ РАНОЗАГОЮВАЛЬНИЙ ЗАСІБ «ФІБІОДЕРМІН»

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до фармацевтики, а саме – до біопрепаратів.

Запропонований препарат демонструє ефективність у регуляції таких ключових клітинних процесів, як ріст, диференціація та проліферація. Сигнальні шляхи, активовані факторами росту, впливають на широкий спектр функцій клітин, включаючи регенерацію тканин, запальні реакції та ангиогенез (Nguyen et al., 2017; Lee, Silva & Mooney, 2010). У дослідженні запропоновано метод промислового отримання стабільного рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів (rhbFGF), що забезпечує його оптимальну терапевтичну активність.

До ключових факторів росту, що широко застосовуються в клініці, належать епідермальний фактор росту (EGF), васкулярний ендотеліальний фактор росту (VEGF), кератиноцитний фактор росту (KGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF) та фактор росту фібробластів (FGF) (Barrientos et al., 2008; Niu et al., 2018; Lin et al., 2015; Hui et al., 2018; Li et al., 2014).

Фактори росту вважаються одними з найбільш перспективних засобів у лікуванні захворювань, таких як діабетична стопа, трофічні виразки, опіки, пролежні та гангрени (Acosta et al., 2006; Fernández-Montequín, 2009; Berlanga-Acosta, 2011). Основний фактор росту фібробластів (hbFGF), також відомий як FGF-2, є неглікозильованим білком, що бере участь у багатьох біологічних процесах, таких як клітинна проліферація та ангиогенез (Powers et al., 2000; Barrientos et al., 2008). Основний та кислий hFGF (rhbFGF та rhaFGF) вже схвалено в Китаї для лікування шкірних ран, а rhbFGF у Японії для терапії

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пальона І.В.			РОЗДІЛ 10. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					124	15
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

пародонтиту, пролежнів і виразок шкіри (Hui et al., 2018a).

Окрім традиційних застосувань, hbFGF демонструє значний потенціал у регенеративній медицині, включаючи відновлення функцій серця (Li et al., 2021), лікування нервових пошкоджень (Li et al., 2017), стимуляцію регенерації кісток (Novais et al., 2021), та профілактику патологічних рубців (Tiede, 2009). Цей фактор також використовується у середовищах для культивування стовбурових клітин, забезпечуючи їхнє збереження у недиференційованому стані (Masuda et al., 2018).

Інноваційні терапевтичні стратегії, що включають hbFGF, особливо важливі в умовах підвищеного ризику інфекцій, зокрема антибіотикорезистентних, а також для лікування бойових поранень. Wei та ін. (2022) виявили, що використання цього фактора росту сприяє прискоренню загоєння глибоких ран другого ступеня та зменшує ризик інфікування. Це особливо важливо в контексті сучасних військових викликів, де своєчасна евакуація ускладнена.

Основний та кислий hFGF (rhbFGF та rhaFGF) також знаходять своє застосування у косметології. Їх здатність стимулювати вироблення колагену та регенерацію клітин шкіри дозволяє уповільнити процеси старіння та покращити якість шкіри (Fabi & Sundaram, 2014). Окрім цього, rhbFGF використовується в космецевтиці для зменшення зморшок, боротьби з випадінням волосся та відновлення рівномірного пігмента шкіри (Mehta & Fitzpatrick, 2007; Sundaram et al., 2009).

rhbFGF та rhaFGF застосовуються в медицині, зокрема для лікування таких патологій, як діабетична стопа, трофічні виразки, опіки та пролежні (Acosta et al., 2006; Berlanga-Acosta, 2011; Gragnani et al., 2022).

Таким чином, фактори росту, зокрема rhbFGF, мають значний потенціал як у лікуванні складних ран, так і в естетичній медицині. Подальші дослідження

сприятимуть оптимізації їхнього застосування та розширенню сфер використання.

Фактори росту, зокрема фактори росту фібробластів (FGF), демонструють значний потенціал у зниженні виробничих витрат у сільському господарстві, особливо у виробництві культивованого м'яса, м'язових клітин риби та птахів (Chodkowska, Wódcz & Wojciechowski, 2022; Venkatesan та ін., 2022). Цей напрямок може стати перспективним для України, сприяючи розвитку високотехнологічного аграрного сектору. Біотехнологічні методи клітинного сільського господарства дозволяють значно зменшити викиди парникових газів, скоротити використання водних і земельних ресурсів, а також знизити ризики зоонозних інфекцій (Godfray et al., 2018). Крім того, рекомбінантний hbFGF (rhbFGF) може використовуватися для лікування ран у ветеринарії (Hu та ін., 2009).

FGF2, або основний фактор росту фібробластів, є плеiotропним регулятором проліферації, диференціації, міграції та виживання клітин. Він є важливим компонентом середовищ для культивування плюрипотентних стовбурових клітин людини (PSC), допомагаючи підтримувати їх у плюрипотентному стані. Плюрипотентність забезпечує здатність клітин до самооновлення та диференціації в усі типи клітин людського організму, що робить їх незамінними у дослідженнях ембріогенезу, відкритті нових ліків і клітинній терапії. Біологічні властивості FGF2 включають стимулювання ангиогенезу, загоєння ран, хондрогенезу, остеогенезу та нейрогенезу.

Однак дикотипний FGF2 має низьку стабільність і короткий період напіврозпаду — менше 24 годин у стандартних умовах культивування PSC. Це вимагає частих замін середовища, що є фінансово не вигідним для промисловості (Lotz et al., 2013). Стабілізовані форми FGF2, такі як продукт FGF2-STAB компанії Enantis, зберігають повну біологічну активність навіть після двадцяти

днів при 37°C (Enantis, 2024). Це значно розширює можливості застосування FGF2 у біотехнології, медицині та сільському господарстві.

Подальші дослідження у цьому напрямку сприятимуть удосконаленню виробничих процесів, зменшенню витрат і розширенню сфер використання FGF2, зокрема у регенеративній медицині, косметології та аграрній біотехнології.

Стабілізований фактор росту фібробластів FGF2-STAB виявився ефективним для культивування стовбурових клітин. Його покращена термостабільність усуває необхідність у щоденній зміні культурального середовища. Завдяки зменшенню обсягів необхідного FGF2, процес культивування стає економічно вигіднішим і менш трудомістким.

Завдяки фінансуванню програми H2020 SME Instrument (фаза 2), компанія Enantis проводить доклінічні дослідження можливостей застосування FGF2-STAB для стимуляції загоєння ран. У косметології FGF2 демонструє значний потенціал, зокрема підвищує еластичність шкіри, зменшує глибину зморшок, сприяє зволоженню та усуненню пігментації, а також стимулює ріст волосся шляхом активації анагенної фази волосяних фолікулів. У догляді за шкірою він сприяє регенерації клітин епідермісу й активує фібробласти, які синтезують колаген, еластин та гіалуронову кислоту.

Найбільш привабливим способом подолання нестабільності білка FGF є зміна властивостей білка шляхом мутагенезу. Змінюючи амінокислотну послідовність, білок FGF може мати вищу термічну стабільність, збільшений період напіввиведення, а також підвищену стійкість до протеолітичної деградації. Мутація білків для оптимізації їх ефективності життєздатна навіть для людського застосування. Кілька мутантних форм протеїнів були схвалені FDA для використання в якості лікарських засобів для людини.

Мутагенез відіграє ключову роль у підвищенні стабільності та ефективності білків. Зміни амінокислотної послідовності дозволяють FGF2

набути вищої термічної стабільності, збільшити період напіврозпаду та підвищити стійкість до протеолітичної деградації. Процес створення таких стабільних форм базується на прогнозах стабілізуючих мутацій через біоінформаційний аналіз і обчислювальний дизайн білка. Метод включає еволюційний аналіз, інтелектуальну фільтрацію та експертну оцінку. Одержані мутації тестуються у лабораторіях, а отримані мутанти виробляються через спрямований мутагенез або синтез генів у трансформованих мікроорганізмах чи еукаріотичних клітинах.

Такий підхід призводить до високонадійних *in silico* стабілізуючих замін. Отже, мутанти готують за допомогою спрямованого мутагенезу або відбирають із великих бібліотек за допомогою аналізу арешту росту. Остаточні мутанти рекомбінують за допомогою обчислювального аналізу та готують шляхом синтезу гена або мутагенезу.

Загалом, ген, що кодує FGF2, клонують і потім експресують у трансформованих організмах, переважно мікроорганізмах. Організм-господар експресує чужорідний ген для отримання FGF2 в умовах експресії. Синтетичний рекомбінантний FGF2 також можна виробляти в еукаріотах, таких як клітини дріжджів або людини. Де FGF2 може бути формою 146 амінокислот, формою 153-155 амінокислот або їх сумішшю залежно від способу рекомбінантного виробництва (див. патент США № 5143829).

Основна задача новітніх розробок полягає у створенні стабільного та зручного у використанні лікарського препарату на основі rhbFGF. Інженерія термостабільних форм FGF2 значно підвищує стабільність білка без використання додаткових стабілізаторів, таких як гепарин. При цьому біологічна активність FGF2 зберігається, що дозволяє застосовувати стабільні поліпептиди та їх похідні у клінічній практиці, дослідницьких цілях і регенеративній медицині.

Термостабільні FGF2 мають розширені можливості застосування, включаючи лікування ран, виразок, переломів, регенерацію тканин пародонту, терапію серцево-судинних і онкологічних захворювань, а також корекцію розладів настрою. У косметології їх використовують для підтримки синтезу колагену, боротьби зі старінням і стимуляції росту волосся.

Термодинамічна стабільність FGF2 визначається за допомогою температури плавлення (T_m). Методи, такі як спектроскопія кругового дихроїзму (CD), диференціальна скануюча калориметрія (DSC) і аналіз флуоресцентного теплового зсуву (TSA), забезпечують точність вимірювань. Ці методи дозволяють ефективно оцінювати стабільність мутантних форм FGF2 у порівнянні з дикотипом.

Представлені результати демонструють, що модифіковані форми FGF2 мають значно покращені характеристики для застосування у біотехнології, медицині та косметології, що відкриває нові перспективи у цих галузях.

Метою нашої розробки є створення ефективної моделі для промислового виробництва стабільного рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів (rhbFGF) із високою якістю та мінімальною собівартістю. Особлива увага приділяється забезпеченню високого рівня очищення продукту відповідно до біомедичних стандартів. Розроблено методологію отримання субстанцій для фармацевтичної, косметичної, харчової промисловості та виробництва культуральних середовищ.

Основний фактор росту фібробластів (hbFGF146), з довжиною 146 амінокислот, був синтезований із видаленням N-кінцевої ділянки, що зв'язує гепарин, для підвищення стабільності. Гени hbFGF були отримані шляхом ПЛР із подальшим клонуванням у плазмиду рЕТ3с-Кап та експресією у штамі *E. coli* BL21 (DE3) plysS. Конструкція підтверджувалась рестрикційним аналізом і секвенуванням. Методологія базується на використанні комерційних систем (*E. coli* BL21 та рЕТ3с), що забезпечують високу ефективність експресії. У процесі

ферментації забезпечувалася висока генетична стабільність плазмід та експресія білка без втрат навіть після 30 поколінь.

