

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

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

« » лютого 2022 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

« » лютого 2022 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: Використання мікроорганізмів у якості систем експресії для отримання субодиночних вакцин

Виконав: здобувач ІІ курсу, групи 02

БОНДАРЧУК Валерія Ігорівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Володимир ФЕДОРЕНКО
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2022 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 «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 03 ” листопада 2021 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

БОНДАРЧУК Валерії Ігорівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Використання мікроорганізмів у якості систем експресії для отримання субодиничних вакцин

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, к.б.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “02” листопада 2021 року № 863-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 1 лютого 2022 року

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Escherichia coli* BL21 (DE3), цільовий продукт: поверхневий антиген вірусу простого герпесу II-типу рекомбінантний глікопротеїн D, лікарська форма: субодинична вакцина ін'єкційного типу

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Біотехнологічні особливості отримання вірусних антигенів, як основи субодиничних вакцин. Розділ 2. Системи експресії бактеріальних антигенів в розробці рекомбінантних субодиничних вакцин. Розділ 3. Біосинтез антигенів еукаріотичного походження в сучасних субодиничних вакцинах. Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми субодиничної вакцини. Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ. Розділ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу глікопротеїну D. РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва субодиничної вакцини проти ВПГ-2.

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва 2 аркуші формату А1 та 1 аркуш формату А2. Апаратурна схема виробництва – 2 аркуші формату А1 та 1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 03 листопада 2021 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Біотехнологічні особливості отримання вірусних антигенів, як основи субодичних вакцин	03.11.2021 - 10.11.2021	
2	Системи експресії бактеріальних антигенів в розробці рекомбінантних субодичних вакцин	11.11.2021 - 18.11.2021	
3	Біосинтез антигенів еукаріотичного походження в сучасних субодичних вакцинах	19.11.2021 - 25.11.2021	
4	Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми субодичної вакцини	26.11.2021 - 5.12.2021	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ	6.12.2021 - 27.12.2021	
6	Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу глікопротеїну D	28.12.2021 - 10.01.2022	
7	Опис технологічного процесу виробництва субодичної вакцини проти ВПГ-2	11.01.2022 - 16.01.2022	
8	Оформлення пояснювальної записки	17.01.2022 - 23.01.2022	
9	Виконання графічної частини роботи	24.01.2022 - 01.02.2022	

Здобувач

_____ (підпис)

Валерія БОНДАРЧУК

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Оксана СКРОЦЬКА

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Представлено кваліфікаційну роботу, котра присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем виробництва новітньої субодиничної вакцини, ін'єкційної форми проти ВПГ-2, на основі рекомбінантного поверхневого антигену - глікопротеїну D, як стабільної імуногенної основи, культивуванням рекомбінантного штаму *Escherichia coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315), де концентрація даного білку в культуральній рідині становить 355 мг/л, що у 1,2 більше ніж за культивування *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) (355 мг/л) та відповідно більша в 3,1 рази ніж у *Spodoptera frugiperda* (Sf9), Sf9 (135 мг/л) .

За техніко-економічним обґрунтуванням потреба України у вакцинному білку становить 30 %, тобто близько 35 г (враховуючи курс вакцинації 2 дози по 20 мкг очищеного антигену). Період виробництва триває 42 дні (6 тижнів) у ферментері об'ємом 30 л протягом 24 циклів.

Розглянуто та порівняно різні продуценти поверхневого антигену глікопротеїну D та його технологія виділення та очищення. Обґрунтовано допоміжні роботи серед яких підготовка аераційного та вентиляційного повітря, поживних середовищ, води очищеної та води ін'єкційної, підготовка первинної упаковки, а також власне технологічного процесу - підготовка посівного матеріалу, біосинтез поверхневого білку gD, етапи виділення і очищення білку з тілець включення та етапи виготовлення готового лікарського засобу, стадії ПМВ готового продукту і етапи знешкодження відходів, що наведені в технологічній та апаратурній схемах

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, семи розділів, списку використаної літератури (132 найменувань), апаратурної (формат А3, два формати А1) та технологічної (два А1 і один А2 формати) схем. Загальний обсяг роботи – 173 сторінки друкованого тексту, містить: 31 таблицю та 23 рисунки.

Ключові слова: вакцинопрофілактика, глікопротеїн D, субодинична вакцина, вірус простого герпесу II-типу (ВПГ-2), *Escherichia coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315), біосинтез, виділення і очищення тілець включення, ін'єкційна форма.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
Розділ 1. Біотехнологічні особливості отримання вірусних антигенів, як основи субодиничних вакцин	9
1.1 Вірус Денге	9
1.2 Вірус Зіка	13
1.3 Вірус простого герпесу 2 типу	16
1.4 Вірус грипу	19
2. Системи експресії бактеріальних антигенів в розробці рекомбінантних субодиничних вакцин	24
2.1 Туберкульоз	24
2.2 Ботулізм	28
2.3 Бруцельоз	31
2.4 Хламідіоз	34
2.5 Стафілококова інфекція	37
Розділ 3. Біосинтез антигенів еукаріотичного походження в сучасних субодиничних вакцинах	39
3.1 Малярія	39
3.2 Лейшманіоз	41
3.3 Хвороба Шагаса	44
РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми субодиничної вакцини 46	
4.1 Передумови виробництва ЛЗ	46
4.2 Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання	47
4.3 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку	48
4.4 Вибір форми випуску лікарського засобу	49
4.5 Опис лікарського засобу згідно АНД (проект АНД на субодиничну вакцину проти ВПГ-2)	50
4.6 Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік	61

4.7 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції.....	62
4.8 Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.....	64
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ	67
5.1 Обґрунтування вибору біологічного агенту	67
5.2 Обґрунтування поживного середовища для культивування біологічного агента	73
5.3 Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера ...	76
5.4 Обґрунтування вибору технології отримання глікопротеїну D як субстанції для виготовлення субодиночної вакцини проти ВПГ-2 (стадії виділення і очищення субстанції виробництва ЛЗ).....	79
5.5 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень та виробництва субодиночної вакцини (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів).....	102
5.6 Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря.....	105
5.7 Обґрунтування вибору підготовки води очищеної та води ін'єкційної	107
5.8 Обґрунтування вибору допоміжних речовин	110
5.9 Вибір та підготовка первинної упаковки для субодиночної вакцини ін'єкційного типу.....	111
5.10 Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання	114
РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу глікопротеїну D.....	119
6.1 Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу.....	119
6.2 Опис технологічної схеми виробництва глікопротеїну D.....	122
6.3 Контроль виробництва глікопротеїну D.....	129
РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва субодиночної вакцини проти ВПГ-2.....	141

7.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва субодиничної протигерпетичної вакцини	141
7.2. Опис технологічного процесу виробництва субодиничної протигерпетичної вакцини	149
7.3 Контроль ділянки виробництва субодиничної протигерпетичної вакцини	161
Список використаної літератури	173
Додатки.....	192

ВСТУП

ВООЗ проголосила герпесвірусні інфекції, як той чинник, що визначає інфекційну і соматичну захворюваність у XXI столітті. На сьогодні близько 1 млрд людей - одна шоста частина населення усього світу, інфіковані вірусом простого герпесу 2-го типу (ВПГ-2). Він займає 3-є місце серед інфекцій, що передаються статевим шляхом, при цьому підвищує сприйнятливість до ВІЛ-інфекції у 3-4 рази, що викликає СНІД.

Зростання числа цього захворювання серед працездатних людей репродуктивного віку від 15 до 49 років представляє соціально-економічну проблему для багатьох країн світу [1].

Незважаючи на досягнені успіхи в лікуванні генітального герпесу, все ж противірусна медикаментозна терапія ВПГ-2 не в силах повним чином запобігти рецидивам даного захворювання тим паче викоринити його. Найбільш ефективним та економічно вигідним вирішенням буде імунізація шляхом вакцинації населення, про що свідчить викоринення віспи та істотне зниження захворюваності та смертності від поліомієліту, правця, дифтерії та кору в імунізованих людей. Вакцинація є найбільш ефективною стратегією зниження високих показників захворюваності та смертності, а також зменшення величезного соціального і економічного впливу [2].

Створювати вакцини проти нових інфекцій, кількість яких збільшується щороку, використовуючи старі, усталені та перевірені технології, вдається не завжди. У багатьох випадках можна прослідкувати, що саме живі аттенувані вакцини представляють ризик повернення до високопатогенної форми, тоді як інактивовані вакцини виявляються недостатньо імуногенними або ж в деяких випадках можуть призвести до посилення патології захворювання.

Зміни, які з'являються в технологіях виробництва вакцин пов'язані безпосередньо з необхідністю отримання стабільного антигенного матеріалу зі стійкою імунною відповіддю для проведення щеплень, а також забезпечення

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Бондарчук В.І.			ВСТУП	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							7	173
<i>Керівник</i>		Скороцька О.І.				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П.						

вищого рівня безпеки. Багато праць вчених зосереджено на вдосконаленні усталених та відкритті нових вакцин, серед яких значне місце посідають - білкові субодиничні вакцини. на основі поверхневих антигенів. [3,4].

Їх виробництво є безпечним, оскільки не передбачає культивування чутливих клітин для реплікації вірусних часток. При цьому постає важливий етап конструювання рекомбінантного штаму та генетичної конструкції для синтезу цих поверхневих антигенів. Також не менш важливим є отримання очищеної фармацевтичної субстанції глікопротеїну D [5].

Актуальність: даної роботи визначається попитом населення України у вітчизняній вакцині проти ВПГ-2 та імпортозаміщення російської інактивованої вакцини, що обумовлює необхідність розроблення високоефективної та водночас не складної у реалізації технології отримання субодиничної вакцини ін'єкційної форми на основі рекомбінантного антигену глікопротеїну D ВПГ-2, як основи для створення субодиничної вакцини проти ВПГ-2, яка у свою чергу буде вільною від шкідливих домішок, стабільною, високо імуногенною зі зменшеним ризиком побічних імунологічних ефектів і без збереження в рефрижераторах [1].

Новизною даної роботи є обґрунтування використання даних, щодо особливостей культивування рекомбінантного штаму *Escherichia coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) для отримання глікопротеїну D, у значній кількості - 355 мг/л культуральної рідини, з подальшою оптимальною технологією виділення і очищення білку з метою отримання фармацевтичної субстанції, яка буде основою імуногенної субодиничної вакцини проти ВПГ-2, що ефективно взаємодіє з антитілами *in vitro* та *in vivo*. [6].

Розділ 1. Біотехнологічні особливості отримання вірусних антигенів, як основи субодиничних вакцин

1.1 Вірус Денге

Лихоманка Денге - основне вірусне захворювання комарів, що вражає людей, котрі живуть у тропічних та субтропічних країнах світу та супроводжується інтоксикацією, болем у м'язах, суглобах, висипом і збільшенням лімфатичних вузлів, що в результаті призводить до летальних випадків. Збудником захворювання є вірус Денге, який належить до роду *Flavivirus* сімейства *Flaviviridae*. Його антигеном є неструктурний глікопротеїн NS1, розчинні форми якого відомі досить давно як комплемент-зв'язуючого антигену. Основна відома функція NS1 - пригнічувати вироблення інтерферону (ІФН) інфікованої кліткою шляхом пригнічення TLR3' - опосередкованої активації фактора 3 (IRF3) регуляції ІФН. Таким чином, NS1 грає роль "підсилювача вірулентності" при флавівірусних інфекціях.

У статті [7] авторами запропоновано спосіб рефолдингу рекомбінантного білка (NS1) вірусу Денге (Dengue virus). Він включав солюбілізацію білка NS1, яку здійснювали після денатурації тілець включень і повторного відтворення конформації досліджуваного білка. Реорганізований рекомбінантний білок був виділений у вигляді термостабільних розчинних димерів зі збереженими структурними особливостями і не потребує глікозилування чи посттрансляційних модифікацій для димерної форми і взаємодіє з антитілами *in vitro*. Таким чином рекомбінантний білок NS1 зберіг важливу конформацію і антигенні детермінанти нативного вірусного білка і являє собою цінний реагент або для розробки вакцин, або для діагностичних методів. Концентрація рекомбінантного NS1 становила 135 мг/л культуральної рідини, а в результаті виділення і очищення вдалось отримати всього 3,5 мг чистого NS1.

Ще одні автори [8] спробували оптимізувати експресію рекомбінантного білка NS1 вірусу Денге. Умови експресії, які підлягали оптимізації були:

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарчук В.І.			Розділ 1. Біотехнологічні особливості отримання вірусних антигенів, як основи субодиничних вакцин	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							9	173
Керівник		Скροцька О.І.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П						

концентрація IPTG, тип середовища, температура та час культивування для максимального накопичення біомаси (110 мг/л). Трансформовані клітини *E. coli* Rosetta-gami, вирощували на оптимально-експериментально підібраному середовищі ТВ-3, до якого входили саме: дріжджовий екстракт, гліцерин, розчин мікроелементів з 50 мкг/мл канаміцину та інкубували при 37°C при 200 об/хв протягом 18 годин. В якості індуктора використовували IPTG різних концентрацій: 0,1, 0,25, 0,5 та 1 мМ, серед яких оптимально підбраною виявилась концентрацію IPTG - 1 мМ, який вносили за $OD_{600} = 0,7$. Максимальна концентрація білку NS1 в культуральній рідині становила 32 мг/л. В результаті очищення білку саме в денатураційних умовах з повторним складанням *in vitro*, задля досягнення природної конформації рекомбінантного глікопротеїну, було отримано 4,2 мг очищеного NS1.

Високої експресії неструктурного білка (NS1) вірусу Денге вдалось досягти вченим у статті [9], де вони дослідили вплив різних концентрації внесення індуктора – арабіноза (0,002%, 0,02%, 0,2% та 2%), а також температуру культивування (при 27°C, 30°C і 35°C). Трансформовані клітини вирощували на LB середовищі, в якому джерелом вуглецю і азоту слугували триптон і дріжджовий екстракт. Було показано, що найбільшу кількість рекомбінантного білку вдалось отримати зі 140 мг/л до 155 мг/л за використання, як додаткового джерела вуглецю - глюкози в концентрації 0,0001% за температури культивування 30°C та концентрації 0,2% арабінози як індуктора, яку вносили після 4 годин культивування. Дане дослідження мало на меті трудомісткий і дорогий експеримент, оскільки було спрямоване більше на оптимізування кодону експресії (рекомбінантна плазмідна рBAD / Thio-TOPO NS1) та умов повторного згортання (додавання GSH / GSSG, що збільшує вироблення розчинного білка) для отримання білка в природному вигляді, ніж на отриманні високої концентрації рекомбінантного білка в культуральній рідині.

У статті [10] авторам вдалося досягти високої експресії білку NS1 вірусу Денге в *E. coli* Top 10 за допомогою розробленого вектора експресії саме для бактерій рBM802. Вирощування клітин продуценту здійснювали за початкової температури 37°C на ТВ середовищі, що є значно доповненішим (містить

гліцерин, фосфатні солі, та більші концентрації джерел вуглецю та азоту), а також є дорожчим ніж звичайне LB. Серед порівнюваних концентрацій арабінози в якості індуктора (0,02%, 0,002% та 0,0002%) оптимальною виявилась концентрація арабінози 0,2% (мас./об.), яку вносили після 4 годин культивування. Оптимальна температура культивування після внесення індуктора серед порівнюваних 24°C і 30°C, становила остання. Концентрація в культуральній рідині рекомбінантного NS1 становила 230 мг/л, а в результаті комбінації етапів виділення очищення, які включали центрифугування, афінну хроматографію з агарозою Ni-NTA, а також процесу рефолдингу, отримали лише 12 мг білку NS1 зі ступенем чистоти, яка перевищувала 90%.

Побудовою та експресією синтетичного гена, що кодує глікопротеїн NS1 вірусу Денге займалися і дослідники [11]. Трансформовані клітини *Pichia pastoris* KM71 спочатку вирощували на середовищі BMGY протягом 12 год, далі змінювали на BMMY середовище. Серед порівнюваних концентрацій індуктора метанолу 1%, 2% і 3,0% (об. / об.), оптимально підібрана була 2% метанол, який вносили при $OD_{600} = 2-6$. Оптимальні умови для експресії NS1 у 2% метанолі були досягнуті через 72 год індукції. Рекомбінантний білок NS1 не потребує глікозилювання і його очищали за допомогою ультрафільтрації та афінної хроматографії Ni-NTA.

Вчені в [12] вперше експресували рекомбінантний білок NS1 вірусу Денге у *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Трансформовані клітини вирощували в середовищі YPD за початкового перемішування 200 об/хв. Через 24 години додавали галактозу 4 г/л в якості індуктора та біотин в якості фактора росту і культивують протягом 48 год при 250 об/хв та строгому рН 5. Концентрація рекомбінантного білку в поживному середовищі становила 120 мг/л.

У прокаріотичних системах експресії рекомбінантний білок NS1 вірусу Денге накопичувався у вигляді тілець включень, а в еукаріотичних секретувався в культуральну рідину і не потребував глікозилювання. Дослідження вчених також продемонстрували, що рекомбінантний NS1 здатний ефективно взаємодіяти з моноклоальними та біспецифічними антитілами *in vitro* та *in vivo* при цьому зберігаючи свої антигенні та імунологічні властивості.

Біотехнологічні особливості отримання антигенів вірусу Денге (Dengue virus)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Розмір антигену (кДа)	Особливості культивування	Конц. мг/л	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RIL	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	43-48 кДа	При досяганні $OD_{600} = 0,5$ та $t = 37^{\circ}C$ додавали індуктор 0,5 мМ IPTG та культивують ще 4 год	135	[7]
<i>E. coli</i> Rosetta-gami	дріжджовий екстракт – 20; гліцерин - 4; розчин мікроелементів - 1	45 кДа	Після 5 год інкубації за $t = 37^{\circ}C$ та перемішуванні 200 об/хв при досягненні $OD_{600} = 0,7$ вносили індуктора - 1 мМ IPTG	32	[8]
<i>E. coli</i> Top 10	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	47 кДа	Після 4 год культивування при $t = 30^{\circ}C$ за наявності додаткового джерела - глюкози в середовищі в конц. 0,0001% вносять індуктор – 0,2% розчин арабінози	155	[9]
<i>E. coli</i> Top 10	триптон – 12; дріжджовий екстракт – 24; гліцерин - 4	47 кДа	Після 4 год інкубації за $t = 37^{\circ}C$ та перемішування 250 об/хв при $OD_{600} = 0,5-0,6$ додавали індуктор 0,2% розчин арабінози і культивують ще 16 год за $t = 37^{\circ}C$	230	[10]
<i>P. pastoris</i> KM71	пептон - 20; гліцерин 10; дріжджовий екстракт – 10	45 кДа	Після 12 год інкубації за $t = 30^{\circ}C$ та перемішуванні 250 об/хв середовище середовищі VMGY змінювали на VMMY і при досягненні $OD_{600} = 2-6$ додавали метанолу 2% (об/об) в якості індуктора	-	[11]
<i>K. marxianus</i> UFV-3	глюкоза – 10; дріжджовий екстракт – 10	45 кДа	Після 24 год інкубації за $t = 37^{\circ}C$, підтримки рН на рівні 5,0 та перемішуванні 200 об/хв при досягненні $OD_{600} = 2$, в якості індуктора додавали 4 г/л галактози та добавку біотин - $4 \cdot 10^{-5}$ г/л та культивують при 250 об/хв	120	[12]

1.2 Вірус Зіка

EDIII та E80, E90 - структурні білки оболонки вірусу Зіка, який належить до роду флавівірусів родини *Flaviviridae*, що є його антигенами і викликають лихоманку Зіка, мікроцефалію плоду у новонароджених та призводить до піку у неврологічних станах (синдрому Гійєна – Барре).

Група вчених у своєму дослідженні [13] продемонструвала синтез рекомбінантного білка EDIII як безпечної та ефективною субодиночної вакцини проти вірусу Зіка (ZIKV). Отриману плазмиду pPink α -HC-ZIKV-EDIII електропорували у дріжджі *P. pastoris* PichiaPink, які вирощували на BMGY середовищі з додаванням індуктора 1% метанол, який вносили після 24 год культивування. За використання афінної хроматографії зі смолою Ni-NTA вдалось отримати 4,5 мг очищеного рекомбінантного білку.

У дослідженні [14] вчені проаналізували експресію та імуногенність білкового антигену EDIII вірусу Зіка за допомогою *Nicotiana benthamiana*, яку шляхом електропорації трансформували в *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (містить модуль конструкції 3' DIII), який був перенесений у листя *N. benthamiana* разом із 5' модулем та конструкцією інтегрази за допомогою агроінфільтрації. Рослини *N. benthamiana* вирощували та агроінфільтрували або коагроінфільтрували, при цьому експресія EDIII відбувалась в ендоплазматичному ретикулумі у вигляді розчинного білку у рослинних клітинах. В результаті поєднання кислотного осадження та іммобілізованої афінної хроматографії з іонами металів вдалось отримати 3,2 мг очищеного EDIII із 100 г листя культивованих рослин зі ступенем чистоти більше 95%.

Дослідникам в [15] вдалось експресувати рекомбінантні білки проти вірусу Зіка за використання *Drosophila* S2, в яку трансформували плазмиди pMT-E80 та pMT-EDIII. Мікроорганізм вирощували на середовищі SFM (Gibco) з 25 мкг/мл бластицидину за температури 37°C впродовж 7 днів. При досягненні концентрації клітин $2-3 \cdot 10^7$ кл/мл додавали індуктор 5 мМ хлорид хрому. Кількість очищених за допомогою афінної хроматографії рекомбінантних білків становила 10 мг та 2 мг для E80 та EDIII відповідно з 1 літра культуральної рідини.

В якості антигену для створення субодиничної вакцини проти вірусу Зіка вчені в [16] використали глікопротеїн E90. Вектор експресії pET28a і трансформували в *E. coli* BL21 (DE3), яку вирощували на LB середовищі при $t=37^{\circ}\text{C}$ додаванням індуктора 1 ммоль/л IPTG. Рекombінантний E90 злитий з His-міткою на N-кінці, експресувався у вигляді нерозчинних тілець включень, з яких після етапів виділення та очищення за допомогою афінної хроматографії на агарозі вдалось отримати аж 550 мг очищеного білку.

У статті [17] вчені дослідили синтез та ефективність рекombінантного білку E90 проти вірусу Зіка виробленої в клітинах *Drosophila melanogaster* S2., які котрансфікували експресійним вектором на основі pMT-BiP та селективною маркерною плазмідною pCoHugro. Культуру вирощували на Grace's Insect Medium за температури 37°C та наявності гігromіцину В 300 мкг/мл та індуктора 200 мкМ CuSO_4 . Концентрація рекombінантного білку E90 в супернатанті становила 5 мг/л.

Біотехнологічні особливості отримання антигенів вірусу Зіка (Zika virus)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>P. pastoris</i> PichiaPink	пептон – 20; дріжджовий екстракт – 10	білок EDIII 13 кДа 100 АК	позаклітинний	Після 24 год культивування за $t = 30^{\circ}\text{C}$ зі струшуванням 200 об/хв додавали 1% метанолу як індуктор	4,5*	здатний інгібувати ZIKV-інфекцію як в <i>in vitro</i> так і взаємодіє з антитілами <i>in vivo</i> , забезпечуючи при цьому захист від летальної інфекції	[13]
<i>N. benthamiana</i>	реакції фотосинтезу	білок EDIII 14 кДа	ендоплазматичний ретикулум	Культивування методом агроінфільтрації	3,2 мг зі 100 г листя	виявляє специфічне зв'язування з моноклональними антитілами <i>in vitro</i> та здатний викликати потужну імунну відповідь <i>in vivo</i> на мишах	[14]
<i>Drosophila</i> S2	гідролізат лактоальбуміну - 3,35; дріжджовий екстракт- 3,35	білок EDIII 15 кДа 109 АК	позаклітинний	За культивування $t = 37^{\circ}\text{C}$ при досягненні концентрації клітин $2-3 \times 10^7$ кл/мл вносили індуктор 5 мМ хлориду хрому	2*	ефективно викликають захисні відповіді антитіл на моделях <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	[15]
		білок E80 55 кДа 400 АК			10*		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок E90 49,3 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Після 6 год інкубації за $t = 37^{\circ}\text{C}$ та та перемішування 200 об/хв додавали індуктор 1 мМ IPTG	550*	Індукує стійку ZIKV-специфічну гуморальну відповідь <i>in vivo</i> у дорослих мишей	[16]
<i>D. melanogaster</i> S2	гідролізат лактоальбуміну - 3,35; дріжджовий екстракт- 3,35	білок E90 45 кДа 407 АК	розчинний позаклітинний білок	За культивування $t = 37^{\circ}\text{C}$ та при досягненні концентрації клітин $3-4 \times 10^7$ вносили індуктор 200 мкМ CuSO_4	5	Під час досліджень <i>in vivo</i> , дві імунізації вакциною індукують стійкий антигензв'язуючий титр IgG та високий рівень нейтралізуючих антитіл.	[17]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини.

1.3 Вірус простого герпесу 2 типу

Глікопротеїн D (gD) - структурний білок оболонки вірусу простого герпесу 2 типу, який належить до родини *Herpesviridae*, що є його антигеном і найпоширенішою причиною генітального герпесу, яке зумовлює значне погіршення імунної системи та появи неприємних симптомів (виразки, висип, свербіж) і в основному передається статевим шляхом або під час пологів від матерів до новонародженої дитини.

Високої експресії рекомбінантного глікопротеїну gD як основи досягли вчені в [6]. Створений та оптимізований вектор експресії pET28-gD-315 трансформували в *E. coli* BL21 (DE3) методом теплового шоку. Культуру вирощували на середовищі LB з канаміцином 50 мкг/мл при за температури 37°C. Експресія рекомбінантного глікопротеїну gD відбувалась у вигляді тілець включень за індукції 1 мМ IPTG протягом 6 годин при досягненні $OD_{600} = 0,6$. Концентрація білку в культуральній рідині становила 355 мг/л, а в результаті виділення і очищенні отримали 24 мг рекомбінантного gD.