Комерційний штам *E. coli* BL21 (DE3)plysS і плазмід рЕТ3с широко використовуються для виробництва рекомбінантних білків, включаючи hbFGF. Попередні дослідження показали, що плазмід, що несе промотор T7, досягла максимальних рівнів експресії hbFGF в *E. coli* порівняно з промотором trc, tac і λPR під час індукції IPTG (Mirzahoseini et al., 2004).

Модифікація плазмід шляхом заміни ампіцилінового маркера на канаміциновий підвищила сталість системи. Штам залишався стабільним протягом 12 місяців при $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Li та ін., 2024).

Розробка також враховує використання сучасних методів ферментації з високою щільністю клітин для масштабного виробництва. Для задоволення зростаючого попиту розроблено процес ферментації та очищення у масштабі 200 літрів. Результатом є стабільний ліофілізований продукт hbFGF146, який застосовується у лікарській формі спрею із супутнім розчинником (0,1% бензалконію хлорид).

Запропонований підхід забезпечує ефективне виробництво стабільного rhbFGF із мінімальними витратами та високою відповідністю стандартам, відкриваючи можливості для його застосування у фармацевтиці, косметичці та інших галузях.

Нижче наведено по стадіям процес виробництва продукту «Фібіодермін»

Стадія 1. Сконструйовану плазміду mpET-3с/hbFGF трансформували в комерційно доступний штам *E. coli* BL21 (DE3) plysS. Аналіз на резистентність підтвердив, що штам *E. coli* BL21 (DE3) plysS, трансформований рЕТ3с-Kan, успішно ріс у середовищі LB з додаванням 300 мкг/мл канаміцинсульфату. Позитивні клони було відібрано за допомогою скринінгу на стійкість до канаміцину при концентрації 300 мкг/мл.

Стадія 2. Позитивні колонії були інокульовані в 5 мл стерильного середовища LB, що містило 100 мкг/мл канаміцинсульфату, після чого проводили культивування при температурі 37 °С з інтенсивним струшуванням при 200 об/хв. Коли значення оптичної щільності OD600 досягало 0,8–1,2, до середовища додавали індуктор IPTG до кінцевої концентрації 1 мМ, після чого культивування продовжували ще 4 години при тих же умовах. Колонія з найвищим рівнем експресії hbFGF була обрана як посівний штам для подальших експериментів з оптимізації параметрів ферментації.

Стадія 3. Оптимізацію процесу проводили на рівні колб для струшування об'ємом 250 мл. Посівний штам вводили в 30 мл середовища LB з додаванням 100 мкг/мл канаміцинсульфату, і культивували його протягом ночі при температурі 37°С зі швидкістю струшування 150 об/хв. Після цього посівну культуру інокульовали в свіже середовище LB (30 мл) у співвідношенні 1:100 (об/об) та інкубували при 37°С і 200 об/хв.

Індукцію за допомогою IPTG проводили, коли OD600 коливалася від 0,8 до 1,2. Для проектування експерименту, регресійного аналізу моделі RSM та оптимізації використовували програмне забезпечення Design-Expert 8.0. Після цього оптимізовані параметри культивування та індукції за допомогою IPTG були перевірені на ферментаціях об'ємом 200.

Оптимальні умови для росту включають рН у діапазоні 6,8–7,0, температуру 36°С–38°С та концентрацію глюкози 2 г/л. Підтримка рівня кисню на рівні вище 25% також сприяла активнішому росту штаму hbFGF. Для досягнення більшої щільності бактерій та підвищеного рівня експресії білка індукцію за допомогою IPTG здійснювали на середньологарифмічній стадії росту (через 3 години при OD600 = 0,8–1,2). Під час 200-літрової ферментації було використано 5% (об./об.) інокуляту .

Стадія 4. Посівний штам був інокульований у 650 мл середовища LB з додаванням 100 мкг/мл канаміцину сульфату (співвідношення 1:100, об/об) і

інкубувався при температурі 37°C зі швидкістю струшування 200 об/хв протягом 4–5 годин. Коли OD600 досягав 0,8–1,5, культуру переносили у 6,5-літрове посівне середовище для ампліфікації (співвідношення 1:10, об/об), яке містило 10,0 г/л триптон, 4,0 г/л NaCl, 3,0 г/л K₂HPO₄, 10,0 г/л дріжджового екстракту та 1,0 г/л KН₂PO₄. Після цього суміш інкубували при температурі 37°C і швидкості струшування 170 об/хв протягом 10–12 годин. Далі культуру переносили у ферментаційне середовище об'ємом 130 л у ферментері на 200 л (співвідношення 1:20, об/об), яке містило наступні компоненти (в г/л): 17,0 триптон, 4,0 NaCl, 23,0 дріжджовий екстракт, 3,0 K₂HPO₄, 1,0 KН₂PO₄, 0,08 NH₄Cl, 2,0 глюкози, 0,013 CaCl₂, 0,6 MgSO₄ та 0,005 вітаміну B1. Ферментацію проводили при температурі 37°C та рН 6,8–7,0. Через 2 години інкубації, в залежності від стану росту клітин, вводили 30% (маса/об.) розчин глюкози з різною швидкістю. Після 5 годин інкубації (OD600, 19–24) додавали IPTG до кінцевої концентрації 0,2 мМ для індукції. Індукцію проводили при температурі 38°C та рН 6,3–6,7, а через 1 годину після початку індукції додавали джерело азоту, яке містило наступні компоненти (в г/л): 4,0 NaCl, 17,0 триптон, 23,0 дріжджовий екстракт, 4,0 MgSO₄, 3,0 K₂HPO₄ та 1,0 KН₂PO₄. Рівень розчиненого кисню (DO) підтримували вище 25%. Щогодини вимірювали щільність клітин (OD600) та рівень експресії білка в культуральному середовищі. Оскільки цільовий продукт є внутрішньоклітинним, після 5 годин індукції клітини збирали шляхом центрифугування при 16000 об/хв протягом 30 хвилин при температурі 4°C, а осад зберігали при -20°C ± 5°C.

Стадія 5. Осаджені клітини ресуспендували у 20 мМ охолоджену буфері трис-HCl (рН 8,0), що містив 0,05 М NaCl, 10 мМ EDTA-2Na і 10% гліцерину у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм).

Стадія 6. Гомогенізацію клітин проводили за допомогою обробки під високим тиском при 200–300 бар один раз і 800–900 бар двічі, після чого супернатант збирали центрифугуванням при 9000 об/хв протягом 30 хвилин.

Стадія 7. На стадії очистки супернатант наносили на колонку CM-Sepharose ($\varnothing 8 \times 20$ см, об'єм шару 1000 мл), попередньо збалансовану, зі швидкістю 50 мл/хв і промивали 5 об'ємами колонки буфером А (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,1 М NaCl і 10% гліцерину) при такій самій швидкості. Елюювання білка проводили буфером В (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,36 М NaCl і 10% гліцерину) об'ємом 1,5–3 CV при 50 мл/хв. Після цього розчин завантажували на афінну колонку з гепарином ($\varnothing 5,0 \times 25$ см, об'єм шару 500 мл) при швидкості 20 мл/хв. Після промивання буфером С (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,60 М NaCl і 10% гліцерину) в об'ємі 3,5 CV, елюювання білка виконували буфером D (20 мМ РВ, рН 7,5, 2,0 М NaCl і 10% гліцерину) об'ємом 1,4–2,0 CV при швидкості 20 мл/хв. Отриманий білковий розчин змішували з буфером Е (20 мМ РВ, 10% гліцерин) у співвідношенні 1:7 (об'єм/об'єм) та завантажували на колонку SP-Sepharose ($\varnothing 5,0 \times 13$ см, об'єм шару 250 мл) зі швидкістю 20 мл/хв для зменшення кількості димеризованого білку, також для цих цілей додавали гліцерин у концентрації 10%. Після промивання 2,5 CV буфером F (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,25 М NaCl і 10% гліцерину), цільовий білок елюювали буфером H (20 мМ РВ, рН 7,5, 0,50 М NaCl і 10% гліцерину) об'ємом 3,0–4,0 CV та зберігали при $-70 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Очищений білок демонстрував стабільність протягом 9 місяців при $-70 \text{ }^\circ\text{C} \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ і протягом 2 тижнів при $5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. Кінцевий вихід очищеного hbFGF досяг $114,6 \pm 5,9$ мг/л культурального середовища, що є вищим у порівнянні з іншими дослідженнями.

Стадія 8. Застосовували методи контролю для отриманого білка rhbFGF146. Концентрацію білка hbFGF визначали за методом біцинхонінової кислоти (BCA), а чистоту оцінювали за допомогою SDS-PAGE, RP-HPLC та SEC-HPLC. Значення рІ очищеного hbFGF визначали електрофорезом з ізоелектричним фокусуванням (IEF), а біологічну активність оцінювали на клітинах NIH-3T3 методом МТТ. Крім того, автентичність очищеного hbFGF підтверджувалась за допомогою MALDI-TOF/MS, N/C-кінцевого секвенування та спектру кругового дихроїзму (CD).

Стадія 9. Приготування 20 л розчину для ліофілізації та 20 л розчину бензалконію хлориду як супровідного розчинника.

Стадія 10. Процес виготовлення готового лікарського засобу полягатиме в наступному: приготування розчину лікарського засобу; фільтруюча стерилізація: розмір пор фільтра становить 0,2 мкм, наповнення флаконів; ліофілізація: флакони заморожують при температурі -40 °С протягом 5 год. Потім відкривають холодний конденсатор, відкривають вакуумну систему. Дистиляція починається з нагрівання, потім процес швидко припиняють. Після цього флакони висушують за температури 40 °С протягом 8 год. Здійснюють закупорювання флаконів в атмосфері азоту по завершенню процесу, передають їх на пакування; пакування: та маркування; а також тестування та зберігання

Стадія 11. Процес виробництва супровідного розчинника для відновлення полягатиме в наступному: приготування розчину лікарського засобу - на технічних вагах у лабораторному стакані зважують 0,02 кг бензалконію хлориду. Вручну вносять до реактора. По трубопроводу із сектору підготовки води подають до реактора воду очищену в кількості 19,98 л, кількість контролюють витратоміром. Проводять перемішування в режимі 100-150 об/хв.; фільтрація- розмір пор фільтра становить 0,2 мкм. Фільтрування закінчують, коли весь об'єм розчину пройде фільтрацію і наповнення- із сектору підготовки тари надходять підготовані скляні флакони та закупорювальні засоби. Проводять розлив розчину у флакони по 2,5 мл та наступне закупорювання пробками. Після цього закупорені флакони спрямовують на пакування у вторинну упаковку; зберігання; пакування та маркування; а також тестування та зберігання

Стадія 12. До пакувальної машини подають закупорені флакони з ліофілізатом та закупорені флакони з розчинником. Зі складу подають пакувальний матеріал та механічні пульверизатори. Здійснюють пакування та наносять маркування. На етикетці зазначають: спосіб застосування; запобіжні заходи; кількість активної речовини в 1 дозі препарату.