Як систему експресії метилотрофних дріжджів для синтезу рекомбінантного gD проти вірусу простого герпесу 2 типу використав Wang із співавторами у [18]. Для цього вони створили рекомбінантний вектор експресії pPIC9K-gD 1-340, який вводили в *P. pastoris* GS115 електропорацією. Культуру вирощували на середовищі BMMY протягом 72 годин при 28°C. З метою отримання максимальної експресії рекомбінантного білка gD його індукцію проводили в різних умовах (концентрація метанолу та час внесення індуктора). Накопичення gD досягло піку через 24 години після індукції 1% метанолом і його концентрація становила 425 мг/л культуральної рідини.

Рекомбінантний gD, також продукується в системі експресії бакуловірусу, про що свідчить, що в [19] вченим вдалось розробити двоступеневу культуру для експресії рекомбінантного білка gD2 за допомогою іммобілізованих клітин *Spodoptera frugiperda* Sf9, що включало в себе культивування клітин Sf9, на середовищі з 10% бичачою сироваткою, та подальшого їх іммобілізування за допомогою гідрогелю шовкового фіброїну і культивування в біореакторі після їх зараження рекомбінантним бакуловірусом, що експресує ген gD2 на всю

довжину. Культивування проводились при 120-150 об/хв за температури 27 °C у середовищі Grace's Insect Medium із антибіотиками 100 од/мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину та 0,25 г/мл амфотерицину. Максимальна концентрація рекомбінантного білка gD2 становила 135 мг/л культуральної рідини після 120 годин культивування. Результати дослідження показують, що іммобілізовані клітини та двоступенева культура можуть продовжити період експресії та значно підвищити синтез рекомбінантного білка.

Дослідники в [20] проводили експресію рекомбінантного білка gD2 у рослинах трансгенних томатів за допомогою культури *A. tumifaciens* LBA 4404. Створений бінарний вектор експресії рослин PBI-121, який трансформували за допомогою теплового шоку, в *A. tumifaciens* LBA 4404 для агроінокуляції. Рослини томатів переносили в регенераційне середовище із антибіотиками 500 мкг/мл клафорана і 500 мкг/мл карбеніциліну та 50 мкг/мл канаміцину (векторний антибіотик). В якості гормонів росту використовували індол-оцтову кислоту 2 мг/л та зеатин 1 мг/л. Результати показали, що конструкція HSV-gD2 експресувалася як на рівні РНК, так і на рівні білка в трансгенних рослинах томата. Білковий антиген HSV-2gD, що експресується в рослинній тканині, насінні та листі полегшує доставку антигену вакцини та має практичну доцільність при широкомасштабному застосуванні.

У статті [21] як система експресії рекомбінантного gD використовують клітини СНО (яєчник китайського хом'ячка). Вчені створили рекомбінантну плазмиду pMD902-gD2, яку трансформували шляхом електропорації в клітини СНО, які в подальшому інкубували у повноцінному середовищі Gibco при 37°C і 5% CO₂ з перемішуванням при 130 об/хв. Через 24 год після трансфекції клітини переміщали на селективне середовище та культивували 120 годин. В кінцевому результаті вдалось отримати 57 мг очищеного рекомбінантного gD з зі ступенем очищення >95%.

Біотехнологічні особливості отримання антигенів вірусу простого герпесу 2 типу (Herpes Simplex virus type 2)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	гліцерин – 4; дріжджовий екстракт – 24; триптон - 12.	білок gD 53 кДа 315 АК	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	При OD ₆₀₀ = 0,6 за t = 37°C та перемішування 200 об/хв додають індуктор 0,1 г/л 1 мМ IPTG	355	Під час дослідження <i>in vivo</i> спостерігалась посилена гуморальна та клітинна імунні відповіді з високим титром антитіл проти gD у мишей	[6]
<i>P. pastoris</i> GS115	пептон - 20; гліцерин 10; дріжджовий екстракт – 10	білок gD 55 кДа 340 АК	позаклітинний розчинний білок	Після 24 год культивування за t = 28°C та перемішування 280 об/хв вносили індуктор 1% метанолу	425	Взаємодіє з антитілами <i>in vivo</i> , при цьому викликаючи як гуморальну, так і клітинну імунну відповіді у мишей	[18]
<i>S. frugiperda</i> Sf9	гідролізат лактоальбуміну - 3,35; дріжджовий екстракт- 3,35	білок gD 55 кДа 393 АК	внутрішньо-клітинний	двоступеневе культивування з іммобілізацією клітин, t = 27°C перемішування 120-150 об/хв підтримка 30% насичення киснем	135	-	[19]
<i>CHO cells</i>	гідролізат лактоальбуміну - 3,35; дріжджовий екстракт- 3,35	білок gD 44 кДа 285 АК	позаклітинний	Культивування в повному середовищі Gibco за t = 37°C і з перемішуванням 130 об/хв та насиченням 5% CO ₂	57*	В дослідженнях <i>in vivo</i> стимулює специфічні антитіла у мишей, а також індукує реакції нейтралізуючих антитіл у людини та специфічно індукує IFN- γ та IL-2	[21]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини.

1.4 Вірус грипу

Гемаглютиніни НА (поверхневі білки) та висококонсервативний нуклеопротеїд NP (основний внутрішній білок вірусу, що формує субодиниці капсиду) вірусу грипу (належить до родини *Orthomyxoviridae*), які є його антигенами і викликають гостре вірусне інфекційне захворювання Грип (часом смертельне) та респіраторні захворювання у людей з різноманітними симптомами, що включають трахеобронхіту та вираженою інтоксикацією з гарячкою.

Над розробкою субодиничної вакцини проти грипу на основі рекомбінантного білка гемаглютиніну НА працювали вчені в [22]. Сконструйовану плазмиду pET-28a (+) вони трансформували в цільовий мікроорганізм *E. coli* BL21 (DE3), який вирощували на Terrific Broth середовищі за $t=37^{\circ}\text{C}$. Експресію рекомбінантного гемаглютиніну H1NA0NA6_PR8 індукували шляхом внесення 1 mM IPTG при досягненні $\text{OD}_{600}=0,8$. Білок очищали від тіл включення методом Ni-афінної хроматографії в умовах денатурації і отримали 2 мг чистого білку з 1 л культуральної рідини.

В статті [23] автори дослідили використання високо збереженої стовбурової області гемаглютиніну НА як універсальної вакцини проти грипу. Створений вектор експресії pPicZA лінеаризували, а потім трансформували в *P. pastoris* KM71H шляхом електропорації. Культуру вирощували на BMGY середовищі за $t=30^{\circ}\text{C}$ протягом 16 годин і при досягненні $\text{OD}_{600} = 12-16$ інокулянт переносили на середовище FM22 з мікроелементами, де клітини культивували за $t=28^{\circ}\text{C}$, pH 5,6 та 40% насиченні розчиненого кисню протягом 20 годин. Після чого вносили індуктор 1% метанол. Рекомбінантний білок гНА очищували за використанням гель-фільтраційної хроматографії і таким чином отримали 100 мг очищеного білку з 1 л культуральної рідини.

Дослідники в [24] також займались експресією рекомбінантного білку H1NA10-Foldon - імуноген стовбурового фрагмента НА та підтвердження його імунологічного ефекту. Створений експресійний вектор pET-28a (+) трансформували в *E. coli* BL21 (DE3), яку вирощували на середовищі Tartoff-Hobbs HiVeg за $t=37^{\circ}\text{C}$, а при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,6-0,8$ клітини індукували

1 mM IPTG і вирощували ще протягом 12 годин за $t=20^{\circ}\text{C}$. H1HA10-Foldon експресувався у вигляді розчинної фракції лізату культури клітин, що передбачало належне його згортання. Очищали білок за допомогою однієї стадії афінного хроматографування, в результаті чого отримали 10 мг очищеного продукту з 1 л культуральної рідини.

Ці ж автори наступного року в праці [25] також продемонстрували експресію рекомбінантного білка H1HA10-Foldon в прокаріотичній системі. Вони трансформували сконструйований вектор експресії pET-28a (+) в *E. coli* BL21 (DE3), яку вирощували вже на LB середовищі за температури 37°C і при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,6-0,8$ клітини індукували 1 mM IPTG і вирощували ще протягом 12-16 годин при $t=20^{\circ}\text{C}$. Під час етапів виділення і очищування поєднували хроматографію зі смолою Ni-NTA та подальший діаліз білка, в результаті чого отримали 10 мг очищеного H1HA10-Foldon.

Saczyńska разом із співавторами в [26] досягли експресії нового типу гемаглютиніну rH5 що синтезується в бактеріях. Багатоетапну новостворену плазмиду pIGCmT7Kes трансформували в *E. coli* BL21 (DE3), котру вирощували на LB середовищі з 12 мкг/мл левоміцетином за температури 25°C та швидкістю обертів 150 об/хв. Експресію білка індукували додаванням IPTG до кінцевої концентрації 0,1 мкг/мл при $\text{OD}_{600} = 0,6$ і культуру вирощували ще протягом 4,5 годин. Після довготривалих етапів виділення і очищення, які включали солюбілізацію ізольованих тілець включень вдалось отримати 2 мг білку rH5 з 1 літра культуральної рідини зі ступенем очищення 70-80%.

Науковці у своїй праці [27] експресували рекомбінантний білок гемаглютиніну HA в еукаріотичній системі. Сконструйовану плазмиду pPIC9KH1N1HA вставляли шляхом електропорації в *P. pastoris* GS115, яку вирощували на пластинах SD-His та інкубували при 28°C при 250 об/хв протягом 2 днів. Під час оптимізації індукції білка найкращі результати були продемонстровані після 46 годин культивування при $\text{OD}_{600} = 4-5$ і додавали індуктор 2% метанол. Досить слаболужний рН = 8,2 показав дуже хорошу стабільність експресованого рекомбінантного білка rHA і його концентрація становила 60 мг/л культуральної рідини.

Maria Pietrzaka разом з колегами в [28] розробили нового кандидата на субодиничну вакцину проти пташиного грипу на основі ектодомена H5DHA білка гемаглютиніну, що експресується в дріжджовій системі. Отримана конструкція pPICZ α C/H5DHA була введена шляхом електропорації у *P. pastoris* KM 71, яку вирощували в середовищі ВМУ з 1% при 30°C з перемішуванням 200 об/хв. Через 48 додавали 5% метанол в якості індуктора і культивували протягом 7 днів за інтенсивного перемішування 200-250 об/хв при 26°C. Рекombінантний білок H5DHA виділяли з культуральної рідини та в подальшому очищали афінною хроматографією з агарозою Ni-NTA.

Автори в [29] експресували незчеплений білок rHA0 у рослині за допомогою агроінфільтрації. Сконструювавши рослинний вектор експресії pEAQ -HT -HA його трансформували в штам *A. tumefaciens* LBA4404 методом заморожування-відтавання. Культуру вирощували на LB середовищі із селективними антибіотиками і при OD₆₀₀ = 1,2-1,4, а потім центрифугували і гранулам ресуспендували в інфільтраційному буфері, які далі змішували із зрілими листками рослин *N. benthamiana* і спільно агроінфільтрували за допомогою 10 мл шприца без голки. Рослини вирощували при 23±2°C протягом 6 днів за достатньої кількості світла (16 годинний день) та води. Кількість очищеного rHA0 становила 0,2 г із 1 кг свіжої маси листя.

Huang із співавторами у своїй роботі [30] експресували рекombінантний нуклеопротеїн rNP в прокаріотичній системі. Для цього вони створили експресійну плазмиду pET30a-NP, яку трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру вирощували у середовищі 2 × YT із 100 мг/л канаміцину при 37°C, а при OD₆₀₀ = 0,6-0,8 вносили індуктор 0,1 мМоль/л IPTG та інкубували впродовж 10 годин при 25°C. В результаті виділення і очищення за допомогою іонообмінної хроматографії отримали 1 г rNP з 1 л культуральної рідини зі ступенем очищення більше 90%.

Біотехнологічні особливості отримання антигенів вірусу грипу (Influenza virus)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 12; дріжджовий екстракт – 24	білок Н1НА0НА6_PR8 30 кДа 238 АК	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Після 6 годин культивування, за $t = 37^{\circ}\text{C}$, при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,8$ вносять індуктор 1 мМ IPTG	2*	Забезпечує захист від летальної гомологічної вірусної атаки <i>in vivo</i> на мишах, захищає від декількох штамів вірусів грипу у межах цього підтипу	[22]
<i>P. pastoris</i> KM71H	пептон – 20; дріжджовий екстракт – 10; гліцерин - 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5	білок гНА 31 кДа 293 АК	позаклітинний розчинний білок	При $\text{OD}_{600} = 12-16$ за $t = 30^{\circ}\text{C}$, заміна середовища BMGY на FM22 із 40% розч. O_2 після 20 год культивування вносять індуктор 1 % метанол	100*	Індукує перехресну взаємодію антигену з антитілами, а також відповіді Т-клітин, із широким захистом <i>in vivo</i> на мишах	[23]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	гідролізат рослинних білків – 12; дріжджовий екстракт – 24	білок Н1НА10-Foldon 25 кДа	розчинна фракція лізату культури клітин	За культивування $t = 37^{\circ}\text{C}$ і при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,6-0,8$ вносять індуктор 1 мМ IPTG і вирощують ще протягом 12 годин за $t = 20^{\circ}\text{C}$	10*	Індукує високі перехресно реагуючі титри антитіл та забезпечив надійний захист від летального гетерологічного зараження вірусом <i>in vivo</i>	[24]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Н1НА10-Foldon 25 кДа	розчинна фракція лізату культури клітин	Культивування з $t = 37^{\circ}\text{C}$ і при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,6-0,8$ вносять індуктор 1 мМ IPTG і вирощують ще протягом 12-16 годин за $t = 20^{\circ}\text{C}$	10*	Надає надійний підтип-специфічний захист <i>in vivo</i> та частковий захист від летального гомологічного зараження вірусом	[25]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок гН5 57 кДа 500 АК	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	При $\text{OD}_{600} = 0,6$ за $t = 25^{\circ}\text{C}$ та перемішування 150 об/хв додають індуктор 1 мкг/мл 1 мМ IPTG і культивують ще 4,5 годин	2*	Зберігає конформаційні епітопи інгібуючи гемаглютинацію та/або нейтралізуючи віруси грипу <i>in vitro</i>	[26]

Біотехнологічні особливості отримання антигенів вірусу грипу (Influenza virus)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>P. pastoris</i> GS115	декстроза - 20 дріжджова азотиста основа - 13,4	білок гНА 80 кДа	позаклітинний розчинний білок	Культивування за $t = 28^{\circ}\text{C}$ при 250 об/хв і оптимальному рН = 8,2 за досягнення $\text{OD}_{600} = 4-5$ після 46 год інкубації вносять індуктор 2% метанол	60	Викликає нейтралізуючі антитіла при взаємодії з антигеном <i>in vivo</i> на моделях мишей та кроликів	[27]
<i>P. pastoris</i> KM 71	пептон - 20; гліцерин 10; дріжджовий екстракт – 10	білок H5DHA 67 кДа 530 АК	позаклітинний розчинний білок	Через 48 год культивування за початкової $t = 30^{\circ}\text{C}$ та швидкістю обертів 200 об/хв вносили індуктор 5% метанол і культують протягом 7 днів за інтенсивного перемішування 200-250 об/хв при 26°C	200*	Сильно імуногенний і захищає від летального ураження підтипом H5 NPAI <i>in vivo</i> та викликає специфічні антитіла <i>in vitro</i> проти HA-IgY	[28]
<i>N. benthamiana</i>	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5 і реакції фотосинтезу	білок гHA0 70 кДа 565 АК	ендоплазматичний ретикулум	Трансформування цільовим вектором <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 при $\text{OD}_{600} = 1,2-1,4$ ресуспендування гранул в буфері та їх перенесення в <i>N. benthamiana</i> і їх сумісна агрофільтрація	0,2 г з 1 кг листя	Глікозильований і проявляє активність гемаглютинації та інгібування гемаглютинації <i>in vitro</i>	[29]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 16; дріжджовий екстракт – 10	білок гNP 55 кДа	розчинна фракція лізату культури клітин	Культивування за 37°C , а при $\text{OD}_{600} = 0,6-0,8$ вносили індуктор 0,1 мМоль/л IPTG та інкубували впродовж 10 годин при 25°C	1**	Індукує NP-специфічні антитіла та відповіді Т-клітин <i>in vivo</i> на мишах і захисна ефективність гNP проти летального ураження вірусом гетеросубтипу грипу (H1N1)	[30]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини; ** - 1 г/л очищеного продукту

2. Системи експресії бактеріальних антигенів в розробці рекомбінантних субодиничних вакцин

2.1 Туберкульоз

Rv2005c, Rv0577 - структурні мікобактеріальні білки теплового шоку поверхневої оболонки, PstS-1 (Rv0934) - структурний O-манозильований мікобактеріальний білок, RpfE (Rv2450c) - внутрішньоклітинний мікобактеріальний білок (фактор реанімації), Ag85 - секреторний білковий комплекс клітинної стінки, які належать *Mycobacterium tuberculosis*, що відноситься до родини *Mycobacteriaceae*, які є його антигенами і викликають летальне інфекційне захворювання туберкульоз з багатосистемністю уражень (кашель, кровохаркання, нічна пітливість).

У своїй роботі [31] *Back* разом із співавторами працювали над розробкою мультиантигенної субодиничної вакцини проти туберкульозу. Їм вдалось створити вектор експресії pET22b (+), який трансформували методом теплового шоку в *E. coli* BL21. Культуру вирощували на середовищі LB при 37°C і в якості індуктора використовували 0,1 мМ IPTG при досягненні OD₆₀₀ = 0,4. В результаті під час виділення за допомогою His-афінної хроматографії вдалось отримати 5 мг очищеного рекомбінантного білку Rv2005c.

Експресією рекомбінантного PstS-1, як антигену *M. tuberculosis* в системі експресії дріжджів займались і в [32]. Вчені отриману рекомбінантну плазмиду pPICZαB-PstS-1, яку лінеаризували і використали для трансформації в електрокомпетентні *P. pastoris* X-33. Після 32 годин культивування за температури 30°C та перемішуванні 250 об/хв культуру трансформанти із середовища BMGY переносили в BMMY з оптимальною підбраною концентрацією метанолу, як індуктора 10 мг/л і культивували протягом 72 годин. Концентрація рекомбінантного білку в культуральній рідині становила 46 мг/л. В результаті вдалось отримати 4,2 мг очищеного рекомбінантного PstS-1 зі ступенем чистоти 98%.

НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.	Бондарчук В.І.			
Консульт.				
Керівник	Скороцька О.І.			
Н. Контр.				
Зав. каф.	Стабніков В.П.			
Розділ 2. Системи експресії бактеріальних антигенів в розробці рекомбінантних субодиничних вакцин				
		Літ.	Арк.	Акрушів
			24	173
Кафедра БТМ				

В іншій роботі [33] дослідники намагались здійснити експресію антигену Rv0577, який може індукувати дозрівання дендритних клітин (DC) і призвести до посилення клітинного імунітету до туберкульозу. Для одержання рекомбінантного білка Rv0577 створили вектор експресії pET28a, який трансформували у клітини *E. coli* BL21 шляхом теплового шоку. Культуру вирощували на LB середовищі при 37°C. За досягнення $OD_{600} = 0,4-0,5$ додавали 1 mM IPTG в якості індуктора. Рекомбінантний білок очищали агарозною хроматографією з використанням Ni-NTA. Як результат отримали 10 мг очищеного Rv0577 зі ступенем чистоти 96%.

В праці [34] вчені отримували рекомбінантний білок RpfE шляхом створення вектора експресії pPRO-EXHT-rpfE, який переносили в *E. coli* DH5 α . Культуру вирощували на LB середовищі при 37°C та перемішуванні 100 об/хв. При $OD_{600} = 0,6$ додавали індуктор 1 mM IPTG та інкубували ще 4 години. Близько 1,65 мг очищених білків RpfE було отримано з 200 мл культури.

Aghababa разом із колегами в [35] клонували ген Ag85B у плазмиду pET32a(+) і отримали вектор експресії pET32a-85B, який далі трансформували в *E. coli* GM 2163. Культуру вирощували на LB середовищі з 50 мкг/мл ампіциліну за $t=37^\circ\text{C}$ і перемішуванні 250 об/хв. За досягнення $OD_{600} = 0,6$ вносили 1 mM IPTG в якості індуктора і культивували ще 3 години. Рекомбінантний Ag85B очищали за використання хроматографії зі смолами Ni-NTA і в результаті отримали очищеного білку 7,5 мл з 1 л культуральної рідини.

В статті [36] вчені створили конструкцію pET101/D Ag85B, яку трансформували в *E. coli* BL21, яку вирощували на LB середовищі з ампіциліном 100 мкг/мл при 37°C. За досягнення $OD_{600} = 0,5$ додають індуктор 2 mM IPTG і культивують ще 12 годин. В ході виділення і очищення білок пропускали через колонку Ni-NTA і очищали за допомогою 5-ти ступеневого діалізу.

Автори в [37] розробили плазмиду pMRLB.47 (Rv1886c-ss.pET32b), яку ввели в *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Культуру вирощують на LB середовищі з ампіциліном при 25°C та перемішуванні 200 об/хв. Синтез рекомбінантного білка Ag85 індукували додаванням 0,5 mM IPTG при $OD_{600} = 1$ і культивували ще 45 хвилин. Концентрація Ag85B становила 130 мг/л культуральної рідини.

Біотехнологічні особливості отримання антигенів *Mycobacterium tuberculosis* проти туберкульозу (Tuberculosis)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Rv2005c 30 кДа	внутрішньоклітинний у мембранній фракції	Культивування за 37°C та перемішування 200 об/хв, при OD ₆₀₀ = 0,4 вносили індуктор 1 мМоль/л IPTG та інкубували ще впродовж 4-6 годин	5*	При дослідженні <i>in vivo</i> на мишах взаємодіє з антитілами, а при злитті з антигеном Rv2882c посилює свій антимікобактеріальний ефект <i>in vitro/in vivo</i> індуючи антигенспецифічні багатофункціональні клітини	[31]
<i>P. pastoris</i> X-33	пептон – 20; дріжджовий екстракт – 10 гліцерин - 10	білок PstS-1 36 кДа 353 АК	розчинний позаклітинний білок	Після 32 год культивування за t = 30°C та перемішування 250 об/хв середовище BMGY замінювали на BMMY з оптимальною конц. індуктора 1% метанолом	46	Під час досліджень <i>in vivo</i> взаємодіє з антитілами. Можна використовувати в серодіагностичному наборі для виявлення туберкульозу.	[32]
<i>E. coli</i> BL21	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Rv0577 32 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Вирощування рекомбінантної культури за t = 37°C та перемішування 200 об/хв і при досягненні OD ₆₀₀ = 0,4 вносять 1 мМ IPTG в якості індуктора	10*	Адаптивний імунітет <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> та спрямовання імунної реакції Т-клітин на поляризацію Th1, які сильно і специфічно пригнічують ріст внутрішньоклітинних мікобактерій	[33]
<i>E. coli</i> DH5α	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок RpfE 22 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Інкубування культури при 37°C та швидкості обертів 100 об/хв за OD ₆₀₀ = 0,6 вносять 1 мМ IPTG як індуктор та вирощують культуру ще протягом 4 годин	1,65**	Викликає клітинну імунну відповідь <i>in vivo</i> у імунізованих мишей, індукцію експресії IFN-γ та активація антигенспецифічних лімфоцитів	[34]

Біотехнологічні особливості отримання антигенів *Mycobacterium tuberculosis* проти туберкульозу (Tuberculosis)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> GM 2163	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Ag85B 53 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Після 12 год культивування за 37°C та перемішування 250 об/хв, при OD ₆₀₀ = 0,6 додавали 1 мМ IPTG в якості індуктора та вирощували культуру ще 3 години	7,5*	Взаємодіє з моно- та поліклональними тілами <i>in vivo</i> і використовується в експерименти імунізації та серодіагностиці	[35]
<i>E. coli</i> BL21	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Ag85B 33 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	При досягненні OD ₆₀₀ = 0,6 за температури 37°C додають індуктор в якості 2 мМ IPTG і культивують ще 12 годин	-	Індукує захисну імунну відповідь і стимулює вироблення IFN- γ <i>in vivo</i> на моделях тварин.	[36]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Ag85B 32 кДа	внутрішньо-клітинний розчинний білок	При значенні OD ₆₀₀ = 1 за температури 25°C та перемішуванні 200 об/хв вносять індуктор 0,5 мМ IPTG і культивують ще 45 хвилин	130	-	[37]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини; ** - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 200 мл культуральної рідини

2.2 Ботулізм

ВНс, ЕНс, ВоNT/A-Нс, НсС, ВоNT / F - структурні білки ботулінічного нейротоксину серотипу В, Е, А, С, F відповідно, що належать *Clostridium botulinum*, які є його антигенами і здатні спричиняти небезпечне і смертельне гостре токсико-інфекційне захворювання ботулізм з множинністю симптомами: починаючи від гострого отруєння і закінчуючи розладами автономної нервової системи.

Автори у своїй роботі [38] представили розробку потенційної субодиночної вакцини ВНс проти ботулінічного нейротоксину серотипу В *Botulinum neurotoxins*. Для продукування рекомбінантного антигену ВНс був сконструйований прокаріотичний вектор експресії рTIG-Trx-ВНс, який трансформувався у *E. coli* BL21 (DE3). Культуру вирощували на 2 × YT середовищі з антибіотиком 100 мкг/мл ампіциліну при 37°C. Індукували експресію білка шляхом додавання 0,2 мМ IPTG при досягненні OD₆₀₀ = 0,6-1 і культивують ще 12 годин за 16°C. Після низки послідовних хроматографій в результаті було одержано 15 мг очищеного білка з 1 літра культуральної рідини зі ступенем чистоти 95%.

Вчені в [39] працювали над створенням субодиночної вакцини проти ботулінічного нейротоксину серотипу Е *B. neurotoxins*, що також відноситься до людського. Для синтезу рекомбінантного ЕНс був сконструйований прокаріотичний вектор експресії рTIG-Trx-ЕНс, який трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Штам вирощували при 37 °C на LB середовищі, яке містило антибіотик 100 мкг/мл апміцилін. При досягненні при досягненні OD₆₀₀ = 0,6-1 в якості індуктора використовували 0,4 мМ IPTG і культивують ще протягом 3 годин. Вченим вдалось отримати очищеного ЕНс у кількості 10 мг зі ступенем чистоти 95%.