Стадія 13. Промарковані коробки з лікарським препаратом поміщають у групове пакування, після чого відбирають зразки для здійснення контролю якості та направляють на склад.

Лікарський засіб містить 250 мкг рекомбінантного людського основного фактора росту фібробластів (rhbFGF146) на 2,5 мл розчинника. Склад лікарського засобу наступний:

- Ліофілізований препарат: 1 флакон містить 250 мкг рекомбінантного людського основного фактору росту фібробластів146; допоміжні речовини: едетат натрію гідрат (ЕДТА), сахароза, регулятор рН;
- Розчинник: бензалконію хлорид;
- Механічний пульверизатор.

10.2.Реферат до деклараційного патенту №

Лікарський ранозагоювальний засіб "Фібіодермін", до складу якого входить rhbFGF146, який відрізняється тим, що у своєму складі має більш стабільну форму rhbFGF та випускається у зручній фінальній лікарській формі спрею. Активні інгредієнти: ліофілізований rhbFGF146, 250 мкг; неактивні інгредієнти: едетат натрію гідрат (EDTA) 0,05%, сахароза 3%, регулятор рН (6% HCl) 0.2%. Розчин для розведення: бензалконію хлорид 0.1%, 2.5 мл. Форма випуску: спрей з механічним пульверизатором. Система, представлена ліофілізатором, розчинником та механічним пульверизатором, має бути упакована у вторинне пакування.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема до фармацевтики, а саме – до біопрепаратів. Ранозагоювальний засіб "Фібіодермін" класифікується в Анатомо-терапевтично-хімічній (АТС) системі класифікації під кодом D03AX, який належить до групи "Препарати для лікування ран і виразок" (D03).

Запропонований препарат застосовують як засіб для загоєння трофічних виразок, пролежнів, виразок діабетичної стопи, опіків, парадонтиту та ран.

В основу корисної моделі поставлена задача створення ефективного і зручного у користуванні лікарського ранозагоювального засобу " Фібіодермін " шляхом збільшення стабільності основної діючої речовини – основного фактору росту фібробластів оптимально поєднаними допоміжними інгредієнтами, які надають препарату нових споживчих властивостей, в результаті чого препарат набуває нової, зручної лікарської форми і додатково має антисептичну дію за рахунок застосування антисептика в якості розчинника.

Поставлена задача досягається за рахунок того, що лікарський ранозагоювальний засіб, до складу якого входить rhbFGF146, згідно до запропонованої корисної моделі, містить стабільнішу форму основного фактору росту фібробластів. Вказаний вище технічний результат, який досягається при застосуванні запропонованого лікарського засобу, обумовлений ознаками, які

відрізняють його від препарату, описаного в найближчому аналізі, а саме продукти з вмістом rhbFGF155 та rhaFGF135. Цей технічний результат забезпечується заміною 9 кінцевих нуклеотидів в аутентичній дикій формі основного фактору росту фібробластів, введених до складу засобу.

Таким чином, в результаті заміни 9 кінцевих нуклеотидів rhbFGF146 створена нова лікарська форма ефективного ранозагоювального препарату, яка з успіхом може бути використаною в практиці лікування пацієнтів. Компоненти препарату підібрані в такому кількісному інтервалі, щоб у своєму поєднанні вони проявляли пряму терапевтичну, і в той же час найбільш безпечну, щадну дію на організм.

10.3. Формула винаходу

Лікарський ранозагоювальний засіб "Фібіодермін", до складу якого входить rhbFGF146, що згідно до запропонованої корисної моделі, у своєму складі має більш стабільну форму rhbFGF та випускається у зручній фінальній лікарській формі спрею, де активним інгредієнтом є ліофілізований rhbFGF146, 250 мкг, неактивними інгредієнтами є: едетат натрію гідрат (EDTA) 0,05%, сахароза 3%, регулятор рН (6% HCl) 0.2%, а також до складу якого входить розчин для розведення: бензалконію хлорид 0.1%, 2.5 мл, що випускається у формі спрею з механічним пульверизатором, який відрізняється тим, що до його складу входить більш стабільна форму rhbFGF, а саме rhbFGF146, що надають препарату нових споживчих властивостей, в результаті чого препарат набуває нової, зручної лікарської форми, і забезпечується його більша стабільність та ефективність.

10.4.Висновки

В результаті заміни 9 кінцевих нуклеотидів rhbFGF створена нова лікарська форма ефективного ранозагоювального препарату з rhbFGF146, яка з успіхом може бути використаною в практиці лікування пацієнтів.

Ретельно підібрані в єдиний препарат інгредієнти лікарського ранозагоювального засобу "Фібіодермін" виявляють багатосторонню дію на регенеративну систему, одночасно м'яко та безпечно виконують ангіогенну та регенеруючу дію, що активує різні етапи загоєння ран, знижує інфікування глибоких опікових ран, не лише прискорює загоєння гострих ран, але й покращують якість загоєння, особливо у випадках глибоких ран, що може запобігати утворенню патологічних рубців. Така комплексна терапевтична дія продукту з вмістом rhbFGF146, що має покращену стабільність та проникність порівняно з rhbFGF155 та rhaFGF135, дозволяє довше зберігати активність продукту при застосуванні у терапії та культивуванні клітин, і підвищує його ефективність у досягненні глибоких шарів тканин.

Компоненти препарату підібрані в такому кількісному інтервалі, щоб у своєму поєднанні вони проявляли пряму терапевтичну, і в той же час найбільш безпечну, щадну зовнішню дію на організм.

ВИСНОВКИ

Магістерська кваліфікаційна робота є комплексним дослідженням, спрямованим на аналіз, розробку та вдосконалення технологій виробництва факторів росту фібробластів (FGF) із використанням генно-інженерних підходів. В роботі було проведено детальний аналіз біологічної ролі rhFGF у терапевтичних та сільськогосподарських цілях. Визначено актуальність використання рекомбінантних білків у сучасній біотехнології та медицині, що підтверджується попитом на ринку та інноваційними підходами у їхньому застосуванні. Оцінено сучасний стан і досягнення у виробництві генно-інженерних FGF. Розглянуто існуючі системи експресії, їх переваги та недоліки для масштабного виробництва. Визначено ключові обмеження, зокрема у стабільності білків, масштабованості технологій та посттрансляційних модифікаціях. Розглянуто і запропоновано оптимізовану технологічну схему, що охоплює всі етапи виробництва rhbFGF146: від створення експресійного вектора та ферментації до виділення і очищення субстанції, та формування кінцевого продукту у вигляді спрею та його пакування. Особливу увагу приділено післяферментаційним процесам та контролю якості.

В роботі було проведено детальний аналіз економічної доцільності виробництва рекомбінантних rhbFGF. Визначено оптимальну потужність виробництва, розраховано витрати на сировину, обґрунтовано вибір обладнання, а також експресійної моделі для зниження виробничих витрат.

З огляду на інноваційні підходи було підготовлено проект заявки на патент для нової корисної моделі, що дозволяє масштабувати технологічний процес виробництва стабільної ефективної форми rhbFGF146.

Результати роботи мають наукову та практичну цінність для розвитку біотехнологічної галузі. Впровадження запропонованих рішень сприятиме

					НУХТ БТЕК 02.01.12 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Пальона І.В.			ВИСНОВКИ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					140	2
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

підвищенню ефективності виробництва факторів росту фібробластів, розширенню їхнього застосування в медицині, косметології та агропромисловому комплексі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ваговий дозатор для сипких продуктів 10-1000г Дозувальна машина для висипки NPF-1000 Дозатор гранул Hualian [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://abctech.com.ua/ua/p1714413912-vesovoj-dozator-dlya.html>
2. Вакалюк, І.П., Короп, І.В., Чурпій, І.К. (2017). Винаходи та корисні моделі. Оформлення заявки та отримання правової охорони. Методичні рекомендації для викладачів та студентів. Методичні рекомендації розглянуті та затверджені вченою радою Івано-Франківського національного медичного університету. [Електронний ресурс] . - Режим доступу: https://www.ifnmu.edu.ua/images/diyalnist_universitetu/naukova_robota/patent_licen_s_robota/2021/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D0%B8%D1%87%D0%BD%D1%96%20%D1%80%D0%B5%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B4%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%97%20%D0%92%D0%98%D0%9D%D0%90%D0%A5%D0%9E%D0%94%D0%98%20%D0%A2%D0%90%20%D0%9A%D0%9E%D0%A0%D0%98%D0%A1%D0%9D%D0%86%20%D0%9C%D0%9E%D0%94%D0%95%D0%9B%D0%86%20%D0%B4%D0%BB%D1%8F%20%D0%9C%D0%9D%D0%A3%202017.pdf
3. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с.
4. Закон України "Про лікарські засоби" (№ 123/96-ВР) [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2469-20#Text>
5. Золотухіна, Ю. (29.04.2020) Ускладнення цукрового діабету: синдром діабетичної стопи. Спеціалізований медичний портал Health-UA.com. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://health-ua.com/article/50247-uskladnennya-tcukrovogo-dabetu-sindrom-dabetichno-stopi>

6. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв. Електронний ресурс: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
7. Лабораторний реактор робочим об'ємом 20 л РС-20.00.000 ПС [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://promvit.com.ua/laboratornij-reaktor-robochim-ob%E2%80%B2уємом-20-л-рс-20-00-000-пс/>
8. Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студ. освітнього ступеня бакалавр спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. та заоч. форм навч. / І.В. Лич. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.
9. Медичне та фармацевтичне товарознавство : підруч. для студентів вищ. навч. закл. / І. І. Баранова, С. М. Коваленко, Д. В. Семенів та ін. — Харків : НФаУ : Золоті сторінки, 2017. — 320 с.
10. Мікульонок, І. О. (2011). Складання і подання заявки на винахід і корисну модель : метод. вказівки до виконання домашньої контрольної роботи з навчальної дисципліни «Патентознавство та авторське право»; для студ. інженерно-хімічного факультету денної форми навчання. К. : НТУУ «КПІ», 62 с. [Електронний ресурс] . - Режим доступу: https://cpsm.kpi.ua/Doc/Pat_DKR.pdf
11. Наказ МОН України від 22.01.2001 № 22 «Про затвердження Правил складання і подання заявки на винахід та заявки на корисну модель». [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0173-01#Text>
12. Санітарний Фармацевтичний насос SANIBOXER [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.wft.kyiv.ua/production/debem/sani/>
13. Славченко, И. Ю., Борейко, Е. В., Гавриш, Т. Г., Костюченко, И. П., Кордюм, В. А. (2003). Біосинтез основного фактора росту фібробластів людини в клітинах *Escherichia coli* та його очищення. *Biopolym. Cell.*; 19(2), с. 179-184. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc. В.А. 00064В>

14. Фільтруючі центрифуги СЕРА TZ [Електронний ресурс]//. – Режим доступу: <https://biotechno.ru/catalog/filtruyushchie-tsentrifugi/pilotnye-filtruyushchie-tsentrifugi-sera-tz/>
15. Центр громадського здоров'я МОЗ України. (23.07.2020) Понад 70% загальної кількості щорічних ампутацій є наслідком цукрового діабету. [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://www.phc.org.ua/news/ponad-70-zagalnoi-kilkosti-schorichnikh-amputaciy-e-naslidkom-cukrovogo-diabetu>
16. Abdelhakim, M., Lin, X., Ogawa, R. (2020). The Japanese Experience with Basic Fibroblast Growth Factor in Cutaneous Wound Management and Scar Prevention: A Systematic Review of Clinical and Biological Aspects. *Adis Journals. Media*. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12387983.v1>
17. Acosta, J. B., Savigne, W., Valdez, C., Franco, N., Alba, J. S., del Rio, A., ..., Fernández-Montequín, J. (2006) Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds. *Int Wound J.*, 3(3), 232-9. doi: 10.1111/j.1742-481X.2006.00237.x
18. Adachi, T., Wang, X., Murata, T., Obara, M., Akutsu, H., Machida, M., ... & Tomita, M. (2010). Production of a non-triple helical collagen α chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, 106(6), 860-870. DOI: 10.1002/bit.22752
19. Akl M. R., Nagpal P., Ayoub N. M., Tai B., Prabhu S. A., Capac C. M., et al. (2016). Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2/bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget*, 7 (28), 44735–44762. doi:10.18632/oncotarget.8203
20. Alibolandi M., Mirzahoseini H. (2011). Purification and refolding of overexpressed human basic fibroblast growth factor in *Escherichia coli* . *Biotechnol. Res. Int.* 2011, 973741. 10.4061/2011/973741

21. Bai F. Y., Zhao B., Li Y. J., Gao Y., Liu Q. (2002). Study on fermentation process of recombinant human basic fibroblast growth factor expressed in *Escherichia coli*. *Lett. Biotechnol.* 04, 278–280.
22. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., Tomic-Canic, M. (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.*, 16, 585–601. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>.
23. Beenken, A. & Mohammadi, M. (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 8, 235–253 DOI: 10.1038/nrd2792
24. Benzalkonium chloride solution for external use and preparation method thereof: pat. CN108420789B China: A61K 47/38, A61P 31/04. № 201810339174.9; заявл. 16.04.2018; опубл. 21.08.2020. 10 с. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/CN108420789B/en>
25. Berkmen, M. (2012) Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.*, 82, 240–51. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.10.009>.
26. Berlanga, J., Fernández, J. I., López, E., López, P. A., del Río, A., Valenzuela, C., ..., Herrera, L. (2013) Heberprot-P: a novel product for treating advanced diabetic foot ulcer. *MEDICC Rev.*, 15(1), 11-5. doi: 10.37757/MR2013V15.N1.4.
27. Berlanga-Acosta J. (2011) Diabetic lower extremity wounds: the rationale for growth factors-based infiltration treatment. *Int Wound J.*, 8(6), 612-20. doi: 10.1111/j.1742-481X.2011.00840.x.
28. Berlanga-Acosta, J., Gabilondo-Cowley, J., López-Saura, P., González-López, T., Castro-Santana, M. D., López-Mola, E., Guillén-Nieto, G., Herrera-Martinez, L. (2009) Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int Wound J.*, 6(5), 331-46. doi: 10.1111/j.1742-481X.2009.00622.x.

29. BioGPS (2024) [Электронный ресурс]. - <http://biogps.org/#goto=genereport&id=2247>
30. Blaimauer, K., Watzinger, E., Erovic, B. M., Martinek, H., Jagersberger, T., Thurnher, D. (2006) Effects of epidermal growth factor and keratinocyte growth factor on the growth of oropharyngeal keratinocytes in coculture with autologous fibroblasts in a three-dimensional matrix. *Cells Tissues Organs.*, 182, 98–105. <https://doi.org/10.1159/000093064>.
31. Bolten, S.N., Knoll, A.S., Li, Z., Gellermann, P., Pepelanova, I., Rinas, U., Scheper, T. (2020) Purification of the human fibroblast growth factor 2 using novel animal-component free materials. *J Chromatogr A.* 1626:461367. doi:10.1016/j.chroma.2020.461367.
32. Butt, T. R.; Edavettal, S. C.; Hall, J. P.; Mattern, M. R. (2005) SUMO Fusion Technology for Difficult-to-Express Proteins. *Protein Expr. Purif.*, 43, 1–9.
33. Cai J. Q., Lu Q. Q., Shen Z. Q. (2000). Progress in high-density fermentation of *Escherichia coli*. *Chin. J. Prev. Vet.* 22 (6), 471–473.
34. Charlton, A., Zachariou, M. (2008) Immobilized metal ion affinity chromatography of native proteins. *Methods Mol Biol.* 421:25-35. doi:10.1007/978-1-59745-582-4_2.
35. Chen, H. X., & Cleck, J. N. (2009) Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nature reviews. Clinical oncology.* 6(8), 465-477. DOI: 10.1038/nrclinonc.2009.94
36. Chen, R., John, J., Lavrentieva, A., Müller, S., Tomala, M., Zhao, Y., et al. (2012). Cytokine production using membrane adsorbers: human basic fibroblast growth factor produced by *Escherichia coli*. *Eng. Life Sci.* 12 (1), 29–38. doi:10.1002/elsc.201100045
37. Cheng, H., and Kuo, W. (2011) Modified Peptide of Human Acidic Fibroblast Growth Factor. US Patent 7956033. Taipei: EUSOL BIOTECH CO., LTD. <https://patents.justia.com/patent/7956033>

38. Cheng, H., Liao, K. K., Liao, S. F., Chuang, T. Y. & Shih, Y. H. (2004) Spinal cord repair with acidic fibroblast growth factor as a treatment for a patient with chronic paraplegia. *Spine*, 29, E284–288. DOI: 10.1097/01.brs.0000131217.61390.2c
39. Chinese Pharmacopoeia Commission (2020). The Pharmacopoeia of the people's Republic of China, 2020. Edition Part III. Beijing: China Medical Science Press.
40. Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microbiology and Technology*, 8, 194–204. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90087-6](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(86)90087-6)
41. Cho, K.H., Kim, J.H., Nam, H.S., Kang, D.J. (2022) Efficacy Comparison Study of Human Epidermal Growth Factor (EGF) between Heberprot-P® and Easyef® in Adult Zebrafish and Embryo under Presence or Absence Combination of Diabetic Condition and Hyperlipidemia to Mimic Elderly Patients. *Geriatrics (Basel)*, 7(2):45. doi: 10.3390/geriatrics7020045.
42. Chodkowska, K. A., Wódz, K., Wojciechowski, J. (Dec 11 2022) Sustainable Future Protein Foods: The Challenges and the Future of Cultivated Meat. *Foods*, 11(24), 4008. doi: 10.3390/foods11244008.
43. Choi, S. W., Pangeni, R., Jung, D. H., Kim, S. J., Park, J.W. (2018) Construction and characterization of cell-penetrating peptide-fused fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor for an enhanced percutaneous delivery system. *J Nanosci Nanotechnol.*, 18, 842–7. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.14864>.
44. Cucchiaroni, M., Schetting, S., Terwilliger, E. F., Kohn, D. & Madry, H. (2009) rAAV-mediated overexpression of FGF-2 promotes cell proliferation, survival, and alpha-SMA expression in human meniscal lesions. *Gene therapy*, 16, 1363–1372. doi: 10.3390/ijms241311140
45. Dance A. (2017) Engineering the animal out of animal products. *Nat. Biotechnol.*, 35, 704–707 DOI:10.1038/nbt.3933

46. DePalma, A. (2018). Host Cell Proteins: Ignore at Your Own Risk. Retrieved 2019-03-19, from <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/354656-Host-Cell-Proteins-Ignore-at-Your-Own-Risk/>.
47. DePhillips, P., Lenhoff, A. M. (2004). Relative retention of the fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2 on strong cation-exchange sorbents. *Journal of Chromatography A.*, 1036(1), 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.012>
48. Ding, S. H., Huang, L. Y., Wang, Y. D., Sun, H. C., Xiang, Z. H. (2006). High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. *Biotechnol. Lett.* 28 (12), 869–875. 10.1007/s10529-006-9018-6
49. Dong, Y., Zhang, J. Q., Tang, Y. X., Dong, X., Ma, W., et al. (2021). Construction of pET3c-FGF2K18S/S69C mutant and optimization of its expression condition. *Genomics Appl. Biol.* 40 (2), 489–493. 10.13417/j.gab.040.000489
50. Dvorak, P., Bednar, D., Vanacek, P., Balek, L., Eiselleova, L., Stepankova, V., Sebestova, E., Kunova-Bosakova, M., Konecna, Z., Mazurenko, S., et al. (2018) Computer-assisted engineering of hyperstable fibroblast growth factor 2. *Biotechnol Bioeng.* 115(4):850–62. <https://doi.org/10.1002/bit.26531>
51. DVORAK, P., KREJCI, P., BALEK, L. et al. (2017) patent: Thermostable fgf2 polypeptide, use thereof. EP, AU, SG, JP, KR, US, CA, BR, CN. WO 2017/089016 A1. 3.10.2016 <https://patents.google.com/patent/WO2017089016A1/en>
52. Edelman, E. R., Nugent, M. A., & Karnovsky, M. J. (1993). Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1513-1517. doi: 10.1073/pnas.90.4.1513
53. Enantis. (2024) [Электронный ресурс] - <https://www.enantis.com/wp-content/uploads/2024/05/FGF2STAB-Technical-documentation-2024-2.pdf>

54. Engler, C. R. (1985). Disruption of microbial cells in comprehensive biotechnology. In M. Moo-Young, & C.L. Cooney (Eds.), Vol. 2 (pp. 305–324). UK: Pergamon.
55. Ewonde, R., Böttinger, K., De Vos, J., Lingg, N., Jungbauer, A., Pohl, C.A., Huber, C.G., Desmet, G., Eeltink, S. (2024) Selectivity and Resolving Power of Hydrophobic Interaction Chromatography Targeting the Separation of Monoclonal Antibody Variants. *Anal Chem. Jan.* 96(3):1121-1128. doi: 10.1021/acs.analchem.3c04011.
56. Fabi, S., & Sundaram, H. (2014). The Potential of Topical and Injectable Growth Factors and Cytokines for Skin Rejuvenation. *Facial Plastic Surgery*, 30(02), 157-171. doi:10.1055/s-0034-1372423.
57. Fan, Y. et al. (2011) Efficient production of human acidic fibroblast growth factor in pea (*Pisum sativum* L.) plants by agroinfection of germinated seeds. *BMC biotechnology*. 11, 45. doi: 10.1186/1472-6750-11-45
58. Fantoni, A., Bill, R. M., Gustafsson, L. & Hedfalk, K. (2007) Improved yields of full-length functional human FGF1 can be achieved using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*. 52, 31–39. DOI: 10.1016/j.pep.2006.10.014
59. Feng, X. P., Yang, H. C., Qu, H. Y., Yang, Q. (2004). Study on purification of recombinant bovine basic fibroblast growth factor. *Chin. J. Pharm. Biotechnol.* 11 (1), 34–36. 10.19526/j.cnki.1005-8915.2004.01.009
60. Fernández-Montequín, J. I., Valenzuela-Silva, C. M., Díaz, O. G., Savigne, W., Sancho-Soutelo, N., Rivero-Fernández, F., ..., López-Saura, P. A. (2009) Cuban Diabetic Foot Study Group. Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Int Wound J.*, 6(6), 432-43. doi: 10.1111/j.1742-481X.2009.00641.x.