Yari із співавторами в [40] досягли високої експресії рекомбінантного білку ВоNT/A-Нс як основи субодиночної вакцини проти ботулізму. Вони створили вектор рЕТ28а, який трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Трансформанти вирощували на модифікованому М9 середовищі при рН = 7,1 і температури 37°C та швидкістю 150 об/хв. За досягненні високої щільності

клітин $OD_{600} = 100$ додавали індуктор з оптимально підбраною концентрацією 0,7 мМ IPTG і культивують ще 12 годин за 30°C. Концентрація ВоNT/A-Нс становила 486 мг/л культурального середовища.

У [41] дослідники трансформували *E. coli* BL21 (DE3) створеною конструкцією pAE / ltb-hcc-hcd методом теплового удару. Культуру вирощували на LB середовищі доповненому 100 мкг/мл ампіциліну за параметрів: температура 37°C та перемішування 150 об / хв. В якості індуктора вносили 0,5 мМ IPTG при $OD_{600} = 0,6-0,8$ і культивують ще 3 години. Рекombінантний білок НсС експресувався у вигляді тілець включень і його концентрація в поживному середовищі становила 100 мг/л.

В статті [42] для синтезу рекombінантного білку ВоNT / F в якості субодиничної вакцини сконструювали плазмиду pTIG-Trx-FHc1, яку трансформували в клітини *E. coli* BL21 (DE3). Культуру вирощували на LB середовищі з селективним маркером ампіциліном 100 мкг/мл за температури 37°C і при досягненні оптичної щільності $OD_{600} = 0,5$ додавали індуктор 0,4 мМ IPTG і культивують ще протягом 3 годин. Виділення і очищення з тілець включень проводили в декілька етапів за використання хроматографії та гель-електрофорезу. В результаті вдалось отримати 8 мг очищеного рекombінантного ВоNT / F з 1 л культуральної рідини з високим ступенем очищення 98%.

Біотехнологічні особливості отримання антигенів *Clostridium botulinum* проти ботулізму (Botulism)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 16; дріжджовий екстракт – 10	Білок ВНс 50 кДа 438 АК	внутрішньоклітинні розчинні білки	Під час культивування за $t = 37^{\circ}\text{C}$ та перемішування 200 об/хв при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,6-1$ вносять індуктор 0,2 мМ IPTG та культивують протягом 12 годин при $t = 16^{\circ}\text{C}$	15*	При дослідженні <i>in vivo</i> на мишах володіє високою імуногенністю і ефективно викликає захисні антитіла проти природного нейротоксину BoNT / В.	[38]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок ЕНс 48 кДа 430 АК	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Культивують при $t = 37^{\circ}\text{C}$ та перемішуванні 200 об/хв до досягнення $\text{OD}_{600} = 0,6-1$ і вносять 0,4 мМ IPTG в якості індуктора та вирощували ще протягом 3 годин	10*	Під час досліджень <i>in vivo</i> імунологічно активний і може викликати сильну імунну відповідь, щоб захистити мишей від виклику BoNT / Е.	[39]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	глюкоза - 15; (NH ₄) ₂ SO ₄ - 3,5	білок BoNT/A-Нс 50 кДа	розчинний цитоплазматичний білок	Вирощування культури за $t = 37^{\circ}\text{C}$ та перемішування 150 об/хв і рН = 7,1 додавали індуктор 0,7 мМ IPTG при $\text{OD}_{600} = 100$	486	—	[40]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок НсС 112 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Інкубування за $t = 37^{\circ}\text{C}$ та швидкості обертів 150 об/хв і при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,6-0,8$ додають індуктор 0,5 мМ IPTG	100	Взаємодіє з антитілами <i>in vivo</i> на моделі мишей і викликає стійку імунну відповідь та генерує довготривалий імунітет до ботулізму	[41]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок BoNT / F 50 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Культуру вирощують за температури 37°C і при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,5$ додають індуктор 0,4 мМ IPTG і культивують ще протягом 3 годин	8*	Є ефективним імуногеном, при дослідіах <i>in vivo</i> на мишах зі збільшенням дози збільшується кількість нейтралізуючих антитіл	[42]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини.

2.3 Бруцельоз

Omp16, Omp28 (BP26) - білки зовнішньої мембрани та L7 / L12 - рибосомальні білки *Brucella abortus* та BLS - фермент люмазин-синтази *Brucella melitensis* Rev1, які є їх антигенами і здатні викликати важке небезпечне інфекційне захворювання бруцельоз, що характеризується ураженням органів руху та опори, нервової і сечостатевої систем організму і передається контактним шляхом від тварин-носіїв збудника до людини.

Над створенням субодиничної вакцини на основі рекомбінантного білку Omp16 працювали дослідники в [43]. Автори розробили вектор експресії pET28- Omp16, який трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Рекомбінантні колонії даної культури вирощували в середовищі LB, що містить антибіотик канаміцин 30 мкг/мл, при 37°C. При досягненні $OD_{620} = 0,4-0,6$ в якості індуктора додавали 1 мМ IPTG і культивують впродовж 3 годин. Очищення білка проводили за допомогою афінної хроматографії з використанням смоли Ni-NTA. В результаті отримали 3,4 мг очищеного Omp16 з 1 л культуральної рідини.

Розробкою субодиничної вакцини проти бруцельозу *Brucella lumazine* займалися Akbari та колеги [44]. Для синтезу рекомбінантного білку BLS була сконструйована плазмідна рЕТ32 (a) + і трансформована у *E. coli* BL21 (DE3). Клітини вирощували на LB агарі з 50 мкг/мл ампіциліну за температури 37°C протягом ночі. Індукували експресію білка шляхом додавання 0,1 мМ IPTG при досягненні $OD_{600} = 0,6$. Концентрація рекомбінантного білку BLS в культуральній рідині становила 80 г/л.

Автори в [45] для синтезу злитого білка Omp10-Omp28-L7 / L12 створили рекомбінантну плазмідну рЕТ-28a (+) - Omp10-Omp28-L7 / L12, яку трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру вирощували на LB середовищі за температури 37°C і перемішуванні. При досягненні $OD_{600} = 0,6$ вносили індуктор 1 мМ IPTG і культивували ще протягом 6 годин. Концентрація рекомбінантного злитого білка Omp10-Omp28-L7 / L12, у вигляді нерозчинних тілець включень, становила 7,2 мг/л культурального середовища. Очищення білку здійснювали за допомогою афінної хроматографії з Ni-NTA смолами.

У своїй роботі [46] дослідники працювали над створенням ефективної субодиничної вакцини проти бруцели на основі рекомбінантного білка Omp28. Їм вдалось сконструювати вектор pMAL і трансформувати його в компетентні клітини *E. coli* DH5 α . Культуру вирощували за температури 37°C та перемішуванні на LB середовищі доповненому селективним антибіотиком ампіциліном 100 мкг/мл. Після 12 годин інкубації при OD₆₀₀ = 0,4 в середовище додавали 1 мМ IPTG в якості індуктора та культивували ще 3 години. Білок експресувався у вигляді тілець включень.

Wen-xing із співавторами в [47] експресували рекомбінантний білок VP26, як основи субодиничної вакцини проти бруцельозу, в прокаріотичній системі. Вчені створили конструкцію pQE32-r A bp26, яку трансформували в *E. coli* M15. Клітини вирощували при 37°C та інтенсивному перемішуванні 250 об/хв на LB середовищі доповненому 25 мкг/мл канаміцином і 100 мкг/мл ампіциліном. Після 12 годин інкубації за досягнення OD₆₀₀ = 0,6 вносять індуктор 1 мМ IPTG та культивують ще 5 годин. Концентрація рекомбінантного VP26 10 мг/л культурального середовища. Білок очищали за допомогою хроматографії ІМАС на іммобілізованому афінному металі.

Біотехнологічні особливості отримання антигенів *Brucella abortus* та *Brucella melitensis* проти бруцельозу (Brucellosis)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Omp16 16 кДа	внутрішньо-клітинний	Культивування за температури 37°C і при досягненні OD ₆₀₀ = 0,4-0,6 додають індуктор 1 мМ IPTG і культивують впродовж 3 годин	3,4*	Під час досліджень <i>in vivo</i> на мишах підвищує загальний рівень IgG і збільшує рівні IFN-γ та IL-4; розвиток опосередкованого Т-лімфоцитами імунітету.	[43]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	фермент BLS 35 кДа	внутрішньо-клітинний	При t = 37°C культуру культивують 12 годин і при значенні OD ₆₀₀ = 0,6 вносять індуктор 0,1 мМ IPTG	80	При дослідженні <i>in vivo</i> взаємодіє з моноклоальними антитілами та індукує відповідь імунної системи	[44]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	злитий білок Omp10-Omp28-L7 / L12 55,4 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	При досягненні OD ₆₀₀ = 0,6 за температури 37°C додають індуктор 1 мМ IPTG і культивують ще протягом 6 годин	7,2	В результаті досліджень <i>in vivo</i> на модель мишах взаємодіє з моно- і поліклональними антитілами, при цьому сприяє клітинній та гуморальній імунним реакціям	[45]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Omp28 28 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	За оптичної щільності OD ₆₀₀ = 0,6 та температури 37°C вносять 1 мМ IPTG в якості індуктора і культивують ще 3 години	-	Підвищує як гуморальну, так і клітинну імунні відповіді <i>in vivo</i> на мишах, індукуючи продукцію IgG1 та IgG2a.	[46]
<i>E. coli</i> M15	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок BP26 14 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Культивування за t=37°C і перемішування 250 об/хв при OD ₆₀₀ = 0,5 додають індуктор 1 мМ IPTG та вирощують впродовж 5 годин	10	Під час досліджень <i>in vivo</i> на мишах взаємодіє з антитілами та індукує стійку імунну відповідь	[47]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини.

2.4 Хламідіоз

МOMP - імунодомінантний поверхневий білок зовнішньої мембрани, DUF582 - внутрішньоклітинний білок та PorB / VD - варіабельний домен МOMP *Chlamydia trachomatis*, СТН1 - злитий білок *C. muridarum*, що належать до роду *Chlamydiae*, котрий є його антигеном і викликає хворобу Урогенітальний хламідіоз, що є найпоширенішою причиною (60%) негонококкових уретритів, котрі характеризуються зудом і гнійними виділеннями в сечовидільній системі.

Wen із колегами в [48] експресували рекомбінантний білок МOMP, як основу субдиничної вакцини проти хламідіозу, в прокаріотичній системі. Для цього вони створили вектор експресії pUC57, який трансформували шляхом електропорації в експресійний штаб *E. coli* K12 W25113. Культуру вирощували на LB середовищі із селективним антибіотиком тетрацикліном 10 мкг/мл за температури 37°C та перемішуванні 250 об/хв. Після 12 годин культивування при досягненні $OD_{600} = 0,5$ в середовище вносили індуктор 0,4 мМ IPTG і вирощували ще протягом 4 годин при 30°C. В результаті виділення і очищення за допомогою тангенціальної фільтрації та аніонообмінної хроматографії вдалось отримати 6 мг очищеного рекомбінантного МOMP.

В статті [49] автори сконструювали вектор експресії pET101/D-ТОРО, який ввели в *E. coli* BL21 (DE3). Клітини вирощували при 37°C на LB середовищі зі 50 мкг/мл карбеніциліном. Індукували експресію рекомбінантного білка МOMP шляхом додавання 1,5 мМ IPTG при досягненні $OD_{600} = 0,7$ і культивують ще 4 годин. Концентрація розчинного білку становила 20 мг/л культурального середовища.

У праці [50] вчені намагались отримати рекомбінантний варіабельний домен антигену *C. trachomatis* - PorB / VD для створення ефективною субдиничної вакцини проти хламідіозу. Їм вдалось створити плазмиду pET17b, яку трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру інкубували при $t=37^\circ\text{C}$ з 5% насиченням CO_2 на LB середовищі з карбеніциліном 100 мкг/мл. При оптичній щільності $OD_{600} = 0,6-1,0$ в середовище вносять 0,2 мМ IPTG, в якості індуктора та вирощують клітини ще протягом 3-4 годин. Рекомбінантний PorB/VD експресувався у вигляді тілець включень.

Автори в [51] аналізували злитий білок СТН1, який забезпечує високий рівень захисту від генітального хламідійного ураження. Вчені створили плазмідну конструкцію рDEST17, яку трансформували в штам *E. coli* BL-21 AI. Останній культивували на LB середовищі за температури 37°C. При досягненні логарифмічної фази $OD_{600} = 0,5$ додають арабінозу з концентрацією 0,2%, в якості індуктора і культивують ще протягом 4 годин. Злитий білок СТН1 експресувався у вигляді тілець включень. За допомогою хроматографії та діалізу отримали 5 мг очищеного злитого СТН1.

Дослідники у своїй роботі [52] для синтезу внутрішньоклітинного білка DUF582 в якості субодиничної вакцини проти хламідіозу сконструювали вектор експресії рDEST15, який трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Клітини вирощували за температури 37°C на LB середовищі. При досягненні оптичної щільності $OD_{600} = 0,6$ вносять індуктор 1мМ IPTG. Рекombінантний білок DUF582 експресується у вигляді тілець включень.

**Біотехнологічні особливості отримання антигенів *Chlamydia trachomatis* та *Chlamydia muridarum* проти хламідіозу
(Chlamydia)**

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> K12 W25113	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок MOMP 30 кДа	білок зовнішньої мембрани	Культивування за t = 37°C та перемішуванні 250 об/хв протягом 12 годин і при OD ₆₀₀ = 0,5 вносять оптимально підібрану конц. індуктора - 0,4 мМ IPTG і культивують 4 години при 30°C	6*	Імуногенний <i>in vivo</i> на моделі мишей та викликає антитіла, які реагують на природний антиген	[48]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок MOMP 28 кДа	внутрішньо-клітинний розчинний білок	При досягненні OD ₆₀₀ = 0,7 за температури 37°C додають індуктор 1,5 мМ IPTG і культивують ще 4 години	20	При дослідженнях <i>in vivo</i> на кроликах взаємодіє з антитілами та індукує захисну імунну відповідь	[49]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок PorB / VD 37 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Інкубування за t = 37° і 5% насиченням CO ₂ , при досягненні OD ₆₀₀ = 0,6-1,0 в середовище вносять індуктор 0,2 мМ IPTG та вирощують клітини ще 3-4 години	-	Під час досліджень <i>in vivo</i> проявляє високу імуногенність та взаємодіє з антитілами, при цьому проясняється гуморальна відповідь	[50]
<i>E. coli</i> BL-21 AI	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок СТН1 50 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	При культивуванні за t = 37°C і досягненні OD ₆₀₀ = 0,5 вносять індуктор в якості 0,2% арабінози і вирощують культуру ще 4 години	5*	Індукує високоякісну захисну відповідь CD4 ⁺ Т-клітин та високий рівень СТН1-специфічних антитіл <i>in vivo</i>	[51]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	48 кДа 397 АК	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	При досягненні OD ₆₀₀ = 0,6 за температури 37°C вносять індуктор 1 мМ IPTG	-	Взаємодіє з поліклональними антитілами <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	[52]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини

2.5 Стафілококова інфекція

SEB (стафілококовий ентеротоксин B) - простий поверхневий білок та ClfA A-FnBPA - фібронектинзв'язуючий білок *Staphylococcus aureus*, які є його антигенами і спричиняють гостре харчове отруєння - стафілококову інфекцію, яка характеризується гнійними ураженнями шкіри (сепсис, фурункульоз, карбункули) з подальшим некрозом шкіри.

У своїй статті [53] автори намагались продемонструвати кандидата на вакцину проти *Staphylococcal enterotoxin B*. Їм вдалося створити плазмиду pET-28a, яку вводили в *E. coli* BL21 (DE3). Клітини вирощували на LB середовищі із селективним антибіотиком канаміцином при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Експресію білка індукували шляхом додавання 1,0 мМ IPTG при $\text{OD}_{600} = 0,6-1$ та культивували ще 3 години. Рекombінантні білки mSEB були позначені His N-кінці та очищені за допомогою колонки Ni-NTA афінної хроматографії. Концентрацію mSEB не визначали, проте білок отримали з молекулярною масою 28 кДа.

У дослідженні [54] *Agrawal* із колегами продемонстрували високу експресію рекombінантного SEB як потенційної субодиночної вакцини проти Стафілококу. Вони сконструювали вектор експресії pQE-30UA, яку експресували в *E. coli* SG13009. Культуру вирощували на LB середовищі з канаміцином при $t=37^{\circ}\text{C}$ та індукували 0,75 мМ IPTG при $\text{OD}_{600} = 0,4-0,5$ і культивують ще 5 годин. В результаті виділення і очищення за допомогою афінної хроматографії з використанням смол Ni – NTA вдалось отримати 92 мг очищеного рекombінантного rSEB з 1 л культуральної рідини.

Tiansen із співавторами в [55] експресували злитий білок ClfA A-FnBPA в прокаріотичній системі. Створений мини вектор pET-32a-ClfA A-FnBPA був введений в *E. coli* BL21 (DE3), яку вирощували на LB середовищі при $t=37^{\circ}\text{C}$ та вносили індуктор 1 мМ IPTG при $\text{OD}_{600} = 0,6$. Після виділення і очищення за допомогою афінною хроматографією на сефарозі вдалось отримати 14,9 мг очищеного ClfA A-FnBPA з 1 л культуральної рідини.

**Біотехнологічні особливості отримання антигенів *Staphylococcus aureus* проти стафілококової інфекції
(Staphylococcal disease)**

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок mSEB 28 кДа 240 АК	внутрішньо-клітинний	При культивуванні за температури 37°C та досягненні OD ₆₀₀ = 0,6-1 вносять індуктор 1,0 мМ IPTG і вирощують клітини ще 3 години	-	Взаємодіє <i>in vivo</i> з антитілами і володіє стійкою імуногеністю, включає повний захист і викликає як гуморальну, так і клітинну імунні відповіді	[53]
<i>E. coli</i> SG13009	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок rSEB 30 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Під час інкубації за t = 37°C додають 0,75 мМ IPTG при досягненні OD ₆₀₀ = 0,4-0,5 і культивують ще 5 годин	92*	Під час досліджень <i>in vivo</i> взаємодіє з моноклоальними антитілами	[54]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	злитий білок ClfA A-FnBPA 100 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	При вирощуванні клітин за температури 37°C та досягненні OD ₆₀₀ = 0,6 додають індуктор 1,0 мМ IPTG	14,9*	Демонструє чіткий імунопротекторний ефект <i>in vivo</i> на моделі мишей	[55]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини

Розділ 3. Біосинтез антигенів еукаріотичного походження в сучасних субодиничних вакцинах

3.1 Малярія

SE36, MSP-1-BBM, MSP-1 - поверхневі білки інвазивного мерозоїтового етапу життєвого циклу *Plasmodium falciparum*, які є його антигенами і здатні викликати важке інфекційне захворювання малярію, яка супроводжується перебігом небезпечних симптомів, таких як гарячка, гепатомегалія і анемія, що в результаті може призвести до смерті.

Вчені у своїй праці [56] аналізували рекомбінантний білок SE36 як ефективну і перспективну субодиничну вакцину проти малярії. Вони створили вектор експресії ET-SE36 і трансформували його в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру вирощували у LB середовищі за $t=37^{\circ}\text{C}$ і перемішуванні 200 об/хв. При концентрації клітин $6-12 \times 10^7$ кл/мл додавали індуктор IPTG 50 мкг/мл і культивували ще 3 години. Кількість виділеного та очищеного рекомбінантного SE36 становила 5 мг з 1 л культуральної рідини.

В дослідженні [57] науковці використали систему експресії найпростіших для синтезу рекомбінантного білка MSP-1-BBM в розробці ефективної субодиничної вакцини проти малярії. Культуру *Tetrahymena thermophila*, трансформовану вектором p22X, вирощували на SPP середовищі за температури $t = 30^{\circ}\text{C}$ і швидкості обертів 150-250 об/хв. Експресію рекомбінантного білку MSP-1-BBM індукували додаванням в середовище 5 мкг/мл хлорид кадмію після 17 годин культивування і в результаті отримали 0,5 мг очищеного MSP-1-BBM.

Cowan разом із колегами в [58] для експресії рекомбінантного білку MSP-1 проти малярії, створили вектор експресії pET24a, який трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Клітини інкубували на LB середовищі із 1% глюкозою за температури $t = 30^{\circ}\text{C}$. Після 4 годин культивування в середовище вносили індуктор 1 мМ IPTG. В результаті за допомогою аніоннообмінної хроматографії отримали 197 мг очищеного MSP-1 зі ступенем чистоти більше 97%.

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бондарчук В.І.				Розділ 3. Біосинтез антигенів еукаріотичного походження в сучасних субодиничних вакцинах	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							39	173
Керівник	Скряцька О.І.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П							

Біотехнологічні особливості отримання еукаріотичних антигенів *Plasmodium falciparum* проти малярії (Malaria)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	SE36 47 кДа 365 АК	гідрофобний внутрішньо-клітинний	Культивування за t=37°C і перемішуванні 200 об/хв, при досягненні концентрації клітин 6–12 × 10 ⁷ кл/мл вносять індуктор 50 мкг/мл 1мМ IPTG і культивують ще 3 години	5*	Здатний взаємодіяти з антитілами під час досліджень <i>in vivo</i> при цьому спостерігалась значна імуногенність	[56]
<i>T. thermophila</i>	декстроза - 20 дріжджовий екстракт – 10	MSP-1-BBM 60 кДа 498 АК	позаклітинний	Вирощування клітин за t = 30°C і перемішування 150-250 об/хв, після 17 годин культивування додають 5 мкг/мл хлориду кадмію в якості індуктора	0,5*	Ефективно взаємодіє з антитілами <i>in vivo</i> на мишах, так як при цьому спостерігалась сильна реакція антитіл проти природних антигенів паразитів, яка зумовлена імунізацією очищеною конструкцією	[57]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5; глюкоза - 10	MSP-1 55 кДа	розчинний внутрішньо-клітинний	Після 4 годин інкубації за температури 37°C на середовищі доповненому 1% глюкозою, вносили індуктор 1 мМ IPTG	197*	Взаємодіє з моно- і поліклональними антитілами <i>in vivo</i> та демонструє потужну імуногенність, а також є мішенню антитілозалежної активності інгібування клітинних паразитів <i>in vitro</i>	[58]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини

3.2 Лейшманіоз

LdNH36 - нуклеозидна гідролаза, LdSir2RP - білок NAD⁺-залежного регулятора активності деацетилази, Ldp45 - внутрішньоклітинний *Leishmania donovani* та KSAC - поліпротеїн *Leishmania infantum* роду *Leishmania*, які є їх антигеном і здатні викликати тяжке інфекційне зоонозне захворювання лейшманіоз, котре характеризується переважним ураженням внутрішніх органів (вісцеральний лейшманіоз) або слизових оболонок і шкіри (шкірний лейшманіоз).

Група вчених в [59] для синтезу рекомбінантного білку LdNH36 сконструювала плазмиду pET41, яку трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру вирощували на LB середовищі за наступних параметрів: $t=37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7,0$ поки значення оптичної щільності не стало $\text{OD}_{600} = 0,2$, після культуру вирощували за температури 30°C і до моменту досягнення $\text{OD}_{600} = 0,5-0,8$. Далі вносили індуктор 1 мМ IPTG для індукції експресії рекомбінантного LdNH36. В результаті виділення і очищення за допомогою іонообмінної хроматографії вдалось отримати 11 мг очищеного LdNH36 з 1 л культуральної рідини зі ступенем чистоти 99%.

Дослідники в [60] експресували рекомбінантний LdNH36 в метилотрофних дріжджах. Вони створили плазмиду LdNH36 / pPICZ α A, яку вводили в *P. pastoris* X-33 шляхом електропорації. Трансформовані клітини вирощували на BMGY середовищі з цеоцином і вирощують за температури $\pm 29^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5,0-6,0$ і перемішуванням 250 об/хв. При $\text{OD}_{600} = 0,14$ в середовище додають індуктор 0,5% метанол. Концентрація рекомбінантного білку LdNH36 становила 60 мг/л культуральної рідини, а в результаті виділення і очищення отримали 22 мг чистого LdNH36 з 1 л культурального середовища зі ступенем очищення 97%.

Baharia із колегами в [61] сконструювали плазмиду pET28a+LdSir2RP, яку транспортували в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру інкубували на LB середовищі що містить селективні антибіотики 34 мкг/мл левоміцетину і 35 мкг/мл канаміцину і вирощували при 37°C і перемішуванні 200 об/хв. При досягненні $\text{OD}_{600} = 0,5-0,6$ в середовище вносили індуктор 1 мМ IPTG та культивували ще 3

години. Рекombінантний білок LdSir2RP очищували на афінній хроматографії з використанням хелатуючої смоли Ni²⁺.

У статті [62] для отримання рекombінантного білка Ldp45 в якості субодиночної вакцини проти вісцерального лейшманіозу, створили вектор експресії pET-28a, який трансформували в *E. coli* C41 (DE3), яку вирощували на LB середовищі доповненому антибіотиком канаміцином 30 мкг/л за температури 37°C і перемішуванні 150 об/хв. Після 12 годин культивування при досягненні OD₆₀₀ = 0,6 в додають індуктор 1 мМ IPTG та культивують ще протягом 4 годин. Рекombінантний Ldp45 експресувався у вигляді тілець включень.

Автори в [63] намагались отримати рекombінантний поліпротеїн KSAC в прокаріотичній системі експресії. Вони створили конструкцію KSAC pET-29, яку трансформували в *E. coli* HMS174 (DE3). Культуру вирощували на середовищі 2YT, що містить 30 мкг/мл канаміцину за 37°C і перемішуванні 225 об/хв. При досягненні оптичної щільності OD₆₀₀ = 0,4-0,5 вносять 1 мМ IPTG в якості індуктора і культивують ще 3 години. За допомогою аніоннообмінної хроматографії вдалось отримати всього 0,95 мг очищеного рекombінантного білку KSAC.

Біотехнологічні особливості отримання еукаріотичних антигенів *Leishmania donovani* та *Leishmania infantum* проти лейшманіозу (Leishmaniasis)

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	фермент LdNH36 36 кДа	розчинний позаклітинний	Культивування за t=37°C та рН=7,0 до досягнення OD ₆₀₀ = 0,2, після після інкубують за 30°C і до моменту OD ₆₀₀ = 0,5-0,8 і вносять індуктор 1 мМ IPTG	11*	Під час досліджень <i>in vivo</i> крім клітинної імунної відповіді LdNH36 також викликає нейтралізуючу реакцію на основі антитіл	[59]
<i>P. pastoris</i> X-33	пептон – 20; дріжджовий екстракт – 10	фермент LdNH36 36 кДа	розчинний позаклітинний	Вирощування клітин за t=±29°C, рН=5,0-6,0 і перемішуванням 250 об/хв, при OD ₆₀₀ = 0,14 в середовище додають індуктор 0,5% метанол	60	Імунореактивний на сироватки анти-LdNH36 дикого типу, які генерували <i>in vivo</i> на моделі мишей	[60]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок LdSir2RP 45 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Інкубування культури за t=37°C та перемішуванні 250 об/хв, при досягненні OD ₆₀₀ = 0,5-0,8 додають індуктор 1 мМ IPTG	-	При дослідах <i>in vivo</i> індукує стійкий антигензв'язуючий титр IgG та високий рівень нейтралізуючих антитіл	[61]
<i>E. coli</i> C41 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	білок Ldp45 90 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Після 12 годин культивування за t=37°C та перемішуванні 150 об/хв при OD ₆₀₀ = 0,6 вносять індуктор 1 мМ IPTG і культивую ще 4 години	-	Здатний взаємодіяти з антитілами <i>in vivo</i> і викликати імунні відповідь на природний антиген та сприяє активації Т-клітин	[62]
<i>E. coli</i> HMS174 (DE3)	триптон – 16; дріжджовий екстракт – 10	білок KSAC 105 кДа	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Культивування при t=37°C та перемішуванні 225 об/хв, при OD ₆₀₀ = 0,4-0,5 вносять 1 мМ IPTG в якості індуктора і культивують ще 3 години	0,95	Індукує антиген-специфічні багатфункціональні клітини Th1 під час досліджень <i>in vivo</i>	[63]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту з 1 л культуральної рідини

3.3 Хвороба Шагаса

TSA-1, Tc80 - поверхневий білок та позаклітинний фермент *Trypanosoma cruzi* відповідно, які є його антигенами і здатні викликати небезпечне довговічне трансмісивне паразитарне інфекційне захворювання - хворобу Шагаса (американський трипаносомоз) при цьому утворюється шагома (фурункул) і розвиваються серйозні серцеві та шлунково-кишкові ураження.

Над створенням субодиночної вакцини на основі TSA-1 працювали автори в [64]. Їм вдалось створити вектор експресії pET41a, який трансформували в *E. coli* BL21 (DE3). Культуру вирощували на середовищі 2YT з додаванням канаміцину 50 мкг/мл за температури $t = 37^{\circ}\text{C}$ при швидкості перемішування 500 об/хв. Експресію рекомбінантного TSA-1 індукували 1 мМ IPTG при досягненні $\text{OD}_{600} = 0,6$ протягом 18 годин за температури 30°C . Рекомбінантний білок накопичувався у вигляді нерозчинних тілець включень і його концентрація становила 270 мг/л культуральної рідині.

В іншому дослідженні [65] вчені використовували Tc80 як основу субодиночної вакцини проти хвороби Шагаса. Амплікон Tc80 вони клонували у векторі експресії pET23a+, який трансформували в компетентні *E. coli* BL21 (DE3). Експресію рекомбінантного білку rTc80 індукували після 0,5 мМ IPTG після 18 годин культивування при 20°C і білок очищали агарозною смолою Ni²⁺-NTA. В результаті вдалось отримати всього 0,3 нг/мг очищеного рекомбінантного білку Tc80.

**Біотехнологічні особливості отримання еукаріотичних антигенів *Trypanosoma cruzi* проти хвороби Шагаса
(Chagas disease)**

Продуцент	Джерело вуглецю і азоту	Антиген	Локалізація	Особливості культивування	Конц. мг/л	Біологічна дія (взаємодія <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>)	Л-ра
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 16; дріжджовий екстракт – 10	білок TSA-1 85 кДа 587 АК	нерозчинні тільця включення в цитоплазмі	Культивування за 37°C та перемішуванні 500 об/хв, при досягненні OD ₆₀₀ = 0,6 в середовище вносять індуктор 1 мМ IPTG і культивують ще 18 годин при 30°C	270	Під час досліджень <i>in vivo</i> спостерігається взаємодія антигену з антитілами і у вакцинованих мишей, як правило, був більш високий рівень IgG	[64]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	триптон – 10; дріжджовий екстракт – 5	фермент Tc80 80 кДа	розчинний позаклітинний	Після 18 годин культивування за температури 20°C додають індуктор 0,5 мМ IPTG	0,3*	При дослідженні <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> взаємодіє антитілами при цьому вакциновані миші викликали сильний опосередкований клітинний імунітет, а клітини їх селезінки секретували цитокіни Th1 (IL-2, IFN-γ та TNF-α)	[65]

Примітка: * - концентрація очищеного рекомбінантного продукту в нг з 1 мл культуральної рідини

РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми субодиночної вакцини

4.1 Передумови виробництва ЛЗ

Віруси герпесу є основною причиною вірусних захворювань людини, поступаючись вірусам грипу та застуди. Інфекція вірусом простого герпесу II-типу, зазвичай, передається статевим шляхом або від матері до дитини під час народження і є основною причиною виразкової хвороби статевих органів та серйозною проблемою для здоров'я населення. Після первинного зараження статевих шляхів ВПГ-2 досягає латентного (прихованого) стану у нервовій системі і, тим самим, підтримує інфекцію протягом усього життя у людей. Даний вірус в латентному стані може назад реактивуватись в тому випадку, якщо імунна система організму людини слабшає, що призводить до повторних симптомів, таких як ураження статевих органів [6].

На сьогодні понад 500 мільйонів людей інфіковані ВПГ-2 у всьому світі у віці від 15 до 49 років, і вірус щорічно викликає 23 мільйони нових інфекцій. У пацієнтів з ослабленим імунітетом інфекція ВПГ-2 може призвести до важкої та часто смертельної інфекції центральної нервової системи. Інфекція ВПГ-2 збільшує ризик зараження ВІЛ-1 у три-чотири рази, який у свою чергу представляє додаткову ще більшу загрозу для населення. Жінки з активною формою вірусу герпесу важче переносять пологи та мають вищий шанс викидню.

До цього часу не існує ефективної вакцини чи ліків які б змогли знищити вірус герпесу у організмі людини повністю. Наразі є лише ліки, що зменшують прояв активної форми вірусу та лікують видимі прояви зараження. В той час як полімеразна ланцюгова реакції є переважним методом підтвердження ВПГ-2 інфекції у пацієнтів [18].

Оскільки противірусна терапія ВПГ-2 не може повністю запобігти рецидивам захворювання або знищити прихований вірус, створення ефективної субодиночної вакцини буде найкращим засобом для зменшення захворюваності,

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	Бондарчук В.І.				Розділ 4. Техніко-економічне обґрунтування випуску субстанції для лікарського засобу та виробництва готової форми субодиночної вакцини	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							46	173
<i>Керівник</i>	Скороцька О.І.					Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>	Стабніков В.П							

пов'язаної з ВПГ-2. Окрім цього паралельно також необхідно розширювати асортимент ліків та поглиблювати вивчення механізму протидії та знищення вірусу простого герпесу II-типу.

4.2 Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання

Глікопротеїн gD вірусу простого герпесу II типу – найпоширеніший глікопротеїн на поверхні віріонів та інфікованих вірусом клітин, який використовується як антиген у різних протигерпетичних субодиничних вакцинах завдяки своїй участі у зв'язуванні рецепторів чутливих клітин. Оболонка глікопротеїну D (gD) ВПГ-2 відіграє важливу роль у проникненні вірусу в клітини господаря. Як результат, gD є основною мішенню нейтралізуючих антитіл, а також є мішенню для залежної від антитіл клітинної цитотоксичності, CD4 Т-клітин і CD8 Т-клітин [18].

Таким чином gD використовують як ключовий імуноген у більшості субодиничних вакцин, як окрему молекулу, або ж один із компонентів комбінованих рецептур інших глікопротеїнів, що беруть участь у проникненні вірусу герпесу у клітину.

Профілактична вакцина-кандидат на основі субодиниці глікопротеїну D HSV-2 (gD2-AS04), що містить гідроксид алюмінію і 3-О-деацильованої монофосфорилліпід А (MPL) в якості ад'юванта (AS04), була розроблена GlaxoSmithKline Vaccines.

Результати клінічних випробувань показали, що вакцина-кандидат викликає зв'язуючі та нейтралізуючі антитіла проти ВПГ-2, а також специфічні для вірусу простого герпесу клітинні імунні відповіді як у чоловіків, так і у жінок. На основі цих багатообіцяючих результатів імуногенності та прийняттого профілю безпеки були проведені дослідження для оцінки ефективності gD2-AS04, що містить 20 мкг усіченого глікопротеїну D із штаму G HSV-2 (gD-2t).

У цих дослідженнях, проведених на особах, у партнерів яких проводили рецидив захворювання статевих органів ВПГ, вакцинація gD2-AS04 призвела до >70% зменшення захворювань статевих органів на ВПГ та до 40% зменшення інфекції на ВПГ. Ці результати імуногенності узгоджуються з результатами,

отриманими в ряді інших клінічних досліджень, призначених для перевірки ефективності, імуногенності та безпеки вакцини gD2-AS04, що містить 20 мкг gD-2t.

На основі дослідження діапазону доз було оптимізовано вакцинний склад, що містить 20 мкг антигену gD-2t, і який був обраний для подальшої розробки, оскільки він викликав гуморальні та клітинно-опосередковані імунні відповіді, котрі можна було порівняти з відповідями, що спостерігаються за використання вакцинних препаратів, які містять більш високі дози антигену (40 або 80 мкг антигену gD-2t). Ніякого дозозалежного збільшення імунної відповіді не спостерігалось [66].

4.3 Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку

Спроби розробки вакцини проти ВПГ були зроблені ще в 1930 році. Серед них були як *профілактичні вакцини*, які запобігають зараженню ВПГ-2 інфекцією і/або допускають розвиток захворювання, в той час як *терапевтичні вакцини* мінімізують тяжкість захворювання і/або запобігають рецидиву ВПГ-2 у вже інфікованих осіб.

Експерти по-різному оцінюють ринок вакцин. Частина з них схиляється до цифри в 12-15 млрд. дол., причому 1% припадає на частку російського ринку. На даний час протигерпетична вакцина «Вітагерпавак» (Москва) вперше розроблена в Росії (у світовій практиці подібного роду вакцин немає), являє собою ліофілізований інактивований антиген вірусу простого герпесу 1 і 2 типів, вирощеного на перещеплювальній лінії клітин нирок зеленої мавпи - Vero B, дозволених ВООЗ в якості субстрату для виробництва вірусних вакцин. За внутрішньошкірного введення виявляє високу ефективність специфічної профілактики рецидивів ВПГ [1].

Ринок вакцин є одним з найпривабливіших і швидкозростаючих сегментів світового фармацевтичного ринку. Довгий час до вакцин ставилися як до необхідної, але малоперспективною з точки зору прибутку продукції. Це ставлення змінилося з появою цілої низки успішних продуктів - вакцин проти вірусу папіломи людини, протигрипозних вакцин і т.д. Зростання інтересу до розробки і створення нових вакцин викликав суттєвий приплив інвестицій в

науково-дослідну діяльність, що не забарилося позначитися на подальшому розвитку ринку.

Провідні позиції на світовому ринку вакцин займають компанії GlaxoSmithKline, Sanofi, Merck, Pfizer, Novartis AG, Baxter International та інші. Найбільшим ринком вакцин є США, на частку яких припадає понад 50% світового ринку вакцин. Основна частина вакцин, що входять до Національного календаря профілактичних щеплень, проводиться на заводах ФГУП «НВО «Мікроген» (Росія). Має певну частку в Національному календарі профілактичних щеплень та інший ведучий учасник ринку вакцин - «С.-Петербурзький науково-дослідний інститут вакцин і сироваток та підприємство по виробництву бактерійних препаратів" ФМБА Росії, що спеціалізується на випуску вакцин проти грипу і герпесу [67].

4.4 Вибір форми випуску лікарського засобу

Вакцини - це імунобіологічні лікарські засоби, які відносяться до стерильних парентеральних засобів. Дана субодична вакцина, на основі глікопротеїну D проти ВПГ-2, планується випускатись у вигляді розчину для внутрішньом'язевої ін'єкції (у дельтоподібний м'яз), як оптимальної форми, зважаючи на те, що даний лікарський засіб потребує точного дозування, відсутність домішок та досягнення найбільшого імунологічного ефекту [3].

Не зважаючи на те, що лікарська форма у вигляді розчину для ін'єкцій має ряд недоліків: пошкодження цілісності шкірного покриву, психологічний фактор (болючість під час введення) та здійснення маніпуляції кваліфікованим фахівцем, проте існує значний ряд переваг, серед яких [68]:

- точність та зручність дозування лікарського засобу;
- повна біологічна доступність;
- відсутність впливу секретів ШКТ і ферментів печінки, котрий спостерігається при внутрішньому вживанні ліків;
- можливість проведення лікування у людей, які перебувають без свідомості або дуже ослаблені;
- можливість створення великих запасів стерильних препаратів, що значно полегшує і прискорює їх відпускання.

4.5 Опис лікарського засобу згідно АНД

(проект АНД на субодиночну вакцину проти ВПГ-2)

Основні фізико-хімічні властивості. Гомогенна, легко опалесцентна суспензія білого кольору, при відстоюванні розділяється на 2 шари: верхній - прозора безбарвна рідина; нижній - білий осад, який легко розбивається при струшуванні. Вакцина для профілактики вірусу простого герпесу II-типу (генітального), рекомбінантна - стерильна суспензія, що містить очищений основний поверхневий антиген вірусу (глікопротеїн D), одержаний за допомогою технології експресії цільового продукту в рекомбінантних продуцентах. Вакцина проходить високий ступінь очищення і відповідає вимогам ВООЗ для рекомбінантних вакцин проти генітального герпесу. Для її виробництва не використовуються субстанції людського походження.

Склад. Доза вакцини (1,0 мл) містить: *діюча речовина* - 20 мкг HSV-2 gD; *допоміжні речовини* - алюмінію гідроксид, натрію хлорид, натрію гідрофосфату дигідрат, натрію дигідрофосфату дигідрат, вода для ін'єкцій.

Форма випуску. Суспензія для ін'єкцій внутрішньом'язевого введення.

Фармакологічна група.

Лікарські засоби, що коригують процеси імунітету.

Лікарські засоби, що стимулюють процеси імунітету.

Фармакотерапевтична група. Противірусні вакцини. Очищений антиген вірусу простого герпесу II-типу (генітального). Код АТХ: J07ВХ.

Фармакологічні властивості. Препарат містить рекомбінантний глікопротеїн D - найпоширеніший глікопротеїн на поверхні віріонів та інфікованих вірусом клітин, який використовується як антиген (ключовий імуноген) у різних протигерпетичних субодиночних вакцинах завдяки своїй участі у зв'язуванні рецепторів чутливих клітин. Оболонка глікопротеїну D (gD) ВПГ-2 відіграє важливу роль у проникненні вірусу в клітини господаря. Як результат, gD є основною мішенню нейтралізуючих антитіл, а також є мішенню для залежної від антитіл клітинної цитотоксичності, CD₄⁺ Т-клітин і CD₈⁺ Т-клітин. Субстанція стимулює утворення специфічних гуморальних антитіл проти глікопротеїну D (основного поверхневого антигену вірусу простого

герпесу II-типу) і як результат стимуляція організму до вироблення клітинного імунітету, а також зниженість вираженості симптомів генітального герпесу, тривалість ремісії, уникнення повторних рецидивів. Ад'ювант в якості гідроксиду алюмінію чинить стимулюючу антигенну активність та створює «депо» антигену в організмі, разом з яким сприяють неспецифічній стимулювальній дії на імуногенез.

Фармакокінетика. Не застосовується.

Показання для застосування. Препарат призначений для попередження загострення герпетичної інфекції, активна імунізація з метою специфічної профілактика рецидивів генітальної герпетичної інфекції, а також пацієнтам, у яких загострення хронічних інфекцій, викликаний вірусами *Herpesviridae*, досягає трьох і більше разів протягом одного року. Ефективний при герпесі, викликаному вірусом II-типу. Препарат рекомендується вводити людям без симптомів герпесу, але з високим титром антитіл до *Herpes simplex II type*. Дана субодинична вакцина показана для людей похилого віку та ВІЛ-інфікованим пацієнтам (I і II стадії).

У зонах з середньою чи високою частотою захворюваності на генітальний герпес, де існує ризик інфікування для більшої частини населення, вакцинацію необхідно проводити всім новонародженим, дітям та підліткам.

Спосіб застосування та дози. Маніпуляцію проводять в лікувально-оздоровчих закладах за призначенням і під контролем лікаря. Доза 20 мкг (1,0 мл) рекомендується використовувати з метою імунопрофілактики, шляхом введення 2 доз вакцини з інтервалом у 6 місяців. Перед застосуванням препарату флакон з вакциною збовтують до однорідності суспензії білого кольору і витримують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Препарат вводять внутрішньом'язово в разовій дозі 1,0 мл у ділянку дельтоподібного м'яза дорослим та дітям або у передньобоківу ділянку стегна новонародженим, немовлятам та дітям молодшого віку. Як виняток пацієнтам з тромбоцитопенією чи іншими порушеннями згортання крові вакцину можна вводити підшкірно. Препарат не слід вводити в ділянку сідниць або внутрішньошкірно, оскільки це

може призвести до зниження імунної відповіді, так як це рекомбінантна білкова субстанція.

Побічна дія. Після введення вакцини в окремих осіб можуть розвиватися місцеві і загальні реакції.

Місцева реакція: виявляється гіперемією шкіри діаметром до 2 см протягом першої доби і слабке короточасне печіння та почервоніння в місці ін'єкції, можлива тимчасова скутість і болючість м'язів.

Загальна реакція: може виражатися в незначному підвищенні температури (не вище 37,5°C), слабкості, втомі та головному болю, що проходять без лікування.

При виникненні більш виражених місцевих і загальних реакцій або розвитку загострення рецидиву герпетичної інфекції, введення препарату слід припинити. Вакцинація може бути продовжена через 14 днів після повного зникнення клінічних проявів герпетичної інфекції і загальної реакції на введення вакцини.

Протипоказання. 1. Герпетична інфекція в активній стадії (рецидив). Введення препарату проводять не раніше, ніж через 14 днів після зникнення клінічних проявів. 2. Гострі інфекційні та неінфекційні захворювання. Введення препарату не раніше, ніж через 30 днів після одужання. 3. Хронічні захворювання в стадії загострення або декомпенсації. 4. Злоякісні новоутворення. 5. Вагітність. 6. Пацієнтам з гострими захворюваннями, що супроводжуються лихоманкою, слід відкласти. Введення препарату проводять через 1 місяць після одужання (ремісії).

При неважких ГРВІ, гострих кишкових захворюваннях і інших інфекційних захворюваннях, що протікають в легкій формі, вакцинацію проводять відразу після нормалізації температури.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами. Випадків несумісності з іншими лікарськими засобами не виявлено.

Особливості застосування. Неприпустиме змішування в одній ємкості з іншими медикаментами. Препарат не буде запобігати іншим герпетичним інфекціям, окрім генітального герпесу. Вакцинацію проводять в стадії ремісії, не

раніше, ніж через 5 днів після повного зникнення клінічних проявів герпетичної інфекції. Як і для всіх вакцинних субстанцій, відповідна медична допомога та нагляд завжди повинні бути легкодоступними у разі виникнення рідких анафілактичних реакцій після введення даного препарату. Тому пацієнти повинні бути під медичним наглядом не менше 30 хвилин після маніпуляції даним препаратом.

Умови та термін зберігання. Зберігати у сухому, захищеному від світла місці при температурі від +2 до +8°C. Термін придатності – 36 місяців. Не застосовувати після закінчення терміну придатності, зазначеного на упаковці. Датою закінчення терміну придатності є останній день місяця, зазначеного на упаковці. Не заморожувати. Зберігати у місцях, недоступних для дітей. При правильному зберіганні вміст має бути білого кольору із прозорим супернатантом. При одноразовому збовтуванні вакцина стає злегка мутною.

Умови транспортування. Транспортувати при температурі від +2 до +8°C у сухому та захищеному від світла місці. Не заморожувати. Допускається короткочасне (до 72 год) транспортування при температурі до 34°C.

Умови відпуску. Пачки, що містять 2 флакони (по 1,0 мл) відпускаються за рецептом. Пачки, що містять по 20 флаконів (по 1,0 мл) - призначені для лікувально-профілактичних установ.

Маркування. На етикетці-самоклеїці, яку наносять на флакони, зазначають: назву лікарського засобу; штриховий код; інформацію, що ідентифікує кінцеву серію; дозу, що рекомендується для застосування людиною та вміст діючої речовини в ній; шлях введення імунобіологічного препарату; умови зберігання; термін придатності; назву та кількість усіх антимікробних консервантів; назви всіх антибіотиків, ад'ювантів, барвників або стабілізаторів, що входять до складу вакцини.

На пачці (картонна упаковка) вказують назву препарату латинською та українською або латинською, українською та російською мовами, реєстраційний номер, номер серії, термін придатності, штриховий код або 2D кодування (QR код); виробника; дозу, що рекомендується для застосування людиною та вміст діючої речовини в ній; назву та кількість усіх антимікробних консервантів; назви

всіх антибіотиків, ад'ювантів, барвників або стабілізаторів, що входять до складу вакцини; кількість флаконів в упаковці, шлях введення імунобіологічного препарату; умови зберігання; особливі помітки: тип вакцини - білкова субодична, назви всіх компонентів, здатних викликати несприятливу дію, і будь-які протипоказання щодо застосування вакцини; «Застосовувати за призначенням лікаря», «Зберігати в недоступному для дітей місці».

Упаковка. Субодична вакцина проти генітального герпесу випускається у скляних флаконах які вироблені з нейтрального скла типу І, що відповідає вимогам Європейської Фармакопеї, які закупорені пробкою із синтетичної бутилової гуми, обтиснуті алюмінієвими ковпачками під обкатку, забезпеченими захисними пластиковими кришечками, які знімаються.

Для відпуску за рецептом: по 2 флакони (по 1,0 мл) в чарунковій упаковці в картонній пачці з інструкцією із застосування.

Для лікувально-профілактичних установ: по 20 флаконів (по 1,0 мл) у шоубокс (картонна пачка з роздільними ячейками) разом з двома інструкціями із застосування.

Таблиця 4.1

СПЕЦИФІКАЦІЯ на рекомбінантний глікопротеїн D

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Опис	Гомогенна, легко опалесцентна суспензія білого кольору (при відстоюванні розділяється на два шари, які вертаються у вихідне положення після струшування)	За п.1, візуально
Ідентифікація антигену по молекулярній масі	53 кДа	За п.2
Прозорість і ступінь каламутності	Однорідна суспензія вакцини, яка утворюється при збовтуванні не повинна розшаровуватись протягом 5 хвилин і вільно проходити в шприц через голку №0840. При цьому ступенем каламутності не має перевищувати еталон І	За п.3, ДФУ, 2.2.1
Кольоровість	Розчин має бути майже безбарвним з легким білим відтінком	За п.4, ДФУ 2.2.2, II метод
pH	Від 7,2 до 7,4	За п.5, ДФУ 2.2.3
Кількісне визначення білку (глікопротеїну D), мкг/мл	20	За п.6, ДФУ 2.5.33, 3 метод Бредфорда

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
Ад'ювант (алюміній) мкг/мл	20	За п.7, ДФУ 2.5.13
Стерильність	Має бути стерильним	За п.8, ДФУ 2.6.1
Бактеріальні ендотоксини	< 20 EU/мл	За п.9, ДФУ 2.6.14, хромогенний метод
Механічні включення	Мають бути відсутні	За п.10, ДФУ 2.9.19
Аномальна токсичність	Має бути не токсичним (атоксичний)	За п.11, ДФУ 2.6.9
Специфічна активність (відносна <i>in vitro/in vivo</i>)	Активує продукцію протизапальних (Th1) цитокінів, а саме: IL-1 α , IL-2, TNF- α та IFN- γ	За п.12, ДФУ 2.7.1
Номінальний об'єм	Не менше 1,0 мл (одна доза)	
Маркування та пакування	На етикетці, яку наносять на флакон, вказують: назву препарату, рекомендована доза і кількість антигену та допоміжні речовини, шлях введення, термін та умови зберігання, штриховий код. На пачці (картонній упаковці) вказують: назву препарату (на українській та латинській мовах) виробника, рекомендована доза і кількість антигену та допоміжні речовини, шлях введення, особливі помітки, термін та умови зберігання, штриховий або 2D код. По 2, 20 флаконів у шоу-бокс (картонна пачка з роздільними ячейками) з інструкціями із застосування.	
Зберігання та транспортування	Зберігати у сухому, захищеному від світла місці при температурі від +2°C до +8°C. Не заморожувати. Допускається короткочасне (до 72 год) транспортування при температурі до 34°C.	
Термін придатності	36 місяців (3 роки)	

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Гомогенна, легко опалесцентна суспензія з білуватим віддінком без видимих механічних включень. При відстоюванні розділяється на два шари, які вертаються у вихідне положення після струшування.

2. Ідентифікація антигену по молекулярній масі. Для підтвердження наявності очищеного білку gD, як гетерологічного білка в лізаті аналізують методом електрофорезу білків у поліакриламідному гелі із додаванням додецилсульфату натрію (SDS PAGE) та подальшим вестерн-блотингом з використанням анти-6xHis-tag антитіл.

Методика проведення електрофорезу: 5 мг висушеного порошку змішують з 2,5 мл буферного розчину 4X LDS і нагрівають до 70°C протягом

10 хв. Суміш переносили в спеціальні кювети з поліакриламідним гелем NuPAGE Novex 12% Bis-Tris. Потім додають 5 мл попередньо забарвлених стандартів SDS PAGE (Bio-Rad). Електрофорез проводили при кімнатній температурі протягом 45 хв. Глікопротеїн D має молекулярну масу 53 кДа, що буде відповідати розміщенню біля відповідного стандарту.