61. Freeze dryer by Telstar [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.syntegon.com/solutions/pharma/pharmaceutical-lyophilizer/>
62. Gainza, G., Villullas, S., Pedraz, J. L., Hernandez, R. M., & Igartua, M. (2015). Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(6), 1551-1573. DOI: 10.1016/j.nano.2015.03.002
63. Galiano, R. D., Tepper, O. M., Pelo, C. R., Bhatt, K. A., Callaghan, M., Bastidas, N., ... & Gurtner, G. C. (2004). Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *The American journal of pathology*, 164(6), 1935-1947. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63754-6
64. Geciova, J., Bury, D., Jelen, P. (2002) Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review, *International Dairy Journal*, 12 (6), 541-553, DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00038-9
65. Geistlinger, T., Jhala, R., Krueger, K., Ramesh, B. (2017). Food Products Comprising Milk Proteins and Non-animal Proteins, and Methods of Producing the Same. United States patent application PCT/US20 17/048730. <https://patents.google.com/patent/US20160029645>
66. Gibbs, J. B. (2000) Anticancer drug targets: growth factors and growth factor signaling. *J Clin Invest.*, 105, 9–13. <https://doi.org/10.1172/JCI9084>.
67. Godfray, H. C. J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J. W., Key, T. J., Lorimer, J., ..., Jebb, S. A. (2018) Meat consumption, health, and the environment. *Science*, 20, 361(6399), DOI:10.1126/science.aam5324
68. González-González, M. & Ruiz-Ruiz, F. (2017). Aqueous Two-Phase Systems for the Recovery of Bioparticles. DOI: 10.1007/978-3-319-59309-8_4.F
69. Goshisht, M.K. (2024) Machine Learning and Deep Learning in Synthetic Biology: Key Architectures, Applications, and Challenges. *ACS Omega*. 9(9):9921-9945. doi: 10.1021/acsomega.3c05913.

70. Gragnani, A., Tonarelli, E., Chomiski, V., Piccolo, R., Daher, A., Ferreira, L.M. (2022) Fibroblast growth factor in the treatment of burns: a systematic review. *Burns*, 48(1):104–110. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2021.04.006>
71. Ha, J. H., Kim, H. N., Moon, K. B., Jeon, J. H., Jung, D. H., Kim, S. J., ..., Park, K. M. (2017) Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) Expressed in *Nicotiana benthamiana* Potentially Inhibits Skin Photoaging. *Planta Med.*, 83(10), 862-869. doi: 10.1055/s-0043-103964.
72. Hadmed, H. H., & Castillo, R. F. (2016). Cosmeceuticals: Peptides, proteins, and growth factors. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(4), 514-519. doi:10.1111/jocd.12229.
73. Halan, V., Maity, S., Bhambure, R., Rathore, A.S. (2019) Multimodal Chromatography for Purification of Biotherapeutics - A Review. *Curr Protein Pept Sci.*;20(1):4-13. doi: 10.2174/1389203718666171020103559.
74. Hino, R., Tomita, M., & Yoshizato, K. (2006). The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 27(33), 5715-5724. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.07.028
75. Holoubek, J., Lipový, B., Knoz, M., Kempný, T., Chaloupková, R., Damborský, J., Vojtová, L. (2023) The future for the application of fibroblast growth factor 2 in modern wound healing. *Burns*. 49(2):484-486. doi: 10.1016/j.burns.2022.10.007.
76. Hong P, Koza S, Bouvier ES. (2012) Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J Liq Chromatogr Relat Technol*. 35(20):2923-2950. doi: 10.1080/10826076.2012.743724.
77. Hu, C., Ding, Y., Chen, J., Liu, D., Ding, M., Zhang, Y. (2009) Treatment of corneal epithelial wounds in dogs using basic fibroblast growth factor. *Vet Med-Czech*. 54(6), 280-286. doi: 10.17221/93/2009-VETMED.

78. Hu, X., Lai, C. Y. N., Sivakumar, T., Wang, H., Ng, K. L., Lam, C. C., et al. (2018). Novel strategy for expression of authentic and bioactive human basic fibroblast growth factor in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (16), 7061–7069. doi:10.1007/s00253-018-9176-1
79. Huang, C., Orbay, H., Tobita, M., Miyamoto, M., Tabata, Y., Hyakusoku, H., Mizuno, H. (2016) Proapoptotic effect of control-released basic fibroblast growth factor on skin wound healing in a diabetic mouse model. *Wound Repair Regen.*, 24(1), 65-74. doi: 10.1111/wrr.12375.
80. Huang, Z., Lu, M., Zhu, G., Gao, H., Xie, L., Zhang, X., ..., Li, X. (2011) Acceleration of diabetic-wound healing with PEGylated rhaFGF in healing-impaired streptozocin diabetic rats. *Wound Repair Regen.*, 19(5),633-44. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00722.x.
81. Hui Q., Huang Z., Pang S., Yang X., Li J., Yu B., et al. (2019). Two-hundred-liter scale fermentation, purification of recombinant human fibroblast growth factor-21, and its anti-diabetic effects on ob/ob mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2), 719–730. 10.1007/s00253-018-9470-y
82. Hui, Q., Jin, Z., Li, X., Liu, C., Wang, X. (2018) FGF family: from drug development to clinical application. *Int J Mol Sci.*, 19 <https://doi.org/10.3390/ijms19071875>.
83. Hui, Q., Zhang, L., Yang, X., Yu, B., Huang, Z., Pang, S., et al. (2018b). Higher biostability of rh-aFGF-carbomer 940 hydrogel and its effect on wound healing in a diabetic rat model. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (5), 1661–1668. doi:10.1021/acsbiomaterials.8b00011
84. Iizuka, M., Ogawa, S., Takeuchi, A., Nakakita, S., Kubo, Y., Miyawaki, Y., ... & Tomita, M. (2009). Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons. *The FEBS journal*, 276(20), 5806-5820. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07262.x

85. Imsoonthornruksa S., Pruksananonda K., Parnpai R., Rungsiwiwut R., Ketudat-Cairns M. (2015). Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 25 (6), 372–380. 10.1159/000441453
86. Kaken (2024) [Электронный ресурс]. - <https://www.kaken.co.jp/english/company/business/pharmaceuticals/main.html>
87. Kanda, N., Morimoto, N., Ayvazyan, A. A., Takemoto, S., Kawai, K., Nakamura, Y., ... & Suzuki, S. (2014). Evaluation of a novel collagen–gelatin scaffold for achieving the sustained release of basic fibroblast growth factor in a diabetic mouse model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 8(1), 29-40. DOI: 10.1002/term.1492
88. Kanda, N., Morimoto, N., Takemoto, S., Ayvazyan, A. A., Kawai, K., Sakamoto, Y., ... & Suzuki, S. (2012). Efficacy of novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor for dermis-like tissue regeneration. *Annals of plastic surgery*, 69(5), 569-574. DOI: 10.1097/SAP.0b013e318222832f
89. Kaplan, O., Zárubová, J., Mikulová, B., Filová, E., Bártová, J..., Bačáková, L. (2016) Enhanced mitogenic activity of recombinant human vascular endothelial growth factor VEGF121 expressed in *E. coli* origami B (DE3) with molecular chaperones. *PLoS ONE.*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163697>.
90. Kawai, K., Suzuki, S., Tabata, Y., Ikada, Y., & Nishimura, Y. (2000). Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials*, 21(5), 489-499. DOI: 10.1016/s0142-9612(99)00207-0
91. Ke, N., Berkmen, M. (2014) Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Protoc Mol Biol*. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1601bs108>.

92. Keshavarz-Moore, E., Hoare, M., & Dunnill, P. (1990). Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 764–770. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90149-K](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90149-K)
93. Khananisho, D., Cumming, A.J., Kulakova, D., Shilling, P.J., Daley, D.O. (2023) Tips for efficiently maintaining pET expression plasmids. *Curr Genet*, 69(4-6):277-287. doi: 10.1007/s00294-023-01276-0.
94. Ki, M. R., Pack, S. P. (2020) Fusion tags to enhance heterologous protein expression. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 104, 2411–25. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10402-8>.
95. Kim, Y. S., Lee, H.-J., Han, M. H., Yoon, N.-K., Kim, Y.-CH & Ahn, J. (2021). Effective production of human growth factors in *Escherichia coli* by fusing with small protein 6HFh8. *Microb. Cell Factories*, 20 (9). DOI: 10.1186/s12934-020-01502-1
96. Kitamura, M., Akamatsu, M., Kawanami, M., Furuichi, Y., Fujii, T., Mori, M., Kunimatsu, K., Shimauchi, H., ..., Murakami, S. (Apr 2016). Randomized Placebo-Controlled and Controlled Non-Inferiority Phase III Trials Comparing Trafermin, a Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 2, and Enamel Matrix Derivative in Periodontal Regeneration in Intra-bony Defects. *J Bone Miner Res.*;31(4), 806-14. doi: 10.1002/jbmr.2738.
97. Kowalczyk, T.; Hnatuszko-Konka, K.; Gerszberg, A.; Kononowicz, A. K. (2014) Elastin-like Polypeptides as a Promising Family of Genetically-Engineered Protein Based Polymers. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 2141–2152.
98. Kroiher, M.; Raffioni, S.; Steele, R. E. (1995) Single Step Purification of Biologically Active Recombinant Rat Basic Fibroblast Growth Factor by Immobilized Metal Affinity Chromatography. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Protein Struct. Mol. Enzymol.*, 1250, 29–34.