Методика проведення вестрн-блотингу: Білкові смуги з молекулярною масою 53 кДа розділені у SDS-PAGE, переносили на нітроцелюлозну мембрану (NC) для вестерн-блотингу. Мембрану NC блокували 5% BSA в PBS та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі з подальшим одноразовим промиванням PBS, що містить 0,05% Tween-20 (PBST). Далі 10 мл первинного антитіла проти 6xHis-tag при розведенні 1:20 000 в PBST додавали до заблокованої NC-мембрани та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі при повільному перемішуванні. Мембрану тричі промивали PBST, а потім інкубували з 10 мл вторинного антитіла при розведенні 1:180 000 в PBST протягом ще 1 години. Після триразової промивання PBST, 10 мл готового до використання розчину субстрату ТМВ (3,3', 5,5' тетраметилбензидин) додавали до NC-мембрани та інкубували в темній кімнаті протягом 20 хв до візуалізації (появи) бажаних смуг з молекулярною масою 53 кДа [6].

3. Прозорість і ступінь каламутності (ДФУ, 2.2.1). Для проведення даного контролю беруть дві однакові пробірки з плоским дном з прозорого скла, з внутрішнім діаметром 15-25 мм. Одну з пробірок заповнюють збовтаною випробуваною рідиною (вакциною) на висоту шару приблизно 40 мм, а іншу заповнюють водою для ін'єкцій на таку саму висоту. Зразки переглядають при розсіяному денному світлі вздовж вертикальної осі пробірок на чорному фоні. Досліджуваний розчин має не розшаровуватись протягом 5 хв та витримувати порівняння з водою для ін'єкцій та повинен бути прозорий з білуватим відтінком, а по ступеню каламутності не повинен перевищувати еталонний розчин I.

4. Кольоровість (ДФУ 2.2.2., II метод). Для проведення даного контролю беруть дві однакові пробірки з плоским дном з прозорого скла, з внутрішнім діаметром 15-25 мм. Одну з пробірок заповнюють збовтаною випробуваною

рідиною (вакциною) на висоту шару приблизно 40 мм, а іншу заповнюють водою для ін'єкцій на таку саму висоту. Порівняння забарвлення проводять у розсіяному денному світлі, переглядаючи зразки вздовж вертикальної осі пробірок на білому фоні. Розчин вважають безбарвним, якщо він витримує порівняння з водою Р чи розчинником, або забарвлений не більш інтенсивно, ніж еталон В₉. В даному випадку з легким білим відтінком.

5. рН (ДФУ 2.2.3). Усі виміри проводять при за температури в інтервалі від 20°C до 25°C. Для виміру значення рН використовують 10% водний розчин препарату. Проводять потенціометрично.

6. Кількісне визначення білку мкг/мл (ДФУ 2.5.33, 3 метод Бредфорда). Даний метод заснований на зсуві максимуму поглинання оптичної щільності барвника кислотного синього 90 (Кумассі діамантовий синій R-250) від 470 нм до 595 нм, що спостерігається внаслідок зв'язування білка з барвником. Для приготування всіх буферних розчинів і реактивів, вживаних у даному методі, використовують воду дистильовану Р. До 1 дози (1,0 мл) кожного розчину порівняння (стандартний зразок виробовуваної вакцини 1 мл на 10 мл буферного розчину (8 М сечовина, 50 мМ Тріс -HCl, 50 мМ NaCl, рН 7,0)) [6], випробовуваного розчину (збовтаної вакцини) і контрольного розчину (буфер 8 М сечовина, 50 мМ Тріс -HCl, 50 мМ NaCl, рН 7,0) додають 5 мл реактиву кислотного синього 90. Перемішують, перевертаючи, уникаючи спінення, що призводить до поганої відтворюваності. Після 10 хв витримки за кімнатної температури вимірюють оптичну щільність стандартних розчинів і випробовуваного розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 595 нм, використовуючи контрольний розчин в якості розчину порівняння. Не використовують кварцові (кремнію діоксид) спектрофотометричні кювети, оскільки фарбник взаємодіє з цим матеріалом. Будується графік залежності оптичної густини розчинів порівняння від концентрацій білка в розчині і, використовуючи лінійну регресію, визначають стандартну криву. На підставі калібрувальної кривої і оптичної щільності випробовуваного розчину визначають концентрацію білка в випробовуваному розчині.

7. Ад'ювант (алюміній) мкг/мл (ДФУ 2.5.13). Випробувану дозу вакцини (1,0 мл), поміщають у колбу для спалювання місткістю 50 мл. Додають 1 мл кислоти сірчаної Р, 0,1 мл кислоти азотної Р і декілька скляних кульок. Розчин нагрівають до появи насиченої пари білого кольору і продовжують кип'ятити до зникнення забарвлення. Охолоджують, додають 0,05 мл розчину метиленового оранжевого Р і нейтралізують розчином натрію гідроксиду концентрованим Р у кількості 6,5-7 мл. Розчин переносять у конічну колбу об'ємом 250 мл, промиваючи колбу для спалювання 25 мл води Р. Додають 25 мл 0,02 М розчину натрію едетату, 10 мл ацетатного буферного розчину рН 4,4 Р і декілька скляних кульок і обережно кип'ятять протягом 3 хв. Додають 0,1 мл розчину піридилазонафтолу Р і титрують гарячий розчин 0,02 М розчином міді сульфату до зміни забарвлення на багряно-коричневе.

Паралельно проводять контрольний дослід: 1 мл 0,02 М розчину натрію едетату відповідає 0,5396 мг Al.

8. Стерильність (ДФУ 2.6.1). Зразок вакцини в кількості 1 доза (1,0 мл) поміщають у мірний флакон місткістю 250 см³, доводять до 100 см³ (розведення 1:10) буферним розчином з хлоридом натрію і пептоном, рН 7,0 та перемішують до отримання суміші. Для визначення загальної кількості бактерій по 1 см³ суміші висівають не менш як на дві чашки Петрі на поживне середовище №1 (МПА). Для визначення загальної кількості грибів по 1 см³ зависі висівають не менш ніж на дві чашки Петрі на поживне середовище №2 (Сабуро). Посіви на середовищі №1 інкубують у термостаті при температурі 37°C для виявлення бактерій, а посіви із середовищем №2 - за температури 20-25°C для виявлення грибів протягом 5 діб. Порції живильних середовищ інкубують протягом 14 діб. Після закінчення періоду інкубації не має спостерігатися ріст мікроорганізмів.

9. Бактеріальні ендотоксини (ДФУ 2.6.14). Для отримання поверхневого антигену (рекомбінантного глікопротеїну D) використовували прокаріотичну систему експресії [6], тому обов'язковим є аналіз на наявність бактеріальних ендотоксинів у вакцинній субстанції. Використовують хромогенний метод, який заснований на появі забарвлення після розщеплення синтетичного пептид-

хромогенного комплексу. Аналіз виконували з використанням набору для тестування ендотоксину (Thermo Scientific) відповідно до протоколу, наданим виробником. Для проведення дослідження використовували 50 мкл кожного з випробуваних і розбавлених стандартних зразків ендотоксину в діапазоні 0,1-1,0 одиниць ендотоксину (ЕС)/мл додавали в лунки 96-ямкового мікропланшетів (в двох примірниках), попередньо врівноважених при 37°C. Потім в кожен лунку додавали 50 мкл реагенту LAL і інкубували точно 10 хв при 37°C. Далі в кожен лунку додавали 100 мкл розчину хромогенного субстрату і інкубували точно 6 хв при 37°C. Через 6 хвилин в кожен лунку додавали 100 мкл стоп-реагенту (25% оцтової кислоти) і реєстрували оптичну щільність при 405 нм за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів (Multiskan GO, Thermo Scientific). Підтримувалася постійна швидкість піпетування і порядок додавання реагентів в лунки, особливо на останніх двох етапах, для досягнення однакового часу інкубації в кожній лунці. Стандартний графік одиниць абсорбції в порівнянні з одиницями ендотоксину для стандартних ендотоксинів був побудований і згодом використаний для визначення концентрацій в досліджуваних зразках, відповідних їх значенням/одиницям абсорбції. Один EU еквівалентний 100 пг бактеріального ендотоксину/мл розчину. Для рекомбінантної субодиночної вакцини дозволений для імунізації тварин рівень ендотоксину рекомендується складати <20 EU / мл.

10. Механічні включення (ДФУ 2.9.19). Використовують прилад, заснований на принципі світлоблокування, який автоматично дозволяє вимірювати кількість і розмір часток. Відбирають 4 проби, не менше 5 мл кожна, і визначають наявність механічних включень у вигляді часток із розмірами 10-25 мкм. Препарат витримує випробування, якщо в ньому відсутні невидимі механічні включення.

11. Аномальна токсичність (ДФУ 2.6.9). Тест-доза 20 мкг (суми активних речовин) розчинена в 0,5 мл води для ін'єкцій на одну мишу. Вводити внутрішньовенно впродовж 15 с. Термін спостереження 24 год. Якщо більше ніж одна тварина гине - зразок не проходить випробування. У цьому випадку цю серію препарату бракують.

12. Специфічна активність (відносна *in vitro*) (ДФУ 2.7.1). Визначення проводять згідно специфікації або статті. Антитіла до поверхневого антигену - глікопротеїну D вірусу простого герпесу II-типу (генітального герпесу).

Для дослідження специфічної активності використовували мишей лінії C57BL/6 або «чорні миші» віком від 5 до 6 тижнів. Імунізацію здійснювали на 0 та на 14й і 28й дні (бустерні дози) внутрішньом'язово по 20 мкг вакцинним антигеном загального об'єму по 100 мкл. На 45-й день здійснювали аналіз.

Виділені селезінки в асептичних умовах промивали холодним PBS і обережно прикладали до пари стерильних предметних матових скелець, щоб витіснити клітинну масу в середовищі RPMI 1640. Отриману суспензію спленоцитів промивали в PBS і клітини збирали центрифугуванням при $200\times g$ протягом 5 хв при $4^{\circ}C$. Отриману гранулу ресуспендували в буфері для лізису еритроцитів (155 мМ NH_4Cl , 12 мМ $NaHCO_3$, і 0,1 мМ EDTA) та інкубували протягом 10 хв на льоду, а клітини збирали центрифугуванням при $200\times g$ протягом 5 хв при $4^{\circ}C$. Після цього гранули клітин промивали в середовищі RPMI 1640 і нарешті ресуспендували в 2 мл того ж середовища з 10% плодової телячої сироватки. Для підрахунку життєздатних клітин розбавлену суспензію клітин змішували з 0,4% трипановим синім у співвідношенні 1: 1, а потім суміш завантажували на гемоцитометр, де клітини підраховували під мікроскопом. Кінцева кількість спленоцитів була відрегульована до $1,0\times 10^6$ клітин/мл. У 24-лункові планшети додавали по 1 мл суспензії спленоцитів у середовище RPMI 1640 доповнене 10% сироваткою та 20 мкг/мл тестового антигену C2 або антигену позитивного контролю [5 мкг / мл конканаваліну А (Con A)] в 24-лункові планшети для культури клітин та інкубували в інкубаторі з 5% CO_2 за температури $37^{\circ}C$ протягом 72 годин. Клітинні супернатанти збирали через 36 та 72 год центрифугуванням при $5000\times g$ при $4^{\circ}C$ протягом 10 хв і зберігали при $-80^{\circ}C$ для аналізу на цитокіни.

Специфічну цитокін-активність визначали за використанням наборів ELISA Thermo Scientific при кімнатній температурі у двох примірниках згідно з інструкцією виробника і за використання CTL ImmunoSpot аналізатора та MilliPlex kit згідно ти же інструкцій виробника.

До цього ж, дослідження даної вакцинної субстанції проти ВПГ-2 gD у морських свинок показало генерацію титру антитіл до 25000 і продемонструвало сильну кореляцію між титром антитіл та захистом від генітальної інфекції [6].

4.6 Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік

Майже 90% населення світу заражені вірусом простого герпесу II-го типу, але при цьому не мають видимих проявів хвороби, так як вірус в основному перебуває в організмі в латентному стані [18].

Проте розрахунки річної потреби потужності виробництва готового ЛЗ будемо проводити для населення України. Згідно офіційних статистичних даних населення України станом на 1 січня 2021 року становить 41,6 млн людей [69].

Високий рівень інфікованих осіб (до 95 %) і хворих дають підстави стверджувати про епідемічне поширення вірусу генітального герпесу (ГГ) серед населення Земної кулі.

До початку нашого сторіччя кількість випадків зареєстрованого ГГ у світі значно зросла, у порівнянні з показниками для 80-х років минулого століття. Для країн Європи, куди входить Україна цей показник становить 7% населення, в яке входять люди, що хворіють на відкриту форму вірусу простого герпесу II-го типу так і на латентну форму і при цьому можуть бути носіями самі того не підозрюючи. Разом з цим частота виявлення цього захворювання значно варіює залежно від низки чинників (віку, характеру сексуального життя, соціально-культурного рівня пацієнтів тощо) [3].

Відповідно кількість хворих, зареєстрованих щорічно на генітальний герпес в Україні становитиме: $(41\,600\,000 \text{ людей} \times 7\%) / 100 = 2\,912\,000$ реєструється хворих людей на вірус простого герпесу II-го типу в Україні щорічно.

Зважаючи на те, що на ринку України представлено лише два офіційно зареєстрованих вакцинних препарати проти генітального герпесу, які є певною мірою дієві, тоді потреба даної інноваційної субодиничної вакцини для населення України становитиме 30%. З цього випливає, що нам необхідно отримати таку кількість вакцинного антигену за допомогою культивування мікроорганізмів:

$(2\,912\,000 \times 30\%) / 100 = 873\,600$ людей, які купуватимуть наш вакцинний препарат на основі рекомбінантного глікопротеїну D.

Так як новостворена субодична вакцина знаходиться ще на стадії клінічних досліджень, то курс вакцинації приймемо, котрий зазначений на період дослідження. Курс вакцинації для однієї людини передбачає використання 1 мл суспензії, яка містить 20 мкг вакцинного антигену - рекомбінантного глікопротеїну D. Ревакцинацію у кількості 20 мкг того ж вакцинного антигену проводять через півроку [6,8]. Разом кількість рекомбінантного білку на одну людину необхідно 40 мкг. Враховуючи вище вказану кількість хворих в Україні, то загальна кількість рекомбінантного глікопротеїну D необхідна:

$873\,600 \times 40 \text{ мкг} = 34\,944\,000 \text{ мкг}$ або $34\,944 \text{ мг}$ білкового вакцинного антигену.

Вміст рекомбінантного білку в одній дозі складає 20 мкг. Таким чином кількість доз на рік становитиме $34\,944\,000 / 20 = 1\,747\,200$ доз (флаконів).

Продуктивність машини із розливу та закупорки флаконів складає 2470 флаконів на годину [70]. Приймемо час роботи машини 12 годин. Отже, за один цикл наповнюється $2470 \times 12 = 29\,640$ флаконів.

В один шоу-бокс (вторинну тару) вміщується 20 флаконів, таким чином кількість пачок буде: $29\,640 / 20 = 1482$ пачок, які вкладаються в групову тару (картонний ящик) по 78 пачок, в результаті чого ми отримуємо 19 наповнених гофрованих ящиків за серію.

В результаті кількість серій на рік складає $1\,747\,200 / 29\,640 = 59$ серій.

4.7 Перелік виробників кінцевого продукту і виробників (постачальників) субстанції

Інфекції вірусом простого герпесу II-типу найчастіше піддаються терапії за допомогою ліцензованих терапевтичних засобах: ацикловір, валацикловір та фамцикловір. Проте вакцинопрофілактика є більш ефективною стратегією профілактичного підходу, спрямованої на зниження захворюваності генітальним герпесом [71].

Сучасні вчені розробили декілька вакцин, хоча жодна з них не дає повної гарантії на стовідсотковий позитивний результат. Домогтися ефективності вдалося лише на 80-90%. У перелік препаратів, що сприяють розвитку клітинного імунітету для боротьби з герпесом, входить [72,73]:

- **GEN-003** - американська вакцина проти вірусу герпесу 2 типу. Її дія спрямована на стимуляцію антитіл в крові людини, здатних інактивувати віруси. Препарат ще не набув широкого поширення і знаходиться в стадії доопрацювання.
- **Сімплірікс** - американська вакцина від генітального герпесу. Впливає виключно на 10-13-річних дівчаток. У дорослих пацієнтів ефективності не проявляє.
- **Герпавак** - виробник Бельгія. Препарат захищає від захворюваності генітальним герпесом. Має характерну особливість - ефективний тільки для жінок. Герпавак не поставляється в аптеки для роздрібного продажу.
- **Chiron** - від британських вчених. Вакцина від 2-го типу герпесу. Виготовлений препарат з двокомпонентних білків і комплексу речовин призначених для посилення імунітету (дисперсна рідина ад'ювант MF59). Полівалентність можна назвати характерною рисою цього препарату, а відмітною властивістю є різний вплив на людину незалежно від статі.

Проте на ринку України представлені лише дві протигерпетичні вакцинні препарати: Вітагерпавак, Герповакс, які офіційно зареєстровані в державному реєстрі лікарських засобів (табл 4.2.)

Таблиця 4.2

Протигерпетичні вакцинні препарати

Назва (виробник)	Тип вакцини	Діюча речовина	Дозування	Вартість, грн/дозу (вартість флакону, грн)
Вітагерпавак (Витафарма, Росія)	профілактична	інактивованій вірус простого герпесу I і II антигенних типів	Разова доза 0,2 мл. Курс - 5 ін'єкцій з інтервалом в 7 днів. Ревакцинація: (5 ін'єкцій) через 6 місяців.	550 грн/ 1 доза

Протигерпетичні вакцинні препарати

Назва (виробник)	Тип вакцини	Діюча речовина	Дозування	Вартість, грн/дозу (вартість флакону, грн)
Герповакс (Спбниивс ФМБ, Росія)	профілактична	інактивованій формаліном вірус простого герпесу I і II типу	Разова доза 0,2 мл. Цикл - 5 ін'єкцій з інтервалом в 3-4 дня. Курс - 1-2 цикли з інтервалом в 7-10 днів. Ревакцинація: (1-2 курси по 5 ін'єкцій) через 6 місяців.	265 грн/ 1 доза

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

З метою забезпечення 30% населення новою білковою субодиничною вакциною проти ВПГ-2 необхідно отримати 34 944 мг рекомбінантного глікопротеїну D. Враховуючи те, що за культивування *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315), продукується рекомбінантний вакцинний білок - глікопротеїн D у концентрації 355 мг/л культуральної рідини (КР), тоді ми отримаємо:

$$355 \text{ мг} - 1 \text{ л КР}$$

$$34\,944 \text{ мг} - Y$$

$$Y = (34\,944 \times 1) / 355 = 98,4 \text{ л культуральної рідини}$$

Приймаємо, сумарні втрати при виділенні та очищенні субстанції для отримання готового ЛЗ, які становитимуть 70%, так як маємо справу з очищеною та стабільною білковою субодиничною вакциною, яка використовується в медицині, тому необхідно отримати наступну кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = \frac{98,4}{1 - 0,7} = 328$$

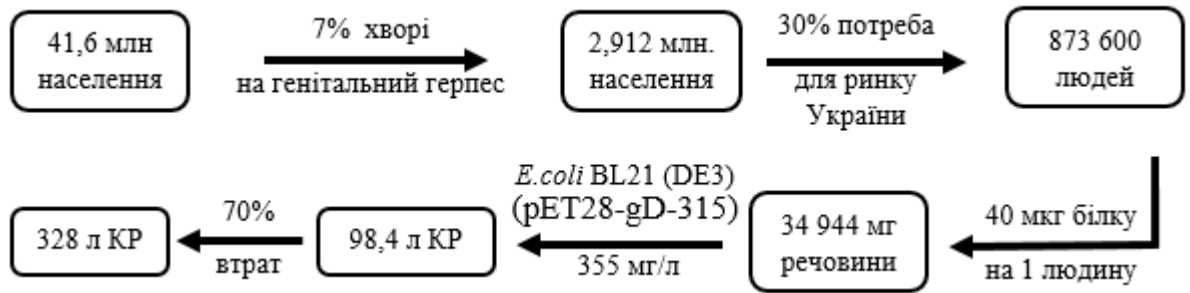


Рис. 4.1 Узагальнена схема розрахунку кількості культуральної рідини для біосинтезу рекомбінантного глікопротеїну D *E. coli* BL21 (DE3)

Розрахуємо, яку кількість культуральної рідини ми отримуємо за цикл ферментації для того, щоб розрахувати відповідну кількість стадій приготування посівного матеріалу.

1. Прийmemo кількість робочих днів $T_{рд} = 42$ (6 тижнів), тоді розрахуємо кількість продукту на добу:

$$V_{д} = V_{гп} / T_{рд} = 328 \text{ л} / 42 \text{ дні} = 7,8 \text{ л} / \text{добу}$$

2. Кількість продукту за один цикл ($V_{кр}$) становитиме:

$$V_{цк} = (K_1 \cdot V_{д} \cdot T_{цф}) / 24 = (1,1 \cdot 7,8 \cdot 38) / 24 = 13,6 \text{ л},$$

де K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій ($K_1 = 1,1$);

$T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає в себе тривалість виробничого біосинтезу (30 год) та час підготовки ферментера до роботи (8 год).

3. Кількість циклів ферментації складатиме:

$$N_{цк} = V_{гп} / V_{цк} = 328 \text{ л} / 13,6 \text{ л} = 24 \text{ цикла}$$

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

Для того, щоб отримати за один цикл $V_{кр} = 13,6$ л культуральної рідини у ферментері потрібно врахувати втрати у результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря, які становитимуть 10%. Отже кількість поживного середовища і посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом у самому ферментері буде становити:

$$V_{роб} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 13,6 / (1 - 0,1) = 15 \text{ л}$$

де $E_{ф}$ – втрати культуральної рідини під час біосинтезу

Обравши коефіцієнт заповнення ($K_{зап} = 0,5$), розрахуємо можливий

геометричний об'єм ферментера ($V_{\text{ф}}$):

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{роб}} / K_{\text{зап}} = 15 / 0,5 = 30 \text{ л}$$

Прийmemo найближчий за об'ємом стандартний ферментер: $V_{\text{сф}} = 30$ л та уточнимо, прийнятий нами раніше, коефіцієнт заповнення:

$$K_{\text{зап}} = V_{\text{роб}} / V_{\text{сф}} = 15 / 30 = 0,5$$

Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах (0,5-0,6), тому геометричний об'єм ферментера вибрано вірно. Кількість посівного матеріалу для ферментера становитиме 10% від об'єму самого поживного середовища

Отже кількість поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс}} = V_{\text{роб}} / (1 + X_{\text{вф}}) = 15 / (1 + 0,1) = 13,6 \text{ л}$$

де $X_{\text{вф}}$ – доза посівного матеріалу для ферментера.

Тоді кількість посівного матеріалу відповідно:

$$V_{\text{пм}} = V_{\text{роб}} - V_{\text{пс}} = 15 - 13,6 = 1,4 \text{ л}$$

Для цього використовуємо качалочні колби об'ємом $V_{\text{колб}} = 750$ мл та коефіцієнтом заповнення $K_{\text{зк}} = 0,2$. Тоді кількість колб для посівного матеріалу становитиме:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм}} / (V_{\text{колб}} \times K_{\text{зк}}) = 1400 / (750 \times 0,2) = 10 \text{ качалочних колб}$$

Кількість поживного середовища для вирощування самого інокуляту в колбах на качалці становити:

$$V_{\text{пск}} = V_{\text{к}} / (1 + X_{\text{кол}}) = 1,4 / (1 + 0,1) = 1,3 \text{ л}$$

Кількість посівного матеріалу, отриманого з пробірок зі скошеним агаром, відповідно становить:

$$V_{\text{пмк}} = V_{\text{к}} - V_{\text{пск}} = 1,4 - 1,3 = 0,1 = 100 \text{ мл.}$$

Таким чином процес біосинтезу рекомбінантного глікопротеїну gD включає наступні стадії:

1) вирощування посівного матеріалу в лабораторії (у пробірках на скошеному агаризованому середовищі) і подальше отримання інокуляту на рідкому поживному середовищі в 10 колбах на качалці об'ємом по 750 мл;

2) виробничий біосинтез у ферментері об'ємом 30 л.

РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ

5.1 Обґрунтування вибору біологічного агенту

Виробництво рекомбінантного gD було досягнуто в декількох експресійних системах, від прокаріотів до еукаріотів.

Прокаріотичні системи, мають ряд переваг щодо маніпуляцій, низьку вартість і можливість досягнення великої кількості виробництва білка. Яскравою прокаріотичною системою може слугувати *E. coli*, в якій усічений gD успішно експресується за рахунок індуктора IPTG, а рекомбінантний білок викликає стійку відповідь антитіл IgG у мишей [6, 74, 75].

Поряд з цим у практиці широке застосування знайшли і еукаріотичні системи, прикладом використання яких можуть бути метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris*, які використовують в якості експресійної системи для секретованої форми gD і в якості індуктора використовується метанол. Дріжджі *P. pastoris* поєднують переваги низької вартості, простоти використання та високої продуктивності з еукаріотичними системами ко-трансляції та пост-трансляції [76,77].

Рекомбінантний gD, також продукується в системі експресії бакуловірусу та може індукувати високий рівень нейтралізуючих антитіл і забезпечувати повний захист від вагінального зараження вірусом простого герпесу II-типу у імунізованих мишей, проте недоліком даної системи є те, що існує обмеження по числу генів, які можна вбудовувати у вектор перенесення, який повинен також мати відповідний розмір, щоб з ним було легко працювати в клітинах *E. coli* [78]. Таким чином у дослідженні [19] вдалось розробити двоступеневу культуру для експресії рекомбінантного білка gD2 за допомогою іммобілізованих клітин *Spodoptera frugiperda* (Sf9), що включало в себе культивування клітин Sf9 та подальшого їх іммобілізування за допомогою гідрогелю шовкового фіброїну і культивування в біореакторі після їх зараження рекомбінантним бакуловірусом,

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Бондарчук В.І.				Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми біосинтезу субстанції та технологічної схеми виробництва ЛЗ	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							67	173
Керівник	Скороцька О.І.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.	Стабніков В.П							

що експресує ген gD2 на всю довжину.

Як система експресії рекомбінантного gD використовують клітини СНО (яєчник китайського хом'ячка) [21] і показано що даний глікопротеїн індукує реакції нейтралізуючих антитіл у людини.

Також цікавим стало дослідження [20], де експресія рекомбінантного білка gD2 проводили у рослинах трансгенних томатів за допомогою *Agrobacterium tumifaciens* LBA 4404 для агроінокуляції, з метою розробки вакцини рослинного походження проти вірусу герпесу людини II-типу.

На даному етапі нам необхідно підібрати найбільш ефективний продуцент за використання якого можна досягти максимальної концентрації цільового продукту за менші кошти та час культивування.

Серед проаналізованої інформації для порівняння візьмемо наступні мікроорганізми: *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315), *P. pastoris* GS115 та *S. frugiperda* Sf9 як продуцентів рекомбінантного глікопротеїну gD антигену вірусу простого герпесу II-типу.

Культивування проводиться за оптимальної температури відповідно для бактерій 27°C та 37-38°C для дріжджів та клітин комах. Молекулярна маса білку коливається від 53 до 55 кДа, що є звичайною для рекомбінантного gD. Показник рН у порівнюваних мікроорганізмів коливається в діапазоні від близько нейтрального до слабо лужного – 6,0-8,0.

Узагальнена характеристика продуцентів та особливості їх культивування представлені у *табл. 5.1*.

Особливості отримання рекомбінантного білку gD як основи субодиночної вакцини проти *Herpes Simplex virus 2*

Склад поживного середовища, г/л	Концентрація gD, мг/л	Молекулярна маса, кДа	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pET28-gD-315)				
бульйон ТВ: триптон – 12; дріжджовий екстракт – 24; гліцерин - 4; КН ₂ РО ₄ – 2,31; К ₂ НРО ₄ · 3Н ₂ О – 12,54; канаміцин – 0,05. Індуктор: IPTG – 0,24	355	53	Отримання робочої культури на LB середовищі та подальше культивування на ТВ середовищі за: t = 37°C; рН 6,8-7,2; Т = 30 год. Перемішування: 150-200 об/хв. При OD ₆₀₀ = 0,8 додають індуктор IPTG для і культують ще 6 год	Vikas K.S., Sandeep K., Rajeev K.D., Abdul S.A., Nirmal K., Suman T. Generation of oligomers of subunit vaccine candidate glycoprotein D of Herpes Simplex Virus-2 expressed in fusion with IgM Fc domain(s) in <i>Escherichia coli</i> : A strategy to enhance the immunogenicity of the antigen. <i>3 Biotech</i> . 2020, 10(11): 463. doi:10.1007/s13205-020-02452-6
<i>P. pastoris</i> GS115				
дріжджовий екстракт - 10; пептон - 20; дріжджова азотна основа - 13,4; біотин - 0,0004; К ₃ РО ₄ · 7Н ₂ О - 21,2. Індуктор: метанол -10	425	55	Культивування на BMGY середовищі за: t = 28°C; рН = 6,0; Т = 72 год. Перемішування 280 об/хв Через 24 год культивування вносили індуктор метанол	Man W., Shuai J., Li Z., Chaoqun W., Ruifeng M., Murugavel P. Efficient production of recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 in <i>Pichia pastoris</i> and its protective efficacy against viral challenge in mice. <i>Arch Virol</i> . 2017, 162 (3): 701-711. doi: 10.1007/s00705-016-3154-7
<i>S. frugiperda</i> Sf9				
гідролізат лактоальбуміну -3,3; дріжджолат - 3,3; пеніцилін - 0,01; стрептоміцин - 0,1; амфотерицин - 250	135	55	Культивування на середовищі доповненому антибіотиками. Підтримка 30% насичення киснем. Параметри: t = 27°C; рН = 8,0; Т = 120 год. Перемішування: 120-150 об/хв.	Tao L., Hui-jun D., Ji-feng L., Wei Z., Zhi H., Shui-fen Z. Two step culture for production of recombinant herpes simplex virus type 2 glycoprotein D in immobilized <i>Spodoptera frugiperda</i> cells. <i>African Journal of Biotechnology</i> . 2012, 16655-16660. doi: 10.5897/AJB11.3356

При порівнянні концентрація глікопротеїну gD, найвищою серед усіх зазначених була у *P. pastoris* GS115 - 425 мг/л, що незначно, лише у 1,2 рази перевищує *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) (355 мг/л) та відповідно більша в 3,1 рази ніж у *S. frugiperda* Sf9 (135 мг/л)

Важливим показником, який впливає на економічність біосинтезу є також тривалість культивування. Він дає змогу скоротити значні витрати ресурсів електроенергії і при цьому докладається менше робочої сили. Біосинтез глікопротеїну gD за допомогою *S. frugiperda* Sf9 є найдовшим, а саме: 120 год, що на 48 годин більше, ніж процес біосинтезу у *P. pastoris* GS115 (72 год), проте це економічно не вигідно порівняно з найменшими витратами на культивування рекомбінантної *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) - 30 годин.

Проте дана порівняльна характеристика технологічного процесу є недостатньою, тому завдання наступного етапу порівняння полягає в розрахунку вартості поживних середовищ, що використовуються при культивуванні, які відрізняються між собою наявністю індуктора, вітамінів, амінокислот та відповідних антибіотиків, зважаючи на те, що аналізовані продуценти є рекомбінантними. Дані представлені у *табл. 5.2*.

Таблиця 5.2

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
продуцентів глікопротеїну gD**

Біологічний агент (назва і номер штаму)	Концентрація кожного компонента середовища, г/л	Ціна компонента поживного середовища, грн/кг	Вартість компонента (грн) для приготування 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pET28-gD-315)	триптон – 12	4168	50	1
	дріжджовий екстракт – 24	936	22,46	2
	гліцерин - 4;	21	0,084	3
	КН ₂ РО ₄ – 2,31	48	0,11	4
	К ₂ НРО ₄ ·3Н ₂ О – 12,54	90	1,13	5
	канаміцин – 0,05	560	0,03	6
	Індуктор: IPTG – 0,24	11 200	2,7	7
Вартість 1 л середовища – 76,5 грн				

Біологічний агент (назва і номер штаму)	Концентрація кожного компонента середовища, г/л	Ціна компонента поживного середовища, грн/кг	Вартість компонента (грн) для приготування 1 л середовища	Джерело інформації*
<i>P. pastoris</i> GS115	дріжджовий екстракт - 10	936	9,36	2
	пептон - 20	750	15	8
	дріжджова азотна основа - 13,4	13 440	180	9
	біотин - 0,0004	1200	0,00048	10
	K ₃ PO ₄ ·7H ₂ O - 21,2	60	1,272	11
	Індуктор: метанол - 10	24	0,24	12
	Вартість 1 л середовища – 205,9 грн			
<i>S. frugiperda</i> Sf9	гідролізат лактоальбуміну - 3,3	280	0,92	13
	дріжджолат - 3,3	5880	19,4	14
	пеніцилін - 0,01	700	0,007	15
	стрептоміцин - 0,1	1410	0,141	16
	амфотерицин - 250	560	140	17
	Вартість 1 л середовища – 160,5 грн			

Примітка: * – ціни наведено станом на грудень 2021 р.:

- <https://prom.ua/ua/p1310539109-pepton-tripton-dmikrobiologii.html?>
- <https://prom.ua/ua/p1151929421-ekstrakt-kormovyh-drozhzhej.html>
- <https://prom.ua/ua/p24554051-glitserin-farmakopejnyj-germaniya.html?&primelead=M14wMQ>
- <https://prom.ua/ua/p1370835186-kalij-fosfomokislyj-zameschennyj.html?>
- <https://prom.ua/ua/p384765961-fosfat-kaliya-kalij.html>
- <https://russian.alibaba.com/product-detail/stock-product-kanamycin-powder-kanamycin-monosulfate-with-good-price-60797131844.html?spm=a2700.8699010.normalList.41.2b2d69f3sKsqO7>
- <https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-99-cas-367-93-1-and-isopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside-iptg-60791007642.html?spm=a2700.8699010.normalList.26.535d6204Ys3U4J>
- <https://prom.ua/ua/p14254227-pepton-fermentativnyj.html>
- <https://www.grainger.com/product/RPI-Yeast-Nitrogen-Base-w-Amino-30UC59>
- <https://prom.ua/ua/p291823070-vitamin-biotin-kormovoj.html>
- <https://prom.ua/ua/p272635173-fosfat-kaliya-kalij.html?>
- <https://prom.ua/ua/p1026100162-metanol.html>
- <https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-lactalbumin-hydrolysate-68458-87-7-whey-protein-powder-from-haihang-industry-china-62361139523.html?spm=a2700.8699010.normalList.11.a0604f205gHVES>
- <https://www.scientificlabs.co.uk/product/255771>
- <https://russian.alibaba.com/product-detail/high-quality-99-penicillin-powder-69-57-8-penicillin-g-sodium-salt-antibiotics-62111885327.html?s=p>
- <https://prom.ua/ua/p1152139571-streptomitsin.html>
- https://russian.alibaba.com/product-detail/amphotericin-b-cas-no-1397-89-3-6073779254.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.7fcfd1957ipUrm

Проаналізувавши *табл. 5.2* можна побачити, що ціна за 1 л поживного середовища для *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) є найдешевше (76,5 грн/л) серед порівнюваних та в 2,1 разів менша за ціну поживного середовища для культивування *S. frugiperda* Sf9 (160,5 грн/л). А найдорожчим продуцентом при порівнянні вартості 1 літру поживного середовища є *P. pastoris* GS115 (205,9 грн/л).

Враховуючи попередні критерії порівняння глікопротеїну gD, для більшого і точного обсягу аналізу варто визначити вартість 1 мг рекомбінантного білку, яка наведена в *табл. 5.3*.

При розрахунках найнижчою становила за використання мікроорганізму *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) лише 0,22 грн/мг, що в 2,2 рази дешевше ніж *P. pastoris* GS115 (0,48 грн/мг). Найдорожчою вартістю за 1 мг глікопротеїну gD спотерігається за використання *S. frugiperda* Sf9 - 1,18 грн/мг.

Таблиця 5.3

Умовна вартість 1 мг продукту глікопротеїну gD

Біологічний агент	Концентрація gD, мг/л	Тривалість культивування, год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 мг gD, грн/мг
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (pET28-gD-315)	355	30	76,5	0,22
<i>P. pastoris</i> GS115	425	72	205,9	0,48
<i>S. frugiperda</i> Sf9	135	120	160,5	1,18

Таким чином, здійснивши різноплановий аналіз продуцентів глікопротеїну gD, як основи субодиночної вакцини проти вірусу простого герпесу II-типу, за допомогою різних мікроорганізмів, можна стверджувати, що *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) переважає інших порівнюваних нами продуцентів і є найбільш кращим та економічно вигідним промисловим продуцентом рекомбінантного білка gD.

Конструювання плазмиди для експресії рекомбінантного глікопротеїну gD в *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Оскільки антиген вірусу простого герпесу II-типу глікопротеїн gD за походженням є рекомбінантним білком, то важливим етапом є створення рекомбінантного продуцента, що буде синтезувати даний цільовий продукт.

Серед проаналізованих нами був обраний саме мікроорганізм *Escherichia coli* BL21 (DE3) - вихідний штам.

Згідно з дослідженнями *Vikas* та співавторами [6], білкові послідовності глікопротеїну D одержують із бази даних білків NCBI, які потім були переведені в генні послідовності. Їх ампліфікація відбувається за використання сайту рестрикції шляхом введення прямого і зворотного праймерів.

Після етапу збірки ПЛР та ампліфікації генів вакцин фрагменти ДНК глікопротеїну D були оптимізовані і клоновані в плазмиду pET28b (+) між *Nde* I і *HE* сайтами рестрикції I. Трансформування pET28-gD-315 відбувалось в компетентні клітини *E. coli* DH5a методом теплового шоку.

Підтвердження наявності гетерологічних генів у рекомбінантних плазмідах (трансформованих клітинах) шляхом секвенування методом ПЛР з T7 універсальними праймерами. Подальше екстрагування даних плазмід, із вакцинною конструкцією pET28-gD-315, з використанням набору Bioneer та трансформування їх в клітини *E. coli* BL21 (DE3) методом теплового шоку.

Експресія рекомбінантного глікопротеїну gD, за допомогою культивування *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315), відбувалась у вигляді тілець включень під індукцією IPTG.

5.2 Обґрунтування поживного середовища для культивування біологічного агента

Відповідно до статті [6] максимальна концентрація рекомбінантного глікопротеїну gD в КР спостерігається за вирощування продуцента *E. coli* BL21(DE3) (pET28-gD-315), на ТВ середовищі наступного складу, г/л:

- триптон - 20;
- дріжджовий екстракт – 24;

- гліцерин фармакопейний (для медицини) - 4;
- KH_2PO_4 – 2,31;
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 12,54;
- канаміцин – 0,05.

В якості індуктора в поживному середовищі використовується додавання IPTG – 0,24 г/л.

Вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці відбувається на поживному середовищі аналогічного складу. А вирощування посівного матеріалу (отримання робочої культури) на чашках Петрі - за використання середовища LB (*Luria-Bertani*): триптон - 10 г/л, дріжджовий екстракт - 5 г/л, NaCl - 10 г/л.

Обґрунтування вибору компонентів поживного середовища

Дріжджовий екстракт та триптон використовуються в якості джерела азоту та різних хімічних елементів (близько 70% речовин, котрі містять так складову як азот).

Гліцерин - це триатомний спирт і слугує в поживному середовищі як основне джерело вуглецю.

KH_2PO_4 та K_2HPO_4 необхідні джерело мінерального живлення та для забезпечення клітини важливими біогенними хімічними елементами, такими, як К та Р.

Канаміцин слугує селективним антибіотиком, необхідним для росту відповідно лише генно-модифікованих бактерій, що здатні до синтезу рекомбінантного глікопротеїну gD, так як в них наявний ген, котрий відповідає стійкості до даного антибіотика.

IPTG використовують в якості аналога аллолактози (метаболіт лактози), який запускає транскрипцію лактозного оперону для індукції експресії білка (цільова речовина). Оскільки дріжджовий екстракт та триптон містять термолабільні речовини, котрі втрачають свої нативні властивості за високих температур, тоді необхідно вибрати для них більш м'який режим стерилізації – температура 112°C, при тиску 0,1 МПа, впродовж 30 хв.

Соли KH_2PO_4 та K_2HPO_4 не є токсичними та не термолабільні, враховуючи те, що витримують температуру до 250 °С включно, тоді стерилізуємо за більш екстремального режиму - температури 131°С, тиску 0,2 МПа, впродовж 40 хв. *Гліцерин фармакопейний (для медицини)* - не стерилізуємо (триатомний спирт). *Канаміцин* - селективний антибіотик для якого використовуємо стерилізуючу фільтрацію із діаметрами пор 0,2 мкм. *IPTG* - термолабільна речовина, з температурою плавлення 105°С, тому пропонується метод холодної стерилізації з використанням шприцевих фільтрів з діаметром пор 0,22 мкм з поліефірсульфоною мембраною (рН=1-14, для білків, підготовка проб).

Приготування і стерилізація 1,3 л поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках

На першому етапі для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалці необхідним є приготування поживного середовища (1,3 л), яке стерилізуватимемо в автоклаві з вертикальним завантаженням, об'ємом 10 л. Всі композиції готуємо в лабораторному посуді.

Дане поживне середовище, в залежності від параметрів стерилізації поділяємо на наступні композиції:

Композиція А – триптон, дріжджовий екстракт, (стерилізація 30 хв, за тиску 0,05 МПа та температури 112°С у термостійкій плоскодонній колбі об'ємом 300 мл).

Композиція Б - KH_2PO_4 та $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (стерилізація 40 хв, за тиску 0,2 МПа та температури 131°С у термостійкій плоскодонній колбі об'ємом 3 л).

Композиція В – гліцерин відміряємо за допомогою стерильної піпетки і не стерилізуємо).

Композиція Г – танаміцин (стерилізуюча фільтрація з відповідним діаметром пор 0,2 мкм) у плоскодонній колбі об'ємом 100 мл).

Приготування і стерилізація 13,6 л поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 30 л

Об'єм поживного середовища відповідно становить 13,6 л, яке ми ділимо на такі ж композиції як і в попередніх етапах, але враховуємо індуктор, як окрему

композицію. Тоді *Композиції Г та Д* готуємо окремо в лабораторному посуді, але за однакових умов та параметрів: розчинення компонентів в дистильованій воді і подальша вакуумна стерилізуюча фільтрація з діаметром пор 0,2 мкм.

Композицію Б розчинаємо у реакторі (для приготування сумішей) об'ємом 23 л, вміст якого переносимо самоплином у ферментер об'ємом 30 л і там же стерилізуємо. *Композицію В* готуємо у лабораторному посуді, але не стерилізуємо. *Композицію А*, як термолабільну готуємо в окремій колбі та стерилізуємо безпосередньо у автоклаві.

Композиція А – триптон, дріжджовий екстракт, (стерилізація 30 хв, за тиску 0,05 МПа та температури 112°C у термостійкій колбі об'ємом 3 л).

Композиція Б - KH_2PO_4 та $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (стерилізація 40 хв, за тиску 0,2 МПа та температури 131°C у ферментері об'ємом 30 л).

Композиція В – гліцерин у плоскодонній колбі об'ємом 100 мл - не стерилізуємо).

Композиція Г – танаміцин (стерилізуюча фільтрація з відповідним діаметром пор 0,2 мкм у плоскодонній колбі об'ємом 100 мл).

Композиція Д – IPTG (стерилізуюча фільтрація з діаметром пор 0,2 мкм у плоскодонній колбі об'ємом 100 мл).

5.3 Обґрунтування вибору способу культивування і типу ферментера

Для культивування штаму *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) необхідно дотримуватись наступних оптимально підібраних параметрів [6]: температура культивування 37 °С, так як даний мікроорганізм є мезофіл, а зважаючи на те, що він також є нейтрофілом, то значення рН потрібно підтримувати на рівні 6,8-7,2.

Варто зазначити, що дані умови створюють потенційний ризик контамінації сторонньою мікрофлорою (мезофільні та нейтрофільні мікроорганізми). Таким чином, виникає необхідність забезпечення дотримання асептичних умов під час біосинтезу, чого неможливо досягти при поверхневому культивуванні. Тому для культивування даного мікроорганізму доцільним є використання глибинного способу, що забезпечує стерильність процесу, а також додатковими перевагами якого є значна ефективність споживання компонентів

поживного середовища мікроорганізмами, внаслідок чого скорочуються відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого поживного середовища, а також зручно виділяти продукти метаболізму [79].

Стерилізація обладнання, комунікацій та поживного середовища, аераційного повітря також забезпечить необхідні асептичні умови при виробничому біосинтезі. Для запобігання контамінації у ферментері важливим параметром є так само створення надлишкового тиску.

Глибинне культивування, в свою чергу поділяється на періодичне і безперервне. Останнє ж являє собою довготривалий процес, котрий займає чималий проміжок часу, під час якого поживні речовини додають в середовище в міру їх споживання, а надлишок культури відбирають. Варто зазначити, що за періодичного способу культивування весь об'єм поживного середовища засівають виключно чистою культурою і вирощування відбувається саме в оптимальних умовах протягом відповідного часу до накопичення потрібної кількості як біомаси так і цільового продукту [80].

Біосинтез глікопротеїну D (поверхневого антигену) здійснюється у періодичному процесі, оскільки максимальний синтез даного білку відбувається у стаціонарній фазі росту продуцента після накопичення біомаси та в результаті індукції трансформованих клітин IPTG.

Зазначимо, що даний мікроорганізм *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) є факультативним анаеробом, проте його вирощують на аутоіндукційному середовищі із додаванням індуктора IPTG для синтезу рекомбінантного gD. Важливою умовою використання аутоіндукційного середовища є постійна аерація культури, яку можна забезпечити подачею стерильного повітря [6].

Таким чином з вище описаного ми можемо зробити невеликий висновок, а саме: культивування *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) будемо здійснювати глибинним культивуванням періодичним способом, підтримуючи аерацією безперервною подачею стерильним повітрям.

Під час вибору ферментера для культивування мікроорганізмів враховують не лише їх фізіолого-біохімічні особливості, але й економічні

аспекти потреби продукції. Зважаючи на те, що *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) для своєї ферментації на аутоіндукційному середовищі потребує подачу стерильного повітря, тоді доцільним буде використання ферментеру оснащеного барботером, який встановлюють у нижній його частині. Тим самим ми забезпечимо не лише безперервну подачу стерильного повітря, а також додаткове перемішування у ферментері, що підвищить показники ефективності культивування продуцента [81, 82].

З метою інтенсифікації масообмінного процесу та кращої гомогенізації культуральної рідини необхідно, щоб ферментер був оснащений механічним перемішувальним пристроєм.

Зважаючи на те, що *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) не утворює міцелію або конгломератів клітин чи в'язких розчинів, то для перемішування доцільно використовувати стандартну лопатеву мішалку. В апараті для виробничого культивування варто також встановити відбивні перегородки для запобігання утворення воронки, які у свою чергу забезпечуватимуть виникненню вихрів і таким чином збільшуватимуть турбулентність системи, що призведе до підвищення ефективності перемішування [6, 82].

Таким чином ферментер для виробничого біосинтезу має бути оснащений як датчиком розчиненого кисню так і датчиком швидкості перемішувального пристрою, а також механізмами, щодо управління та регулювання даних показників.

Для забезпечення підтримання сталої оптимальної температури для культивування продуценту ферментер оснащується сорочкою і датчиком температури.

Для забезпечення контролю за рН середовища необхідно встановити у ферментер відповідний датчик, що відображає значення рН.

Для запобігання можливого утворення піни, котра з'являється в результаті великих обертів мішалки (150-200 об/хв) та наявності в середовищі піноутворювальних компонентів (триптон і дріжджовий екстракт) [6], а також контролю її рівня, ферментер для виробничого біосинтезу повинен бути

оснащений датчиком контролю утворення піни та механічним способом її руйнування, а саме наявність антипінного диску всередині апарату для культивування.

Враховуючи всі вище описані параметри культивування та вимоги до обладнання виробничий біосинтез здійснюватимемо у ферментері об'ємом 30 л BIOSTAT® C plus фірми Sartorius AG (країна-виробник Фінляндія). Даний апарат виготовляється на замовлення та розроблений з урахуванням найсучасніших технологій і напрямків дизайну. Укомплектовані, готові до роботи системи включають в себе всі необхідні компоненти для надійної і зручної роботи з мікроорганізмами або культурами клітин [83].

У ферментерах даного типу виробника наявні всі вищеперераховані датчики для здійснення біосинтезу та механізми регулювання та управління процесами під час ферментації (швидкості перемішування, рН, концентрації розчиненого кисню, температури, подачі субстрату та інокуляту, контроль рівня піни (антипінний диск), кольоровий графічний дисплей з сенсорним управлінням тощо). Можливість підключення додаткових датчиків для вимірювання оптичної щільності середовища і Red / Ох-потенціалу. Сам апарат виготовлений з нержавіючої сталі AISI 316L.

5.4 Обґрунтування вибору технології отримання глікопротеїну D як субстанції для виготовлення субодиночної вакцини проти ВПГ-2 (стадії виділення і очищення субстанції виробництва ЛЗ)

Під час обґрунтування оптимальної технології виділення цільового продукту враховують особливості культуральної рідини, фізико-хімічні властивості продукту (термолабільність, стійкість до хімічних речовин), необхідний ступінь чистоти продукту або ступінь його концентрування, характер накопичення цільового продукту (всередині клітин продуцента або в культуральній рідині).

Низька концентрація біомаси та метаболітів в культуральній рідині обумовлює необхідність проведення ряду послідовних операцій щодо виділення, концентрування та очищення цільового компонента. Кількість операцій зростає

з підвищенням вимог до чистоти продукту: осадження, фільтрування, центрифугування, сепарування, мембранні процеси, хроматографії тощо [84].

Глікопротеїн D - це основна сировина субдиничної вакцини проти вірусу простого герпесу 2-го типу (ВПГ-2). Зважаючи, що даний продукт є фармацевтичною субстанцією для виготовлення вакцини, яка у свою чергу є препаратом медичного призначення, тому варто досягти високої чистоти продукту, поєднуючи при цьому фізико-хімічні методи виділення і очищення цільового продукту, серед яких важливе місце відіграватиме хроматографія, як кінцевий етап повного очищення глікопротеїну D від залишкових домішок.

Глікопротеїн D - це рекомбінантний білок, який продукується *E. coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) у вигляді нерозчинних тілець включення, тобто це є ендометаболіт (внутрішньоклітинний продукт). Таким чином, першим етапом виділення цільового продукту буде відокремлення клітинної маси з культуральної рідини. В подальшому ми працюватимемо саме з біомасою з метою вивільнення глікопротеїну D з клітин продуцента. Зважаючи на це, подальшим етапом буде дезінтеграція клітин продуцента. Після цього ми отримуємо нерозчинні тільця включення, які направляємо на їх первинне очищення від небілкових домішок та білків, що адсорбуються на них. Наступним, не менш важливим етапом, буде солубілізація, тобто переведення очищених тілець включення, що містять глікопротеїн D в розчинну форму. Подальший етап полягає в очищенні цільового продукту - глікопротеїну D із солубілізата тілець включення із застосуванням іонообмінної хроматографії з метою позбавлення домішок, що не видалились на стадії первинного очищення тілець включення. На стадії рефолдингу ми отримуємо правильно складений у нативну форму очищений цільовий продукт, тобто ренатурація рекомбінантного глікопротеїну D.

Оскільки глікопротеїну D далі буде використовуватися для виготовлення субдиничної вакцини, з попереднім точним дозуванням та змішуванням всіх компонентів, тоді необхідно висушити глікопротеїну D для отримання аморфного порошку з 5-7% вмістом вологи. Завершальним етапом стадій

виділення і очищення цільового продукту буде слугувати подрібнення сухого порошку глікопротеїну D на дрібнодисперсні частинки в мікрометрах [6].