99. Krzysciak M. A., Opaliński Ł., Szymczyk J., Otlewski J. (2022). Cyclic and dimeric fibroblast growth factor 2 variants with high biomedical potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 218, 243–258. [10.1016/j.ijbiomac.2022.07.105](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.105)
100. Kula, M. R., & Shutte, H. (1987). Purification of proteins and the disruption of microbial cells. *Biotechnology Progress*, 3, 31–42. DOI:10.1002/btpr.5420030107
101. Kumagai, Y., Kikuchi, T., Nonaka, A., Hiraide, M., Sato, S., Sakuraoka, M., et al. (2019) Site-directed mutagenesis of cysteine to serine residues affects heparin binding and mitogenicity in fibroblast growth factor 4 produced in *Escherichia coli*. *Biotechnol Equip.*, 33, 498–503. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1590161>.
102. Kwong, K. W., Ng, K. L., Lam, C. C., Wang, Y. Y., and Wong, W. K. R. (2013). Authentic human basic fibroblast growth factor produced by secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (15), 6803–6811. doi:10.1007/s00253-012-4592-0
103. Laurent, A., Scaletta, C., Abdel-Sayed, P., Michetti, M., Flahaut, M., Simon, J. P., Roessingh, A. B., Raffoul, W., Hirt-Burri, N., & Applegate, L. A. (2021). Optimized Manufacture of Lyophilized Dermal Fibroblasts for Next-Generation Off-the-Shelf Progenitor Biological Bandages in Topical Post-Burn Regenerative Medicine. *Biomedicines*, 9(8), 1072. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081072>
104. Le H. K., Nguyen N. H., Nguyen O. C. K., Nguyen N. T. (2020). Secretory expression of the recombinant FGF-2 protein in *Pichia pastoris* carrying multiple copies of target gene. *Sci. Tech. Dev. J.* 23 (2), 499–507. [10.32508/stdj.v23i2.1746](https://doi.org/10.32508/stdj.v23i2.1746)
105. Lee, K., Silva, E. A., Mooney, D. J. (2010) Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface.*, 8, 153–70. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0223>.
106. Li M., Chen C. Q. (2000). Progress studies of high cell-density culture of recombinant *Escherichia coli*. *Prog. Biotechnol.* (Beijing, China) 20 (2), 26–31. [10.13523/j.cb.20000206](https://doi.org/10.13523/j.cb.20000206)

107. Li Z., Zhu D., Hui Q., Bi J., Yu B., Huang Z., et al. (2021). Injection of ROS-responsive hydrogel loaded with basic fibroblast growth factor into the pericardial cavity for heart repair. *Adv. Funct. Mat.* 31 (15), 2004377. doi:10.1002/adfm.202004377
108. Li, D., Fu, G., Tu, R., Jin, Z., Zhang, D. (2019) High-efficiency expression and secretion of human FGF21 in *Bacillus subtilis* by intercalation of a mini-cistron cassette and combinatorial optimization of cell regulatory components. *Microb Cell Fact.* 18, 17. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1066-4>.
109. Li, J., Yang, Z., Li, Z., Gu, L., Wang, Y., Sung, C. (2014) Exogenous IGF-1 promotes hair growth by stimulating cell proliferation and down regulating TGF- β 1 in C57BL/6 mice in vivo. *Growth Horm IGF Res.*, 24, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2014.03.004>.
110. Li, L., Yu, B., Lai, Y., Shen, S., Yan, Y., Dong, G., Gao, X., Cao, Y., Ge, C., Zhu, L., Liu, H., Tao, S., Yao, Z., Li, S., Wang, X., Hui, Q. (2024) Scaling up production of recombinant human basic fibroblast growth factor in an *Escherichia coli* BL21(DE3) plysS strain and evaluation of its pro-wound healing efficacy. *Front Pharmacol.* 14:1279516. doi: 10.3389/fphar.2023.1279516.
111. Li, R., Zou, S., Wu, Y., Li, Y., Khor, S., Mao, Y., et al. (2017). Heparin-based coacervate of bFGF facilitates peripheral nerve regeneration by inhibiting endoplasmic reticulum stress following sciatic nerve injury. *Oncotarget* 8 (29), 48086–48097. doi:10.18632/oncotarget.18256
112. Liao M. (2002). Overexpression vector construction of hbFGF and high cell density culture of its recombinant *Escherichia coli*. China. Guangdong: South China University of Technology.
113. Lin, W. H., Xiang, L. J., Shi, H. X., Zhang, J., Jiang, L. P., Cai, P. T., ..., Xiao, J. (2015) Fibroblast growth factors stimulate hair growth through β -catenin and Shh expression in C57BL/6 mice. *Biomed Res Int.*, 730139. doi: 10.1155/2015/730139.

114. Liu, Z., Wickramasinghe, S.R. & Qian, X. (2016): Membrane chromatography for protein purifications from ligand design to functionalization, *Separation Science and Technology*, DOI: 10.1080/01496395.2016.1223133.

115. Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., Berkmen, M. (2012) SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact.*, 11,753. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>.

116. Loópez-Saura, P. A. (2011) Intralesional Human Recombinant Epidermal Growth Factor for the Treatment of Advanced Diabetic Foot Ulcer: From Proof of Concept to Confirmation of the Efficacy and Safety of the Procedure. *Global Perspective on Diabetic Foot Ulcerations*. Chapter 12, 217–238. DOI:10.5772/28150

117. Lorenzen, M.D., Kimzey, T., Shippy, T.D., Brown, S.J., Denell, R.E., Beeman, R.W. (2007) piggyBac-based insertional mutagenesis in *Tribolium castaneum* using donor/helper hybrids. *Insect Mol Biol.* 16(3):265-75. doi: 10.1111/j.1365-2583.2007.00727.x.

118. Luo, P., Liu, D., Li, J. (2020) Topical recombinant human acidic fibroblast growth factor: An effective therapeutic agent for facemask wearing-induced pressure sores. *Dermatol Ther.*, 33(4). doi: 10.1111/dth.13745.

119. Ma, B., Cheng, D. S., Xia, Z. F., Ben, D. F., Lu, W., Cao, Z. F., ..., Hu, X. H. (2007) Randomized, multicenter, double-blind, and placebo-controlled trial using topical recombinant human acidic fibroblast growth factor for deep partial-thickness burns and skin graft donor site. *Wound Repair Regen.*, 15(6), 795-9. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00307.x.

120. Mallela, K. (2010) Pharmaceutical biotechnology - concepts and applications: Walsh Gary Wiley, Chichester, West Sussex, UK. *Hum Genomics*, 4, 218 <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-3-218>

121. Masuda, A. Xu., J., Minamihata, K., Kagawa, G., Hamada, Y., Morifuji, Y., et al. (2018) Production of a biologically active human basic fibroblast growth

factor using silkworm-baculovirus expression vector system. *J. Asia-Pac. Entomol.* 21 (2), 716–720. doi:10.1016/j.aspen.2018.05.002

122. Matsumoto, S., Tanaka, R., Okada, K., Arita, K., Hyakusoku, H., Miyamoto, M., ... & Mizuno, H. (2013). The effect of control-released basic fibroblast growth factor in wound healing: histological analyses and clinical application. *Plastic and Reconstructive Surgery–Global Open*, 1(6), e44. doi: 10.1097/GOX.0b013e3182a88787

123. Mattick, C. S., Landis, A. E., Allenby, B. R., Genovese, N. J. (2015) Anticipatory life cycle analysis of in vitro biomass cultivation for cultured meat production in the United States. *Environ. Sci. Technol.*, 49, 11941–11949. DOI:10.1021/acs.est.5b01614

124. Mehta, R. C. & Fitzpatrick, R. E. (2007) Endogenous growth factors as cosmeceuticals. *Dermatologic therapy*. 20, 350–359. DOI: 10.1111/j.1529-8019.2007.00149.x

125. Melzener, L., Verzijden, K. E., Buijs, A. J., Post, M. J., Flack, J. E. (2021) Cultured beef: from small biopsy to substantial quantity. *J. Sci. Food Agric.*, 101, 7–14. DOI:10.1002/jsfa.10663

126. Middelberg, A. P. J. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, 13(3), 491–551. DOI: 10.1016/0734-9750(95)02007-p

127. Mierendorf, R.C., Morris, B.B., Hammer, B., Novy, R.E. (1998) Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods Mol Med*, 13:257-92. doi: 10.1385/0-89603-485-2:257

128. Mineur, P., Colige, A. C., Deroanne, C. F., Dubail, J., Kesteloot, F., Habraken, Y., ... & Lambert, C. A. (2007). Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *The Journal of cell biology*, 179(6), 1261-1273. doi: 10.1083/jcb.200703052

129. Mirzahoseini H., Mehraein F., Omidinia E., Razavi M. R. (2004). Differential expression of human basic fibroblast growth factor in *Escherichia coli*:

potential role of promoter. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20 (2), 161–165. DOI: 10.1023/B:WIBI.0000021750.22050.55

130. Mohseni, N., Jahanian-Najafabadi, A., Kazemi-Lomedasht, F., Arezomand, R., Habibi-Anbouhi, M., Shahbazzadeh, D., et al. (2016) Recombinant expression and purification of functional vascular endothelial growth factor-121 in the baculovirus expression system. *Asian Pac J Trop Med.*, 9, 1195–9. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.09.012>

131. Morimoto, N., Yoshimura, K., Niimi, M., Ito, T., Aya, R., Fujitaka, J., ... & Suzuki, S. (2013). Novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor: clinical trial for chronic skin ulcers. *Tissue Engineering Part A*, 19(17-18), 1931-1940. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0634

132. Mu X., Kong N., Chen W., Zhang T., Shen M., Yan W. (2008). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human basic fibroblast growth factor in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 59 (2), 282–288. DOI: 10.1016/j.pep.2008.02.009

133. Muchová, J., Hearnden, V., Michlovská, L., Vištejnová, L., Zavad'áková, A., Šmerková, K., Kočiová, S., Adam, V., Kopel, P., Vojtová, L. (2021) Mutual influence of selenium nanoparticles and FGF2-STAB® on biocompatible properties of collagen/ chitosan 3D scaffolds: in vitro and ex ovo evaluation. *J Nanobiotechnol.* 19(103):1–16. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00849-w>

134. Nallamsetty, S.; Waugh, D. S. (2006) Solubility-Enhancing Proteins MBP and NusA Play a Passive Role in the Folding of Their Fusion Partners. *Protein Expr. Purif.*, 45, 175–182.

135. Nasiri, M., Babaie, J., Amiri, S., Azimi, E., Shamshiri, S., Khalaj, V., et al. (2017) SHuffle™ T7 strain is capable of producing high amount of recombinant human fibroblast growth factor-1 (rhFGF-1) with proper physicochemical and biological properties. *J Biotechnol.* 259, 30–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.015>.

136. Nguyen, A. N., Song, J. A., Nguyen, M. T., Do, B. H., Kwon, G. G., Park, S. S., ..., Choe, H. (2017) Prokaryotic soluble expression and purification of bioactive human fibroblast growth factor 21 using maltose-binding protein. *Sci Rep.*, 23, 7(1), 16139. doi: 10.1038/s41598-017-16167-x.

137. Nguyen, M. T., Krupa, M., Koo, B-K., Song, J-A., Vu, T. T. T.,..., Do, B. H. (2016) Prokaryotic soluble overexpression and purification of human VEGF165 by fusion to a maltose binding protein tag. *PLoS ONE.*, 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156296>.

138. NIH (2024a). FGF2 fibroblast growth factor 2 [Homo sapiens (human)]. [Электронный ресурс]. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2247#gene-expression>

139. NIH (2024b). Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (FGF2), RefSeqGene (LRG_1185) on chromosome 4. [Электронный ресурс]. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/1371567296>

140. Niu, Y., Li, Q., Ding, Y., Dong, L., Wang, C. (2018) Engineered delivery strategies for enhanced control of growth factor activities in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.*, 146, 190–208. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.002>.

141. Novais A., Chatzopoulou E., Chaussain C., Gorin C. (2021). The potential of FGF-2 in craniofacial bone tissue engineering: a review. *Cells* 10 (4), 932. doi:10.3390/cells10040932

142. Ogawa, S., Tomita, M., Shimizu, K., & Yoshizato, K. (2007). Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: production of recombinant human serum albumin. *Journal of biotechnology*, 128(3), 531-544. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.10.019

143. Özker, E. (2023) Intralesional epidermal growth factor therapy in recalcitrant diabetic foot ulcers. *J Wound Care.*, 32(Sup4):S14-S21. doi: 10.12968/jowc.2023.32.Sup4.S14. PMID: 37029977.

144. Pan, L., Dong, L., Juan, L. (2020). Topical recombinant human acidic fibroblast growth factor: An effective therapeutic agent for facemask wearing-induced pressure sores. *Dermatol Ther.*, 33(4). doi:10.1111/dth.13745
145. Pancevski, B. (2023) In Ukraine, Amputations Already Evoke Scale of World War I. The Wall Street Journal. <https://www.wsj.com/articles/in-ukraine-a-surge-in-amputations-reveals-the-human-cost-of-russias-war-d0bca320>
146. Papanas, D., & Maltezos, E. (2010). Benefit-risk assessment of becaplermin in the treatment of diabetic foot ulcers. *Drug safety*, 33, 455-461. DOI: 10.2165/11534570-000000000-00000
147. Pei X. Z., Li Y. M., Du C., Yuan W. J. (2020). High-cell-density cultivation of the recombinant E. coli and its application in the production of Ala-Gln. *Food Ferment. Ind.* 46 (13), 30–35. 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.023810
148. Peng, Y. Y.; Howell, L.; Stoichevska, V.; Werkmeister, J. A.; Dumsday, G. J.; Ramshaw, J. A. M. (2012) Towards Scalable Production of a Collagen-like Protein from *Streptococcus pyogenes* for Biomedical Applications. *Microb. Cell Fact.*, 11, 146.
149. Pharmaceutical Cartoning Machine [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://ua.marya-pharmaceutical-solution.com/pharmaceutical-machinery/pharmaceutical-packing-machine/pharmaceutical-cartoning-machine.html>
150. Platonova N., Miquel G., Chiu L. Y., Taouji S., Moroni E., Colombo G., et al. (2014). Dimerization capacities of FGF2 purified with or without heparin-affinity chromatography. *PLoS One* 9 (10), e110055. 10.1371/journal.pone.0110055
151. Pleguezuelos-Beltrán, P., Gálvez-Martín, P., Nieto-García, D., Marchal, J. A., & López-Ruiz, E. (2022). Advances in spray products for skin regeneration. *Bioactive materials*, 16, 187–203. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.02.023>.
152. Post, M. J., Levenberg, S., Kaplan, D. L., Genovese, N., Fu, J., Bryant, C. J., Negowetti, N., Verzijden, K., Moutsatsou, P. (2020) Scientific, sustainability and

regulatory challenges of cultured meat. *Nat. Food*, 1, 403–415. doi: 10.1038/s43016-020-0112-z.

153. PPES-Series Pharmaceutical Grade Polyethersulfone [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.globalfilter.com/wp-content/uploads/2019/09/PPES-Series-Pharmaceutical-Grade-Polyethersulfone-2.pdf>

154. Pryor, K. D.; Leiting, B. (1997) High-Level Expression of Soluble Protein in *Escherichia coli* Using a His6-Tag and MaltoseBinding-Protein Double-Affinity Fusion System. *Protein Expr. Purif.*, 10, 309–319.

155. Rahman I, Fang L, Wei Z, Zheng X, Jiazhang L, Huang L, Xu Z. (2020) Highly efficient soluble expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor (hbFGF) by fusion with a new collagen-like protein (Scl2) in *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol.*, 50(6):598-606. doi: 10.1080/10826068.2020.1721533.

156. Rahrovan, S., F. Fanian, P. Mehryan, P., et al. (2018) Male versus female skin: What dermatologists and cosmeticians should know. *International Journal of Women's Dermatology*. 4(3), 122-130 [cit. 2023-06-06]. ISSN 23526475. doi:10.1016/j.ijwd.2018.03.002

157. Rassouli, H., Tabe, B. M. S., Rezaei, L. M., Pakzad, M., Baharvand, H., and Hosseini, S.G. (2013). Cloning, expression and functional characterization of in-house prepared human basic fibroblast growth factor. *Cell J.*, 14 (4), 282–291. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23577308/>

158. Recombinant bovine basic fibroblast growth factor freeze-dried formulation for external application: pat. CN102389402B China: A61K 9/19, A61K 38/18, A61P 17/02. № 201110342456.2; заявл. 02.11.2011; опубл. 28.03.2012. 7 с. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/CN102389402B/en>

159. Rees, R. S., Robson, M. C., Smiell, J. M., Perry, B. H., & Pressure Ulcer Study Group. (1999) Becaplermin gel in the treatment of pressure ulcers: a phase II

randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Wound repair and regeneration*, 7(3), 141-147. DOI: 10.1046/j.1524-475x.1999.00141.x

160. Renteria Gamiz, A. G., Van Bockstal, P.-J., De Meester, S., De Beer, T., Corver, J., & Dewulf, J. (2019). Analysis of a pharmaceutical batch freeze dryer: resource consumption, hotspots, and factors for potential improvement. *Drying Technology*, 1–20. doi:10.1080/07373937.2018.1518916.

161. Report on the Deliberation Results August 17, 2016 Pharmaceutical Evaluation Division, Pharmaceutical Safety and Environmental Health Bureau Ministry of Health, Labour and Welfare [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.pmda.go.jp/files/000223081.pdf> .

162. Richard, J. L., Parer-Richard, C., Daures, J. P., Clouet, S., Vannereau, D., Bringer, J., ... & Comte-Bardonnet, M. (1995). Effect of topical basic fibroblast growth factor on the healing of chronic diabetic neuropathic ulcer of the foot: a pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes Care*, 18(1), 64-69. DOI: 10.2337/diacare.18.1.64

163. Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>.

164. Sauer, D.G., Mosor, M., Frank, A.C., Weiß, F., Christler, A., Walch, N., Jungbauer, A., Dürauer, A. (2019) A two-step process for capture and purification of human basic fibroblast growth factor from *E. coli* homogenate: Yield versus endotoxin clearance. *Protein Expr Purif.* 153:70-82. doi: 10.1016/j.pep.2018.08.009.

165. Schneider, B. P., Sledge, G. W. (2007) Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.*, 4,181–9. <https://doi.org/10.1038/ncponc0740>.

166. Schneider, B. P., Sledge, G. W. (2007) Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol.*, 4,181–9. <https://doi.org/10.1038/ncponc0740>.

167. Sekiguchi, H.; Uchida, K.; Matsushita, O.; Inoue, G.; Nishi, N.; Masuda, R.; Hamamoto, N.; Koide, T.; Shoji, S.; Takaso, M. (2018) Basic Fibroblast Growth Factor Fused with Tandem CollagenBinding Domains from *Clostridium histolyticum* Collagenase ColG Increases Bone Formation. *BioMed Res. Int.*, 2018, 1–8.
168. Shanghai Tenry Pharmaceutical Co., Ltd, web-сторінка. (2024) [Електронний ресурс]: <http://en.tenrypharm.com/afjf.aspx>
169. Shen L. N., Wei D. Z., Yu J. T. (1999). High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* expressing human basic fibroblast growth factor. *J. Microbiol.* (04), 11–14.
170. Sheng, Z.; Chang, S. B.; Chirico, W. J. (2003) Expression and Purification of a Biologically Active Basic Fibroblast Growth Factor Fusion Protein. *Protein Expr. Purif.*, 27, 267–271.
171. Shutte, H., Kroner, K. H., Hustedt, H., & Kula, M.-R. (1983). Experience with a 20 litre industrial bead mill for the disruption of microorganism. *Enzyme and Microbial Technology*, 5, 143–148. doi.org/10.1016/0141-0229(83)90050-9
172. Soleyman M. R., Khalili M., Khansarinejad B., Baazm M. (2016). High-level expression and purification of active human FGF-2 in *Escherichia coli* by codon and culture condition optimization. *Iran. Red. Crescent. Med. J.* 18 (2), e21615. 10.5812/ircmj.21615
173. Soleyman, M. R.; Khalili, M.; Khansarinejad, B.; Baazm, M. (2016) High-Level Expression and Purification of Active Human FGF2 in *Escherichia coli* by Codon and Culture Condition Optimization. *Iran. Red Crescent Med. J.*, 18, e21615
174. Somkuti, G. A., Dominiecki, M. E., & Steinberg, D. H. (1998). Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with ethanol. *Current Microbiology*, 36, 202–206. DOI: 10.1007/s002849900294
175. Song, J. A.; Koo, B. K.; Chong, S. H.; Kwak, J.; Ryu, H. B.; Nguyen, M. T.; Vu, T. T.; Jeong, B.; Kim, S. W.; Choe, H. (2013) Expression and Purification of

Biologically Active Human FGF2 Containing the b'a' Domains of Human PDI in Escherichia coli. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170, 67–80.

176. Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., Maertens, B. (2015) *Purification of His-Tagged Proteins. Methods Enzymol.* 559:1-15. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.003.

177. Steed, D. L. (2006). Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7S), 143S-149S. DOI: 10.1097/01.prs.0000222526.21512.4c

178. Sugamata, A., Yoshizawa, N., & Oyama, S. (2006). Treatment of fingertip amputation using a combination of artificial dermis and bFGF formulation. *Prog Med*, 26, 2731-2735.

179. Sugawara, S., Ito, T., Sato, S., Sato, Y., Kasuga, K., Kojima, I., Kobayashi, M. (2014) Production of an aminotermally truncated, stable type of bioactive mouse fibroblast growth factor 4 in Escherichia coli. *J Biosci Bioeng.* 117(5):525-30. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.10.009.