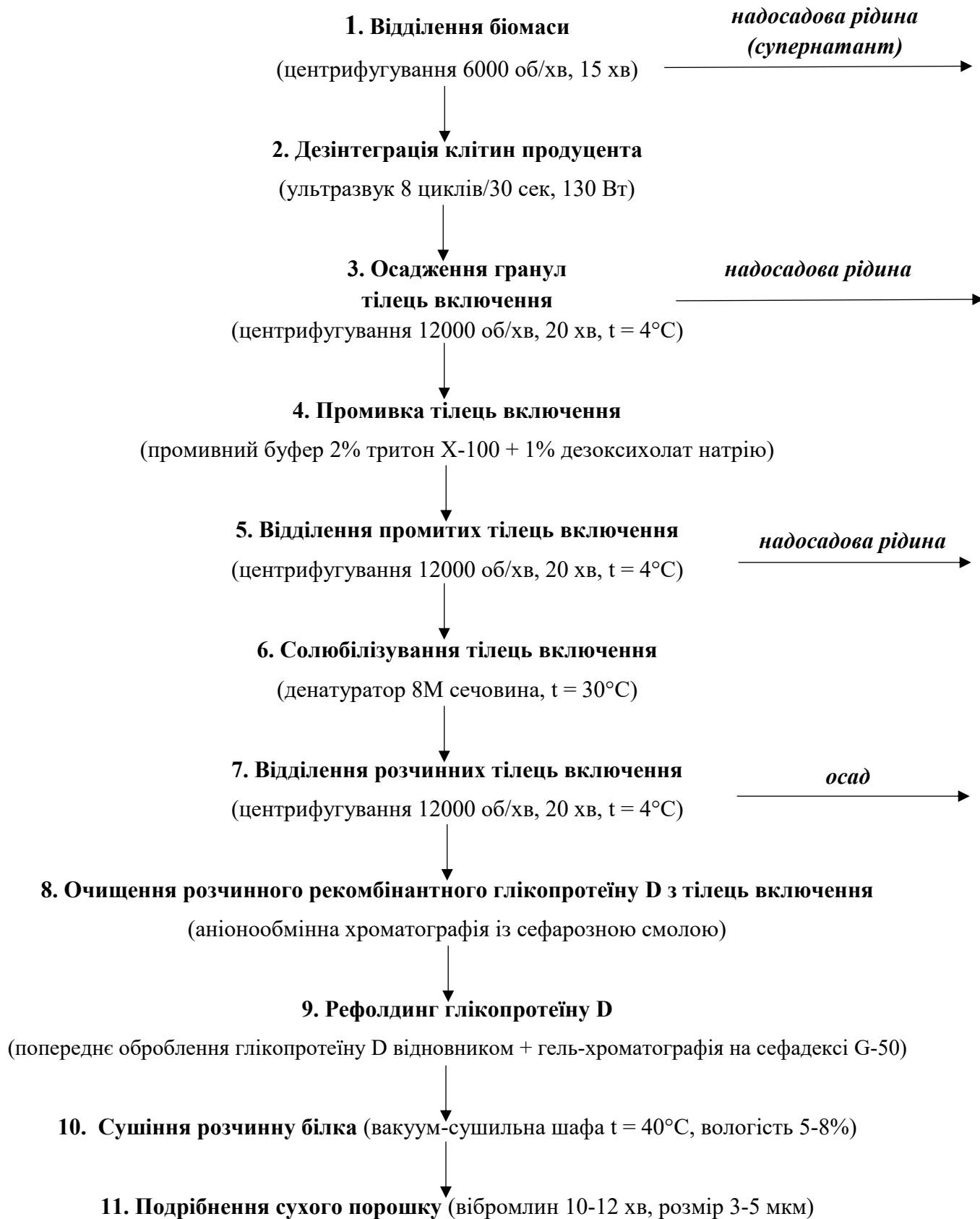


Рис. 5.1 Схема отримання високоочищеного глікопротеїну D, як основної сировини проти ВПГ-2

Методи відділення біомаси та обґрунтування вибору відповідного обладнання

Після процесу біосинтезу першим етапом виділення і очищення внутрішньоклітинного цільового продукту у вигляді тілець включення буде відділення біомаси від рідкої фази. Це можна зробити наступними найбільш доцільними та розповсюдженими фізичними методами: фільтрація та центрифугування.

Таблиця 5.4

Порівняльна характеристика способів відокремлення біомаси

Спосіб	Переваги	Недоліки
Фільтрування	<ul style="list-style-type: none"> -простота проведення процесу; -отримання освітленого розчину 	<ul style="list-style-type: none"> -налипання клітин на фільтрі шар яких знижує швидкість потоку рідини у процесі фільтрування -відносно невелика швидкість процесу 50 л/м²; -необхідна регулярна заміна фільтруючих перегородок; -значні витрати фільтрувального матеріалу
Центрифугування	<ul style="list-style-type: none"> -висока інтенсивність та швидкість процесу; -максимальне очищення культуральної рідини від частинок, що містяться у ній -можливість автоматизації; -герметичність процесу; -відсутність витратних матеріалів 	<ul style="list-style-type: none"> -складність конструкції та експлуатації

Аналізуючи вищенаписане можна сказати, що на процес фільтрування впливає ряд мікрофакторів (частинки осаду, опір фільтрувальної перегородки) мають вирішальний вплив на процес фільтрування і ускладнюють його масштабування. Також при фільтруванні культуральної рідини часто утворюються драглисті пухкі або дрібнозернисті осадки, які володіють великим опором. Фільтрування бактеріальних суспензій пов'язане з великими труднощами, які зумовлені малим розміром клітин, можливою високою в'язкістю суспензій та наявністю великої кількості домішок мікрочастинок. Тому, для підвищення швидкості фільтрування культуральної рідини її необхідно попередньо обробити: органічними і неорганічними кислотами,

неорганічними сольовими електролітами з метою максимально можливої коагуляції клітин і домішок в більші частинки, що легко фільтруються [85]. Додавання таких речовин може мати негативний вплив на стабільність глікопротеїну D в тільцях включення і сприяти його частковій деструкції

Таким чином доцільнішим способом відділення біомаси з культуральної рідини вважається центрифугування - розділення суспензій на рідку і тверду фази під дією відцентрових сил. Загальний принцип дії центрифуг полягає у тому, що гетерогенна культуральна рідина надходить у ротор центрифуги, в котрому рідина утворює кільце для розділення фаз. Тобто у полі дії відцентрових сил саме дисперсна фаза культуральної рідини, яка має більшу густину – біомаса, відкидається до периферії та осідає на стінках ротора центрифуги, а потім вивантажується у ручному або автоматичному режимі.

Незважаючи на те, що центрифугування вимагає більш дорогого устаткування, ніж фільтрування, але даний метод найдоцільніше використовувати для відділення біомаси, оскільки він має наступні переваги [86]:

- відокремлення біомаси відбувається набагато швидше, ніж за використання інших методів її відділення;
- менші втрати біомаси порівняно з фільтруванням;
- можливість безперервного та автоматизованого процесу;
- висока продуктивність та фактор розділення;
- коли процес вимагає безперервності в умовах високої стерильності.

Проаналізувавши та порівнявши між собою два оптимальних методи відділення біомаси, найкращим з них є центрифугування, оскільки продуктивність процесу найбільша, а також забезпечується максимальне відділення клітин продуцента, при цьому не потрібно попередньо обробляти культуральну рідину коагулянтами та змінювати періодично досить дорогий фільтрувальний матеріал.

Відповідно до самих методів розділення центрифуги поділяють на: відстійні, фільтруючі та комбіновані центрифуги. Під час вибору центрифуги

головними факторами є також її технічні характеристики, фізичні властивості оброблюваного матеріалу та фактор розділення. Найбільш досконалыми по конструкції вважаються центрифуги зі шнековим вивантаженням осаду, потім - з поршньовим, потім - саморозвантажні, з ножовим та з ручним вивантаженням осаду. При порівнянні типів центрифуг, то фільтрувальні використовуються для грубодисперсних суспензій із розміром частинок 0,2 - 5 мм та об'ємній концентрації твердої фази у вихідній суспензії від 10 до 50%, в той час як осаджувальні (відстійні) центрифуги застосовують для розділення суспензій з помітною різницею густин рідкої і твердої фаз при виділенні часток розміром менше 100 мкм та використовуються переважно для розділення суспензій, що містять малу кількість твердої фази [87].

Зважаючи на те, що у культуральній рідині концентрація біомаси досить невелика і становить 3,4 г/л [6], в такому випадку доцільніше використовувати осаджувальну центрифугу.

Враховавши те, що об'єм культуральної рідини після біосинтезу становить 13,6 л, то найдоцільніше використати вертикальну промислову осаджувальну центрифугу з верхнім ручним вивантаженням осаду на платформі серії TD / TDZ, яка застосовується для поділу матеріалів з частинками сферичної форми. При цьому одержують осад незначної вологості. Дана центрифуга є компактною та оснащена вибухозахищеним електроустаткуванням [88].

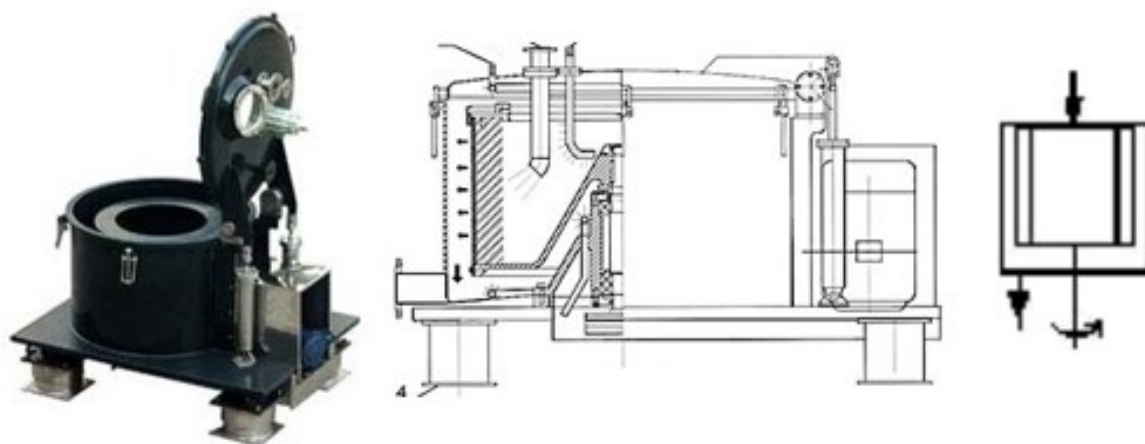


Рис. 5.2 Схематичне зображення, зовнішній вигляд, апаратурне позначення центрифуги типу TDZ450

Вибір способу дезінтеграції клітин продуцента

Для виділення внутрішньоклітинного продукту біосинтезу клітин, в нашому випадку - це тільки включення, в яких міститься глікопротеїн D необхідно зруйнувати таким чином, щоб цільовий продукт залишився неушкодженим. Найчастіше це досягається *методом дезінтеграції* – процесу незворотного порушення цілісності клітин (вірусів) з метою отримання цілісного внутрішньоклітинного вмісту. Це також називають процесом лізису.

Дезінтеграція різних типів клітин може досягатися:

- **фізичними методами:**
 - механічні (екструзія, ультразвук, газодекомпресія);
 - немеханічні (осмотичний, тепловий, холодний шок, заморожування відтанення, дегідратація-регідратація).
- **хімічними методами:**
 - дія лугів, кислот, солей, детергентів, інгібіторів, органічних розчинників.
- **ензиматичними методами:**
 - дія ферментів (літичні ферменти бактерій, дріжджів, грибів).
- **біологічними методами:**
 - дія фагів, бактерицидів.

Для практичного руйнування клітин застосовуються комбіновані методи. В результаті дезінтеграції отримуємо дезінтеграт, який, після видалення цілих клітин, що залишилися, вже називається безклітинний екстракт (лізат) [89].

Найбільш проблематичним недоліком більшості методів є складний контроль і регулювання параметрів процесу і, тим самим, вплив. Основні недоліки загальних методів лізису наведені у *табл. 5.5*.

Таблиця 5.5

Недоліки загальних методів деяких видів дезінтеграції (лізису) клітини

№	Методи клітинного лізису	Недоліки
1	Замерзання-відтанення	Занадто повільний процес
2	Хімічний лізис	Може спричиняти неповоротні зміни в структурі білків, складність очистки, дорогі детергенти

3	Ензиматичний лізис	Бувають невідтворювані результати, тривалий інкубаційний період, необхідність відділення протеаз, дороге масштабування, часто потрібно поєднувати з іншими методами
4	Клітинний вибух (<i>cell bomb</i>)	Можливе використання лише для специфічних типів клітин
5	Гомогенізація під високим тиском (наприклад французький френч-прес)	Дороге обладнання та обслуговування (очистка отворів)
6	Центрифугування	Тільки для клітин зі слабкою клітинною стінкою
7	Кульовий/бісерний млин	Нерівномірна обробка, отже неповний лізис, денатурація білків і низька ефективність в той час як відносно великі енергетичні витрати, а також тривале очищення обладнання

Обробка ультразвуком – ефективний та надійний інструмент для дезінтеграції клітин, що дозволяє повністю контролювати параметри ультразвукової обробки. Це забезпечує високу селективність під час випуску матеріалів і чистоту продукту. Енергонапруга і продуктивність процесу можуть бути обрані в досить широких межах.

До основних позитивних особливостей ультразвукового дезінтегруючого впливу на мікробні клітини слід віднести:

- зручний і відносно легкий у проведенні (повний контроль параметрів);
- як правило ультразвукові коливання приводять бактеріальні клітини до загибелі, при цьому дана мікробна суспензія не втрачає своїх імуногенних та антигенних властивостей (для отримання високоефективних бактеріальних вакцинних препаратів);
- безпечний, надійний та швидкий у роботі (15-30 сек/ 1 цикл);
- підходить для всіх типів клітин, повністю руйнує її і випускає весь внутрішньоклітинний вміст, роблячи 100% білка доступним;
- легко застосовується у малих та у великих масштабах;
- простота в експлуатації та обслуговуванні (очистка);

Переваги ультразвукового методу, як способу дезінтеграції клітин і екстракції білка полягають в його надійності, відтворюваності, а також простій, безпечній і швидкій роботі ультразвукових апаратів [90].

Зважаючи, що після центрифугування ми отримали близько 50 гр біомаси, тобто невелику кількість, тому доцільніше буде обрати невеликомасштабну ультразвукову установку (пілотну чи лабораторну).

Лабораторні ультразвукові дезінтегратори мікроорганізмів – прилади універсального призначення з потужністю випромінювання ультразвукових коливань від 120 Вт до 150 Вт. Мають змінні робочі наконечники, різноманітних форм та розмірів. Змінні камери, об'ємом від 10 до 600 см³ (мл), мають індикатори, регулятори, стабілізатори рівня випромінювання потужності.

В роботі пропонується використовувати ультразвуковий гомогенізатор SE моделі TF-150N із діапазоном регулювання температури процесу від 0°C до 100°C із звукоізоляційною коробкою зі змінною камерою на 150 мл та потужністю в 2000 Вт із сенсорним дисплеєм та частотою ультразвукового випромінювання 20-25 кГц [91].



Рис. 5.3 Зовнішній вигляд ультразвукового гомогенізатора SE моделі TF-150N

Первинне очищення тілець включення

Після етапу дезінтеграції клітин продуцента слідує центрифугування (12000 об/хв, 20 хв, $t=4^{\circ}\text{C}$) утвореної суспензії для отримання внутрішньоклітинного осаду разом з тільцями включення на лабораторній центрифугі Sigma 3-16KL з охолодженням фірми ТОВ "Редмед" із вибухозахищеним електроустаткуванням. Також під час центрифугування видаляється розчинна білкова фракція.

Під час первинного очищення, вже осаджених центрифугуванням тілець включення, промивають буфером, що містить *хаотропні реагенти* в низьких концентраціях (0,5-2 М гуанідин-хлорид) або *детергенти* (1-2% -й тритон X-100, 0,1-0,5% -й холат натрію). Цей етап необхідний для видалення небілкових

домішок, а також білків, які, адсорбуються на тільцях включення завдяки гідрофобним взаємодіям, можуть в подальшому впливати на проходження рефолдингу і кінцевий вихід цільового білка [88].

Детергенти - це поверхнево-активні сполуки, які мають властивості, що очищають. Причому ці сполуки можуть бути окремими поверхнево-активними речовинами або сумішами ПАР. Вони використовуються як розведені розчини. Існують трьох типів: катіонні, аніонні та неіонні. Саме катіонні детергенти - це тип поверхнево-активних агентів, які містять позитивно заряджені функціональні групи в голівці молекули. Більшість цих ПАР корисні як протимікробні, протигрибкові засоби тощо. Це тому, що вони можуть порушувати клітинні мембрани бактерій та вірусів. Найпоширенішою функціональною групою, яку ми можемо знайти в цих молекулах, є іон амонію. До них належить дезоксихолат натрію - здатний руйнувати клітинну мембрану, В результаті відбувається руйнування адипоцитів, розрив внутрішньо- і позаклітинних сполук.

Хаотропні реагенти - це хімічні речовини у водному розчині, котрі можуть зруйнувати мережу водневих зв'язків між молекулами води. Хаотропні реагенти можуть денатурувати білки, послаблюючи їх гідрофобну дію. Наприклад, хаотропні агенти можуть збільшувати хаотичність білкових молекул, що спричиняє денатурацію білка. Деякі приклади хаотропних реагентів включають етанол, н-бутанол, гуанідинію хлорид, перхлорат літію, ацетат літію, хлорид магнію, фенол, 2-пропанол, тіосечовину та сечовину. Дія денатурації у цих хімічних видів може відрізнятися один від одного залежно від їх хімічної структури; наприклад, етанол може впливати на нековалентні зв'язки білків і нуклеїнових кислот.

Порівняльна таблиця між детергентом та хаотропним реагентом

Критерій	Детергент	Хаотропний реагент
Дефініція	поверхнево-активна сполука (ПАР) з очищаючими властивостями	хімічна речовина у водному розчині, що може зруйнувати мережу водневих зв'язків саме між молекулами води
Принцип дії	може денатурувати білки, шляхом розчинення гідрофобних груп	може денатурувати білки шляхом послаблення гідрофобної взаємодії
Приклад	алкілбензолсульфонат, дезоксихолат натрію	етанол, н-бутанол, гуанідинію хлорид, перхлорат літію

Ключова відмінність між детергентом і хаотропним реагентом полягає в тому, що детергенти можуть денатурувати білки, розчиняючи гідрофобні групи, тоді як хаотропні реагенти можуть денатурувати білки, послаблюючи гідрофобний ефект, тобто збільшувати саму хаотичність білкових молекул, яка в свою чергу викликає денатурацію білка [92].

Для підвищення ефективності подальшого очищення, осад тілець включення можна промивати розчинами, що містять високі концентрації (до 2-3%) Triton X-100. Однак доцільність використання детергента в значній мірі визначається особливостями, пов'язаними з розчинністю цільового білка.

Так, в разі глікопротеїну D ВПГ-2, відмивання тілець включення здійснюється промивальним буфером об'ємом 1 л, що містить 2% Triton X-100, 1% дезоксихолат натрію сприяло отриманню більш чистого глікопротеїну з тілець включення. Поруч з цим в склад промивного буферу входить 50 мМ Тріс-НСl, 5 мМ ЕДТА, рН 8,0 - для промивання тілець включень від детергента [6].

Для даного етапу доцільно використати хімічний реактор з нижнім спуском об'ємом 5 л.



Рис. 5.4 Зовнішній вигляд реактора хімічного типу JGR 5L

Після промивки тілець включення необхідно провести центрифугування (12000 об/хв, 20 хв, $t=4^{\circ}\text{C}$) на лабораторній центрифугі Sigma 3-16KL з охолодженням фірми ТОВ "Редмед" із вибухозахищеним електроустаткуванням. Для отримання чистого осаду з тільцями включення для подальшої їх солюбілізації, а супернатант з розчинними білками та іншими домішками злити.

Солюбілізування тілець включення, що містять глікопротеїн D

Відмиті від гідрофобних білкових та небілкових домішок і отримані після центрифугування частково очищені тільця включення необхідно солюбілізувати (перевести у розчинну форму). Для розчинення тілець включення можуть бути використані різноманітні методи, однак вибір солюбілізуючого агента може значно вплинути на наступний етап повторного складання (рефолдинг) та вартість загального процесу. Робочу температуру під час солюбілізації білка підбирають в залежності від складу буфера і солюбілізуючого реагента. Найчастіше розчинення проводять при температурі 30°C . Крім солюбілізації в присутності високих концентрацій денатурантів або детергентів, для розчинення тілець включення використовують лужні або кислі буферні розчини з крайніми значеннями рН в комбінації з вищеперерахованими умовами.

Для процесу солюбілізації в основному використовують сильні денатуранти (8 М сечовина, 6 М гуанидин-хлорид, тіоціонатні солі) або детергенти (0,3-1% SDS, 1% бромід цетилтриметиламоній, 2% N-лаурилсаркозин) [88].

Недоліки детергентів:

- використання детергентів в якості солюбілізуючих реагентів полягає в тому, що вони можуть заважати подальшим хроматографічним стадіях. Для видалення цих солюбілізуючих детергентів може знадобитися ретельна промивка буферами та іншими речовинами;

- навіть якщо після додавання детергента можна уникнути стадії повторного складання (рефолдингу), бо білок в деяких випадках може проявляти біологічну активність, проте для цього важливо видалити забруднюючі мембранно-асоційовані протеази на стадії промивання тілець включення, щоб уникнути протеолітичної деградації солюбілізованого білка тілець включення.

При цьому найчастіше використовуються солюбілізуючі реагенти - це денатуранти, такі як хлорид гуанідінію (GdmCl) та сечовина. За допомогою цих денатурантів солюбілізація може бути досягнута шляхом повного порушення структури білка (розгортання) або порушенням міжмолекулярних взаємодій з частковим розгортанням білка. Останній підхід має ту перевагу, що для досягнення успіху потрібні менші кількості денатуранту.

Незважаючи на те, що білки були успішно перемотані з денатурованого стану, проте може складно скласти білки з частково згорнутого стану. Ключем до розробки ефективного та економічного етапу солюбілізації на основі денатурантів є визначення мінімальної кількості денатуранту, необхідного для розчинення білка та забезпечення повного відновлення біоактивності на етапі повторного складання. Зазвичай, для малих об'ємів це 100-200 мл солюбілізатора. Більшість опублікованих робіт з рефолдингу білка для тілець включення використовували відносно високі концентрації денатуранту (6-8 М) на етапі солюбілізації [93].

До осаду нерозчинних тілець включення додають буфер, який складається з сечовини з оптимальною концентрацією 8М та 50 мМ Тріс – HCl з рН 8,5, щоб перевести тілець-включення з глікопротеїном D в розчин. В якості апаратури використовуємо аналогічний реактор хімічний але на 2 л як і під час процесу промивки тілець включення. Після процесу солюбілізації відправляємо наш

розчин на центрифугування, (12000 об/хв, 20 хв, $t=4^{\circ}\text{C}$) на лабораторній центрифугі Sigma 3-16KL з охолодженням фірми ТОВ "Редмед" із вибухозахищеним електроустаткуванням. В результаті позбавляємось осаду, а супернатант завантажуюмо на колонки PRP-X100 Anion Exchange HPLC Column для іонообмінної хроматографії, попередньо врівноваживши їх буфером такого ж самого складу (8М та 50 мМ Тріс – HCl з рН 8,5). Після цього етапу глікопротеїн D готовий для очищення на хроматографічній колонці [6].

Вибір оптимального методу очищення глікопротеїну D

Попередня промивка тілець включення розчинами детергентів та солюбілізаторів не дозволяє повністю позбутися від супутніх домішок. Тільця включення можуть бути в різному ступені контаміновані бактеріальними білками, нуклеїновими кислотами і мембранними компонентами. Показано, що наявність домішок може викликати агрегацію рекомбінантних білків при проходженні рефолдингу (правильному згортанні білка в нативну конформацію). Небілкові домішки надають незначний ефект на процес рефолдингу, в той час як білкові можуть істотно знижувати вихід цільового продукту внаслідок міжмолекулярних ковалентних взаємодій і коагрегації.

Для очищення солюбілізованих рекомбінантних білків широко застосовують хроматографічні методи. Перевага даних методів полягає в можливості проведення очистки в умовах, при яких солюбілізований білок знаходиться в денатурованому стані і не утворює агрегатів [88].

У промислових цілях зазвичай використовують афінну хроматографію, іонообмінну хроматографію, а також гель-фільтрацію.

Афінна хроматографія - це відповідний різновид адсорбційної хроматографії. Основною особливістю афінної хроматографії є саме наявність комплементарності між іммобілізованим на матриці лігандом та цільовим продуктом, що власне виділяється. Використання високо вибіркової взаємодії дозволяє лише за одну стадію досягти досить високого ступеня очищення цільового продукту.

Іонообмінна хроматографія є найбільш поширеним хроматографічним методом очистки білків та амінокислот. Іонообмінна хроматографія являє фізико-хімічний метод розділення речовин, заснований на стехіометричному обміні іонів аналізованого розчину і сорбенту (іонообмінника).

Гель-фільтрація (ексклюзійна, на молекулярних ситах) - метод розділення суміші речовин із різними молекулярними масами, шляхом фільтрації через різні пористі гелі. Це один із видів рідинної хроматографії, яку проводять на хроматографічних колонках, де нерухомою фазою служать гелеподібні неіонні полімери (наприклад гель сефадекс), що вибірково втримують ті молекули з суміші, котрі здатні проникнути в пори гелю. Ефективність гель-фільтрації визначається розмірами пор між гранулами гелю і величиною кожної гранули: дрібні молекули дифундують всередині гранул і затримуються при фільтрації через ці своєрідні молекулярні сита, а більші молекули проходять в пори між гранулами [94].

Таблиця 5.7

Порівняння хроматографій для очистки солюбілізованих рекомбінантних білків в тільцях включення [95]

Вид хроматографії	Переваги	Недоліки
Афінна	<ul style="list-style-type: none"> - висока вибірковість; - концентрування цільового продукту на афінній матриці. 	<ul style="list-style-type: none"> - трудомісткий; - ретельний підбір лігандів - дороговартісний в порівнянні з іншими
Іонообмінна	<ul style="list-style-type: none"> - можливість поділу близьких за властивостями речовин; - висока продуктивність; - можливість використання різних детекторів і їх комбінацій, що дозволяє забезпечити високу селективність і малий час визначення; - універсальність методу (катиони та аніони); - висока чутливість визначення (до 1 нг/мл без попереднього концентрування); - у багатьох випадках повна відсутність попередньої пробопідготовки; - можливість автоматизації. 	<ul style="list-style-type: none"> - складність процесів синтезу іонітів, високомолекулярних сполук; - хроматографічна система повинна мати високу стійкість до корозії

Гель-фільтрація	- простота виконання; - проведення у м'яких умовах, що виключають денатурацію біологічно активних речовин.	- низька продуктивність, - багаторазове збільшення обсягу зразків, що наносяться в ході елюції, що в свою чергу вимагає подальшого концентрування, тривалість процесу.
-----------------	---	---

Таким чином, для очищення тілець включення з глікопротеїном D обираємо іонообмінну хроматографію, враховуючи те, що даний метод має високу ефективність поділу, селективність, здатність розділювати близькі за властивостями речовини та відносно недовгий час проведення розділення.