180. Suh, J. M. et al. (2014) Endocrinization of FGF1 produces a neomorphic and potent insulin sensitizer. *Nature*, 513, 436–439. DOI: 10.1038/nature13540

181. Sun, C., Li, Y., Taylor, S. E., Mao, X., Wilkinson, M. C., Fernig, D. G. (2015) HaloTag is an effective expression and solubilisation fusion partner for a range of fibroblast growth factors. *PeerJ.*, 3. <https://doi.org/10.7717/peerj.1060>

182. Sundaram, H. et al. (2009) Topically applied physiologically balanced growth factors: a new paradigm of skin rejuvenation. *Journal of drugs in dermatology: JDD* 8, 4–13

183. Tabata, Y., & Ikada, Y. (1999). Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials*, 20(22), 2169-2175. DOI: 10.1016/s0142-9612(99)00121-0

184. Tabata, Y., Nagano, A., & Ikada, Y. (1999). Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue engineering*, 5(2), 127-138. DOI: 10.1089/ten.1999.5.127
185. Taktak-BenAmar, A., Morjen, M., Mabrouk, H. B., Abdelmaksoud-Dammak, R., Guerfali, M., Fourati-Masmoudi, N., et al. (2017) Expression, purification and functionality of bioactive recombinant human vascular endothelial growth factor VEGF 165 in *E. coli*. *AMB Express.*, 7, 33. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0300-2>.
186. Tan Y., Qiao Y., Chen Z., Liu J., Guo Y., Tran T., et al. (2020). FGF2, an immunomodulatory factor in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Front. Cell. Dev. Biol.* 8, 223. doi:10.3389/fcell.2020.00223
187. Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., ... & Margolis, J. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nature genetics*, 36(3), 283-287. DOI: 10.1038/ng1314
188. Tiaka, E. K., Papanas, N., Manolakis, A. C., & Georgiadis, G. S. (2012). Epidermal growth factor in the treatment of diabetic foot ulcers: an update. *Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy*, 24(1), 37-44. DOI: 10.1177/1531003512442093
189. Tiede S, Ernst N, Bayat A, Paus R, Tronnier V, Zechel C. (2009) Basic fibroblast growth factor: a potential new therapeutic tool for the treatment of hypertrophic and keloid scars. *Ann Anat.*, 191(1), 33-44. doi:10.1016/j.aanat.2008.10.001.
190. Townsend, M. W., Byron, P. R., & DeLuca, P. P. (1990). The effects of formulation additives on the degradation of freeze-dried ribonuclease. *A. Pharmaceutical research*, 7(10), 1086-1091. <https://doi.org/10.1023/a:1015959604616>.

191. Uchino, K., Sezutsu, H., Imamura, M., Kobayashi, I., Tatematsu, K. I., Iizuka, T., ... & Tamura, T. (2008). Construction of a piggyBac-based enhancer trap system for the analysis of gene function in silkworm *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(12), 1165-1173. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.09.009

192. Valenzuela-Silva, C. M., Tuero-Iglesias, Á. D., García-Iglesias, E., González-Díaz, O., Del Río-Martín, A., Yera Alos, I. B., Fernández-Montequín, J. I., López-Saura, P. A. (2013) Granulation response and partial wound closure predict healing in clinical trials on advanced diabetes foot ulcers treated with recombinant human epidermal growth factor. *Diabetes Care.*, 36(2), 210-5. doi: 10.2337/dc12-1323.

193. Venkatesan, M., Semper, C., Skrivergaard, S., Rosa, D. L., Mesa, N., Rasmussen, M. K., Young, J. F., ..., Savchenko, A. (2022). Recombinant production of growth factors for application in cell culture. *iScience*, 25(10). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9489951/>

194. Vial Filling Machine [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.marya-pharmaceutical-solution.com/pharmaceutical-machinery/pharmaceutical-machine/vial-filling-machine.html>

195. Vojtová, L., Pavliňáková, V., Muchová, J., Kacvinská, K., Brtníková, J., Knoz, M., Lipový, B., Faldyna, M., Göpfert, E., Holoubek, J., Pavlovský, Z., Vícenová, M., Blahnová, V.H., Hearnden, V., Filová, E. (2021) Healing and angiogenic properties of collagen/chitosan scaffolds enriched with hyperstable FGF2-STAB® protein: in vitro, ex ovo and in vivo comprehensive evaluation. *Biomedicines*. 9(6):590. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060590>

196. Wang S. J., Qin L. Y., Yu Z. X. (2007). Study of the technology on bFGF fermentation. *J. Jilin Teach. Inst. Eng. Technol.* 9, 41–42.

197. Wang, F. et al. (2013) An optimized sericin-1 expression system for mass-producing recombinant proteins in the middle silk glands of transgenic silkworms. *Transgenic research*. 22, 925–938. DOI: 10.1007/s11248-013-9695-6

198. Wang, F. et al. (2014) Advanced silk material spun by a transgenic silkworm promotes cell proliferation for biomedical application. *Acta biomaterialia*. 10, 4947–4955. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.06.031

199. Wang, F., Wang, R., Wang, Y., Zhao, P., Xia, Q. (2015) Large-scale production of bioactive recombinant human acidic fibroblast growth factor in transgenic silkworm cocoons. *Sci Rep.*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16323>.

200. Wei, Y., Li, J., Huang, Y., Lei, X., Zhang, L., Yin, M., Deng, J., Wang, X., Fu, X., Wu, J (2022) The clinical effectiveness and safety of using epidermal growth factor, fibroblast growth factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor as therapeutics in acute skin wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Burns & Trauma*, 10, 2321-3876, tkac002. doi.org/10.1093/burnst/tkac002.

201. Wu, X. et al. (2001) High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. *Protein expression and purification* 21, 192–200. DOI: 10.1006/prev.2000.1358

202. Wu, X., Yin, Z., Cao, C., Huang, L., Lu, X., ..., Liu, J. (2004) Expression of human VEGF165 in silkworm (*Bombyx mori* L.) by using a recombinant baculovirus and its bioactivity assay. *J Biotechnol.*, 111, 253–61. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.016>.

203. Xiang, Q., Xiao, J., Zhang, H., Zhang, X., Lu, M., Zhang, H., ... & Li, X. (2011). Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat. *Burns*, 37(5), 886-895. DOI: 10.1016/j.burns.2011.01.018

204. Xiong, Y., Chen, L., Liu, P., Yu, T., Lin, C., Yan, C., Hu, Y., Zhou, W., Sun, Y., Panayi, A.C., Cao, F., Xue, H., Hu, L., Lin, Z., Xie, X., Xiao, X., Feng, Q., Mi, B., Liu, G. (2022) All-in-One: Multifunctional Hydrogel Accelerates Oxidative

Diabetic Wound Healing through Timed-Release of Exosome and Fibroblast Growth Factor. *Small*. 18(1):e2104229. doi: 10.1002/smll.202104229.

205. Xu, Y.; Douglas, R.; Keene, J.; Bujnicki, M.; Hook, M.; Lukomski, S. (2002) Streptococcal Scl1 and Scl2 Proteins Form Collagen-like Triple Helices. *J. Biol. Chem.*, 277, 27312–27318.

206. Yan X., Xu L. R., Guan Y. X., Yao S. J. (2010). Soluble expression of recombinant cyclophilin A in *Escherichia coli*. *J. Zhejiang Univ. Agric. Life Sci.* 36 (4), 363–369.

207. Yang J., Qiang W., Ren S., Yi S., Li J., Guan L., et al. (2018). High-efficiency production of bioactive oleosin-basic fibroblast growth factor in *A. thaliana* and evaluation of wound healing. *Gene* 639, 69–76. doi:10.1016/j.gene.2017.09.064

208. Yang, J., Guan, L., Guo, Y., Du, L., Wang, F., Wang, Y., ..., Li, X. (2015) Expression of biologically recombinant human acidic fibroblast growth factor in *Arabidopsis thaliana* seeds via oleosin fusion technology. *Gene*, 566(1), 89-94. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.036.

209. Yang, X. et al. (2015) Fibroblast Growth Factor Signaling in the Vasculature. *Current atherosclerosis reports* 17, 509. DOI: 10.1007/s11883-015-0509-6

210. Yu B, Sun W, Huang Z, Sun G, Li L, Gu J, Zheng M, Li X, Chun C, Hui Q, Wang X. (2021) Large-Scale Preparation of Highly Stable Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor in *Escherichia coli* BL21(DE3) plysS Strain. *Front Bioeng Biotechnol.*; 9:641505. doi: 10.3389/fbioe.2021.641505.

211. Yu, P.J., Ferrari, G., Galloway, A.C., Mignatti, P., Pintucci, G. (2007) Basic fibroblast growth factor (FGF-2): the high molecular weight forms come of age. *J Cell Biochem*, 100(5):1100-8. doi: 10.1002/jcb.21116. PMID: 17131363.

212. Yun, Y., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J., Shin, U. S., Kim, H. (2010). Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. *J Tissue Eng.*, 1(1) <https://doi.org/10.4061/2010/218142>

213. Żerańska, J., Pasikowska, M., Szczepanik, B., Mlosek, K., Malinowska, S., Dębowska, R. M., Eris, I. (2016) A study of the activity and effectiveness of recombinant fibroblast growth factor (Q40P/S47I/H93G rFGF-1) in anti-aging treatment. *Postepy Dermatol Alergol.*, 33(1), 28-36. doi: 10.5114/pdia.2014.44024.
214. Zhang S. Z., Guo Q., Yang M. H., Zhang H. Y., Zhang J. (2002). High density fermentation of recombinant E. Coli expression human bFGF and purification of expressed product. *Chin. J. Biol.* 04, 214–217. 10.13200/j.cjb.2002.04.24.zhangshz.009
215. Zhang Y. H., Gao X. L., Huang K., Guo Q. Q., Yuan J. G. (2021). Research progress on fermentation expression and metabolism regulation of recombinant Escherichia coli. *Food Drug* 23 (01), 85–91.
216. Zhang, Y.; Olsen, D. R.; Nguyen, K. B.; Olson, P. S.; Rhodes, E. T.; Mascarenhas, D. (1998) Expression of Eukaryotic Proteins in Soluble Form in Escherichia coli. *Protein Expr. Purif.*, 12, 159–165.
217. Zhao, Q., Xu, W., Xing, L., Lin, Z. (2016) Recombinant production of medium-to large-sized peptides in Escherichia coli using a cleavable self-aggregating tag. *Microb Cell Fact.*, 15, 136. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0534-3>.
218. Zheng, L., Hui, Q., Tang, L., Zheng, L., Jin, Z., Yu, B., ..., Wang, X. (2015) TAT-Mediated Acidic Fibroblast Growth Factor Delivery to the Dermis Improves Wound Healing of Deep Skin Tissue in Rat. *PLoS One.*, 10(8). doi: 10.1371/journal.pone.0135291.
219. Zhong G. S., Shi B. X., Wu Z. Z. (2005). Progress in research of high cell-density cultivation of recombinant Escherichia coli . *China Biotechnol.* 25 (S1), 27–31. 10.13523/j.cb.2005S107
220. Zhou Y, Ren L, Zhu J, Yan S, Wang H, Song N, Li L, Ouyang H, Pang D. (2011) Construction of a recombinant human FGF1 expression vector for mammary gland-specific expression in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 354(1-2):39-46. doi: 10.1007/s11010-011-0803-8.

221. Zhu, X., Komiya, H., Chirino, A., Faham, S., Fox, G.M., Arakawa, T., Hsu, B.T., Rees, D.C. (1991) Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science*, 251(4989):90-3. doi: 10.1126/science.