Іонообмінна хроматографія являє собою метод, який дозволяє розділяти речовини на основі їхнього заряду. Сорбент на поверхні має саме іонні функціональні групи, котрі взаємодіють з іонами цільового продукту з протилежним зарядом.

Хроматографія поділяється на аніоно- та катіонообмінну. Вид хроматографії, за якої негативно заряджені іони сорбенту зв'язуються із позитивно зарядженими іонами речовини, котру виділяють, називається катіонообмінною. В той час як хроматографія, за якої позитивно заряджені іони сорбенту зв'язуються з негативно зарядженими іонами цільового продукту, називається аніонообмінною. При виборі виду іонообмінної хроматографії спираються на ізоелектричну точку цільового продукту pI. При значенні рН вище pI речовина набуває негативного заряду, якщо нижче, то позитивного [96].

Вибір іонообмінника здійснюється на основі ізоелектричної точки глікопротеїну D *табл. 5.5*.

Таблиця 5.8

Вибір іонообмінників на основі ізоелектричної точки [97]

Ізоелектрична точка	Іонообмінник	рН буфера
8,5	Катіонообмінний	<7,0
7,0	Катіонообмінний	<6,0
6,0	Аніонообмінний	>8,0
5,5	Аніонообмінний	>6,5

Так як ізоелектрична точка глікопротеїну D складає 5,6 [6], то обираємо метод аніонообмінної хроматографії. Найчастіше для цього типу іонообмінної хроматографії використовується сеарозна смола диетиламіноетил-целюлоза (DEAE) в якості сорбенту.

Оскільки необхідно очистити досить невелику кількість глікопротеїну D близько 10 грам, хроматографію необхідно проводити на колонці малого розміру з досить високою продуктивністю. Глікопротеїн D буде сорбуватись за рахунок зв'язування позитивно заряджених іонів сорбенту із негативно зарядженими іонами цільового продукту - глікопротеїну D (стехіометрична взаємодія).

Обираємо для очистки глікопротеїну D колонку PRP-X100 Anion Exchange HPLC Column для аніонообмінної хроматографії. Дана хроматографічна колонка має максимальний тиск в 34 МПа, підтримує швидкість потоку елюенту від 0,1 до 5 мл/хв, дозволяючи значно скоротити час, що виділяється на очистку (10-15 хв). Стійка до рН від 1 до 13 [98]:



Рис. 5.5 Колонка PRP-X100 Anion Exchange HPLC Column для іонообмінної хроматографії

Рефолдинг рекомбінантного глікопротеїну D

Рефолдинг білка - процес спонтанного згортання поліпептидного ланцюга в унікальну нативну (природну) просторову структуру (так звана третинна структура). Тобто відбувається ренатурація білка.

Перед самим початком рефолдингу нам потрібно до отриманої субстанції розчиненого та очищеного глікопротеїну D, після хроматографії, додати відновник β -меркаптоетанол (як відновник дисульфідних зв'язків для правильної конформації білка), в концентрації 10 мМ та відношенні 1:1 до нашого білка та інкубувати при повільному перемішуванні за кімнатної температури протягом 1 години [6]. Даний етап проводимо в хімічному лабораторному посуді.

Далі сам рефолдинг розчиненого білка ініціюється видаленням із солюбілізуєчого буфера денатуранта і (в разі необхідності подальшого формування дисульфідного зв'язку) відновлюєчого реагенту.

Для цих цілей застосовують кілька підходів, таких як розведення, діаліз, гель-фільтрація і колонний метод. Як найбільш вживані розглянемо перші два [88].

Таблиця 5.9

Порівняльна таблиця деяких методів рефолдингу для видалення високих концентрацій денатурантів [88]

Метод рефолдингу	Переваги	Недоліки
Діаліз	<ul style="list-style-type: none"> - ефективний після висолювання білків; - не потрібна складна апаратура. 	<ul style="list-style-type: none"> - занадто довгий процес (більше 24 год); - при високих концентраціях білка (0,1-10 мг / мл) здійснюють в присутності реагентів, які перешкоджають агрегації; - лише для препаративних методів отримання білку (занадто довгий процес врівноваження системи); - при досягненні проміжних концентрацій денатуранта можлива агрегація білка.
Гель-фільтрація	<ul style="list-style-type: none"> - для промислових цілей; - ефективний швидкий процес; - не лімітується швидкістю дифузійного процесу; - простий в проведенні; - можливість повної автоматизації. 	<ul style="list-style-type: none"> - значні рівні накопичення денатурованого білка на мембрані обмежують широке використання цього методу.

Як ми бачимо саме хроматографія з виключенням розміру (гель-фільтрація) є альтернативним методом буферного обміну для видалення високих концентрацій денатурантів. Зазвичай для ренатурації методом гель-фільтрації застосовують буфери, що містять денатуранти в низьких концентраціях (до 1 М сечовини) і тіол / дисульфідні пари для формування дисульфідних зв'язків. Однак даний підхід застосовується лише до білків, що не створює нерозчинних проміжних продуктів [88].

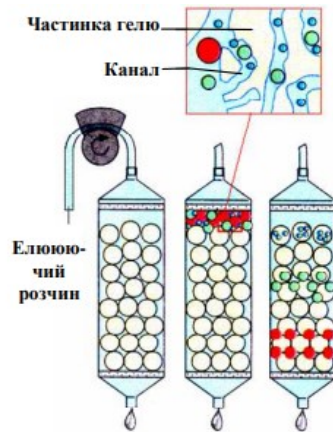


Рис. 5.6 Схеми методу гелі-фільтрації

Таким чином для видалення високої концентрації денатуранту 8М сечовини, було використано гелі-фільтрацію на сефадексі G-50 (для молекул більше 30 кДа), зважаючи, що розмір молекул глікопротеїну 53 кДа, та в якості буферної системи: 50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, рН 8,0 [6].

На основі цього ми обираємо попередню упаковану сефадексом G-50 поліамідну зі скловолокном колонку HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg для високої роздільної здатності для глобулярних білків, зразок об'ємом до 13 мл. Загальний об'єм колонки 120 мл, швидкість потоку 1 мл/хв, тиск 0,3 МПа.



Рис. 5.7 Зовнішній вигляд колонки HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg для гелі-фільтрації

Обґрунтування способу сушіння та вибору сушарки для отримання порошку рекомбінантного білка

Наступним етапом виділення і очищення глікопротеїну D буде висушування його очищених фракцій з метою отримання порошкоподібного продукту. Сушіння білкового препарату має на меті отримання стабільний при подальшому зберіганні продукт. Під час вибору методів, а також режимів

сушіння матеріалу різної природи основним критерієм служить якість сухого продукту.

Найбільш складним є сушіння саме термолабільних об'єктів (бактеріальні препарати), активного білка (ферменти). Білок може денатурувати, ферменти - інактивувати.

Вибір оптимального режиму сушіння залежить від трьох факторів: температури, тривалості та кінцевої вологості продукту.

Основним методом сушіння продуктів мікробіологічного синтезу є теплове при атмосферному тиску, під вакуумом або під глибоким вакуумом при температурах в інтервалі від -30 до $+60^{\circ}\text{C}$. Можливе також сушіння в електромагнітному полі, але внаслідок високої вартості установок для діелектричного нагрівання для зневоднювання продуктів мікробіологічного синтезу майже не використовують [99].

Існує цілий ряд методів сушіння речовин:

- конвективне сушіння;
- контактне сушіння;
- терморадіаційне;
- сушіння при нагріванні струмами високих частот;
- акустичний метод сушіння;
- сублімаційне сушіння і ін.

Усі ці методи мають свої переваги та недоліки, орієнтовані на специфічні речовини та технологічні процеси, однак, при виборі способу сушіння слід керуватися, насамперед, властивостями цільового продукту та можливістю використання того чи іншого типу сушіння.

Для білкових препаратів використовують зазвичай вакуумне сушіння або сушіння із використанням сублімаційних сушильних установок. Отже їх і розглянемо.

Інші сушильні установки не вигідно використовувати через високу температуру сушіння, що негативно впливає на якість кінцевого продукту (інактивує та денатурує повністю) [100].

Порівняння способів сушіння білку глікопротеїну D

Спосіб сушіння	Переваги	Недоліки
Вакуум-сушильне	<ul style="list-style-type: none"> -автоматизований процес сушки; -можливість рекуперації тепла; - один з найделікатніших та найефективніших способів сушіння; - незначні витрати на електроенергію; - ясне сушіння фармпрепаратів та вихідної сировини без нагрівання/замерзання або при малих значеннях t °C; - дешевше обладнання ніж для сублімаційної сушки; - використовують для малотонажних виробництв. 	<ul style="list-style-type: none"> - втрата активності ферментів на 7-10%; - для великих партій необхідне повторне просушування, що означає додатковий час та витрати.
Сублімаційне	<ul style="list-style-type: none"> - процес сушіння відбувається за низької температури, тому не руйнується продукт; - отримання стабільного сухого препарату; - для термолабільних речовин. 	<ul style="list-style-type: none"> - тривалість і енергоємність процесу; - дороговартість і складність обладнання; - висока гігроскопічність висушеного матеріалу

Зважаючи на значні переваги вакуум-сушильних шаф в тому числі і дешевше обладнання в порівнянні із сублімаційним та з урахуванням того, що ми висушуємо досить малу кількість глікопротеїну D (близько 5-7 гр), який в майбутньому стане імунобіологічним фармпрепаратом, тому доцільно обрати **лабораторну вакуум-сушильну шафу моделі BINDER VD 23** на 23 л [101]. Шафа обладнана цифровим контролером OptiControl з простим та інтуїтивно зрозумілим інтерфейсом. Контролер забезпечує термостатування, засноване на алгоритмах, оповіщення про нештатні ситуації та відключення нагріву за таймером. Дискретність установки температури 1°C. Додатково встановлена незалежна електромеханічна захист від перегріву.



Рис. 5.8 Зовнішній та внутрішній вигляди вакуум-сушильної шафи моделі BINDER VD 23

Подрібнення та просіювання сухої сировини - глікопротеїну D

Сухі продукти мікробіологічного синтезу зазвичай використовують у здрібненому стан для їх кращої дисперсності. Іноді, при розпилювальному і деяких інших видах сушіння, готовий продукт не потребує додаткового їх здрібнювання. В інших випадках, коли готовий продукт попередньо повинен розпорошуватися, швидко розчинятися або змішуватися до гомогенного стану, запроваджують операцію здрібнювання.

У технології мікробіологічного синтезу звичайно застосовується не дроблення, а помел, при якому ступінь здрібненості становить від 50 до 100. У промислових умовах подрібнення здійснюється: роздавлюванням, розколюванням, розтиранням та ударом, або ж комбінацією цих способів. Для того щоб, здійснити подрібнення, необхідно подолати сили самого взаємного зчеплення часток матеріалу.

Для середнього, тонкого та надтонкого (колоїдного) помелу матеріалів та продуктів мікробного синтезу використовують млини штифтові, барабанні шарові, кільцеві, вібраційні, струминні та колоїдні [102].

На сьогодні, процес подрібнення здійснюється, переважно дробильно-подрібнюючими устаткуванням, яке не є достатньо ефективним, внаслідок значного зношування певних робочих органів (у молоткових, роторних дробарках), низької питомої продуктивності (у кулькових і струменевих млинах), порівняно високих енерговитрат на привід та інших факторів. Прогресивним типом подрібнювачів є саме **вібраційні млини**, вони мають високу продуктивність, малі енерговитрати і широкі технологічні можливості. Установки, котрі виконують дроблення, в умовах вібраційного технологічного поля, здебільшого застосовують для самоподрібнення крупно кускових матеріалів, дрібного дроблення та помелу. Процес вібраційного дроблення, здійснюється за рахунок удару та стирання оброблюваного матеріалу при взаємодії його частинок між собою та з поверхнею робочого тіла [103].

Вібромлини із горизонтальним розташуванням робочих ємностей ефективні, при невеликому виході продукції, у них раціонально

використовується весь об'єм робочих камер, також здійснюється в повній мірі ударне навантаження на оброблювану продукцію, що забезпечує високу енергоємність процесу подрібнення, та невисоку зношуваність робочих тіл.

Відповідно досягається рівномірний розподіл оброблюваної продукції по всій площі поперечного перерізу помольної камери, що сприяє задіяння всіх робочих тіл в процесі помелу [104].



Рис. 5.9 Зовнішній вигляд вібраційного млина лабораторного типу
Обґрунтування упаковки (тари) для зберігання фармацевтичної субстанції
для виготовлення ЛЗ

Враховавши, що рекомбінантний глікопротеїн D буде використовуватись як субстанція для подальшого виробництва субодиночної вакцини проти ВПГ-2, необхідно використовувати таку тару яка б захищала наш цільовий продукт від пошкоджень, втрат та впливу дії факторів навколишнього середовища і при цьому відповідала вимогам належної виробничої практики.

Зважаючи на навеликі об'єми виробництва та отримання чистої фармацевтичної субстанції за один цикл виділення всього близько 1,46 г, тому в даному випадку недоцільно використовувати пакувальне обладнання такого типу як пластикову тару, пакети із зіп застібною чи багатошарову упаковку.

Найоптимальнішою тарою для сухого порошку глікопротеїну D є алюмінієві бокси з кришечкою (рис. 5.10), які мають ряд переваг:

- використовуються для випарювання та сушіння пробних матеріалів на водяних банях у сушильних ящиках та термостатних приладах;
- піддаються багаторазовому нагріву до температури від 100 до 250 градусів;

- бокси виготовляються із алюмінію, який може забезпечити легку вагу та триваліший термін служби без утворення нальоту;
- кришка закривається герметично та охоплює краями верхню частину банки на кілька сантиметрів;
- щільне закриття кришки не дає розсипчастим матеріалам втратити частину маси під час транспортування;
- експлуатація боксів не вимагає дорогого догляду та використання спеціальних очисних машин (легко піддаються вологому збиранню, на поверхні не утворюються подряпини).

Завдяки наявним характеристикам даний вид упаковки задовільняє потреби проєктованого виробництва, а також дозволить зберегти субстанцію в оптимальних умовах для подальших етапів виготовлення лікарського засобу [105].



Рис. 5.10 Алюмінієва бокса

5.5 Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень та виробництва субодиночної вакцини (підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів)

Однією із найважливіших вимог виробництва якісної фармацевтичної продукції - це забезпечення якості препаратів за рахунок виконання принципів і правил GMP (належної виробничої практики), однією з критичних вимог якої є чистота навколишнього середовища та устаткування. Для виконання саме цієї вимоги і слугують чисті приміщення.

Зони чистих приміщень, а також клас приміщення, відповідно до GMP визначаються виходячи із технологічних циклів виробництва у цих приміщеннях. Чисті зони можуть бути також і поза межами чистого приміщення.

Вони можуть створюватися у локальних об'ємах: ламінарні шафи, укриття та інше.

Виробництво субодиничної вакцини проти ВПГ-2, як стерильного лікарського засобу, здійснюють у приміщеннях класу чистоти В (з локальними зонами класу А).

Під час підготовки приміщень персонал використовує засоби індивідуального захисту: гумові рукавички, гумові чоботи або гумові калоші, гумовий фартух, захисні окуляри, при необхідності респіратор.

Як правило, існує щоденна, щотижнева, щомісячна та щорічна санітарна обробка, яку проводять до виробничого циклу, так і після. До них входять очищення та дезобробка стін, вікон, дверей, ручок дверей, столів, стільців, а також зовнішніх поверхонь меблів, контейнерів для відходів, стелажів, візків, піддонів, лавок, трубопроводів, технологічного обладнання, допоміжних засобів та підлоги тощо [106].

Мийно-дезінфікувальні засоби необхідно застосовувати з інтервалом в три місяці, з метою запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів чи відповідних резистентних форм.

Для миття та дезінфекції стін, підлоги, вікон та дверей обираємо такі засоби, як «Біоконтакт», «Дезекон», «Фермісепт».

Біоконтакт – мийно-дезінфікувальний засіб, що містить в якості діючих речовин: гліоксалевої альдегід, глутаровий альдегід та четвертинні амонієві солі, а допоміжними компонентами слугують піноутворюючі компоненти, полігексаметиленгуанідин та інгібітори корозії, а також воду.

Препарат проявляє антимікробну дію на грампозитивну та грамнегативну мікрофлору: стафілококи, сальмонели, колібактерії, протей, псевдомонас кластридії (*S.aureus*, *S.enteritidis*, *E.coli*, *Proteus vulgaris*, *P.aeruginosa*, *C.perfringens*, інших бактерій та їх спор), проявляє віруцидну дію та проти дріжджів. Використовують 0,1 - 0,3% водний робочий розчин даного препарату [107].

Дезекон ОМ - лужний та водночас низькопінний концентрований дезінфекційний засіб на основі четвертинних амонієвих солей, амінів і бігуанідів для дезінфекції, комплексної мийки, дезодорування. Має бактерицидні, віруліцидні та фунгіцидні властивості. При підвищенні температури розчинів їх антимікробну активність і миюча здатність збільшуються. Застосовується у вигляді водних робочих розчинів в концентрації в діапазоні від 0,02% до 5% [108].

Фермісепт - універсальний та безальдегідний нехлорний засіб для поточної, заключної, профілактичної дезінфекції та одночасного миття всіх типів поверхонь, для проведення саме генеральних прибирань. Засіб не містить хлору та альдегідів. Концентрація робочих розчинів має діапазон від 0,02% до 5%, володіють вираженими миючими, дезодоруючими, змочувальними та емульгуючими властивостями. Фермісепт володіє бактерицидною, віруліцидною, фунгіцидною, активністю [109].

Після закінчення прибирання виробничих приміщень робиться запис у журнал (маршрутний лист).

Контроль мікробної контамінації поверхонь виробничих приміщень проводить мікробіолог цеху: для приміщень класів чистоти В (з локальними зонами класу А) – вибірково два рази на тиждень під час виробничого процесу і один раз на два тижні безпосередньо після обробки приміщень.

У виробних приміщеннях класу чистоти В (з локальними зонами класу А) в процесі роботи у змивах з поверхонь приміщень площею 100 см² допускається наявність не більше двох колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі. Після обробки дезінфікуючими розчинами у змивах з поверхонь приміщень не допускається наявність життєздатних мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі [106].

Щодо підготовки персоналу, то проводиться контроль мікробної контамінації рук персоналу мікробіологом цеху за допомогою змивів тампонами і реєструє дані у робочому журналі. Для персоналу, що працює у виробничих

приміщеннях класів чистоти В (з локальними зонами класу А) – два рази на тиждень під час виробничого процесу і один раз на два тижні після обробки рук дезінфікуючим розчином вибірково у декількох співробітників.

У виробних приміщеннях класу чистоти В (з локальними зонами класу А) після обробки дезрозчинами у змивах з рук (рукавичок) не допускається наявність мікроорганізмів. У процесі роботи у змивах з рук (рукавичок) одного працюючого допускається наявність не більше двох колоній неспороутворюючих мікроорганізмів на двох паралельних чашках Петрі.

Комплектність технологічного одягу призначеного для персоналу, що працює у чистих приміщеннях складається з білизни (майка і шорти), бриджив, футболки, комбінезону (блузон або куртка, брюки), шолому, респіратору «Лепесток» або маски, бахалів, гумових рукавичок, шкарпеток, перехідного одягу та капців. Періодичність заміни відбувається з кожним входом в чисте приміщення [110].

5.6 Обґрунтування вибору стадії підготовки повітря

Чисті приміщення є головним споживачем та складовою систем підготовки повітря. Воно ж у свою чергу є одним із джерел та постачальників забруднення продукту, тобто погіршення його якості.

GMP описує вимоги до виробництва та методів контролю, але не вказує шляхи їх досягнення, які визначаються стандартами та методиками. Одним із документів є розроблена ДНЦА за участю ГіпроНДІмедпрому «Типова схема підготовки вентиляційного повітря». Вона є регламент, складений за ГОСТом на медичну продукцію, у якому повітря є готовим продуктом. 2002 р. цей документ модернізовано з урахуванням нових вимог.

Очищення повітря, що подається у виробничі приміщення класу чистоти В, з локальною зоною А, проводять по 3-х східчастій системі: попередньої, тонкої і надтонкої. На першій ступені використовують чарункові фільтри, на другій рулонні, на третій - ФЯЛ, (ЛАИК), 4Ф, НЕРА, ULPA.

Контроль мікробної обнасіненості повітря відповідних виробничих приміщень проводять за допомогою «Прибору для бактеріологічного аналізу повітря» за системою Кротова не рідше 1 разу в тиждень.

Відповідно, на кожному рівні очищення необхідно передбачити штуцери з метою відбору проб повітря для визначення концентрації механічних часток як до так і після фільтрації. Ця вимога обумовлює саме необхідність оснащення відповідними приладами автоматизованих систем підготовки повітря [111].

Забір атмосферного повітря

При визначенні місця забору зовнішнього повітря потрібно враховувати існуючі та можливі джерела як аерозольних так і газоподібних забруднень (димарі, автотранспорт, газоподібні промислові викиди, квітучі рослини та ін). Забір повітря проводиться за допомогою повітрязабірника.

Грубе очищення повітря

Повітря через повітрязабірник потрапляє вже на фільтр грубої очистки, де з нього, відповідно, видаляється основна маса великих частинок пилу розміром 3-5 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують – фільтри грубої очистки G3-G4, злегка змащене пружне скловолокно спеціального плетіння. В середині фільтра розташовані дві решітки, між якими поміщають фільтруючий матеріал. Ступінь очищення становить $E = 90\%$. У системі подачі вентиляційного повітря у виробничі приміщення В класу чистоти, з локальною зоною А, застосовується однонаправлений повітряний потік.

Стабілізація термодинамічних показників

Повітря за допомогою вентилятора подається до кожухотрубного теплообмінника, охолоджується за допомогою хладагенту фреону або підігрівається до 17–18 °С в залежності від пори року, коли проводиться забір повітря, з метою видалення з повітря зайвої вологи. Сконденсована волога відводиться, відповідно, через конденсатовідвідник. Після цього повітря додатково підігрівається до відповідної температури. Комфортну температуру у виробничих приміщеннях слід підтримувати на рівні $(21+2)^\circ\text{C}$ взимку та $(23+2)^\circ\text{C}$ влітку, відносну вологість повітря – у межах від 30 до 50 % з

урахуваннях саме технологічних вимог. Отримане повітря надходить на подальшу систему фільтрації, яка складається із фільтрів тонкої та надтонкої очистки.

Попередня фільтрація на фільтрах тонкої очистки

Тонке очищення повітря відбувається саме за допомогою фільтрами комірковими складчастими (марки ФЯС). За рахунок високого ступеня очистки дані фільтри володіють високими бактерицидними властивостями, оскільки здатні затримувати мікроорганізми розмір, яких не перевищує 0,5 мкм. В якості фільтруючого матеріалу виступають мікротонкі волокна, котрі мають діаметр пор 0,1 – 0,2 мкм. Ступінь очищення повітря 98%. Заміну фільтра тонкого очищення проводять, відповідно, по мірі його забруднення щодо даних манометра, котрий вимірює різницю тиску повітря, який надходить на фільтр і в подальшому виходить після фільтрації.

Очищення повітря на фільтрах надтонкої очистки

На даній стадії очищення повітря для фармацевтичної промисловості широко використовуються НЕРА-фільтри для видалення з повітря частинок розміром 0,2-0,3 мкм. Дані фільтри мають рамочну конструкцію, яка складається з корпусу та відповідного фільтруючого матеріалу, котрий вкладається в нього. Для забезпечення одної і тої самої відстані між шарами фільтруючого матеріалу необхідні гофровані металеві сепаратори. Між корпусом фільтруючого елемента та фільтруючого матеріалу необхідно нанести шар герметика, який виключає надходження повітря у чисту зону в обхід фільтруючого матеріалу. Фільтр обладнано також ущільнюючою прокладкою, яка як правило, виготовляється із силіконового матеріалу. Ефективність очищення повітря такими фільтрами становить 99,999%. Після цього повітря направляється до приміщень [112].

5.7 Обґрунтування вибору підготовки води очищеної та води ін'єкційної

Для виробничих потреб виготовлення субодиночної вакцини проти ВПГ-2 у вигляді ін'єкційного лікарського засобу передбачено отримання та використання води очищеної та води ін'єкційної. За своїми показниками вона відповідає вимогам Державної Фармакопеї України: вода очищена ФС 42-2619-

89; вода для ін'єкцій - ФС 42-2620-89. Для одержання води фармакопейної якості необхідно проводити обробку води питної яка поступає на підприємство.

Вода очищена

Воду очищену одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном або будь-яким іншим підходящим способом.

Під час виробництва і подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів

Забір води

Здійснюється з централізованого міського трубопроводу за допомогою забірників води.

Груба фільтрація

Груба фільтрація дозволяє видаляти з води частинки розміром більше 100 мкм. Як устаткування для грубої фільтрації використовуються фільтри з піщаним набиванням. Вибір сорту піску залежить від результатів аналізу води з урахуванням сезонних змін. Фільтр періодично потрібно промивати. Справність даного фільтра контролюється різницею тиску води до і після фільтру.

Пом'якшення води

Дозволяє понизити жорсткість води за рахунок видалення іонів кальцію і магнію перед подачею води для очистки на мембранах зворотного осмосу. Як устаткування на цій стадії можуть служити автоматичні пом'якшувачі, що працюють за принципом заміни іонів кальцію і магнію іонами натрію. Пом'якшувачі періодично регенеруються розчином хлориду натрію. Справність роботи пом'якшувача можна контролювати періодичним виміром жорсткості води на вході і на виході.

Фільтрування через вугільний фільтр

На даному етапі воду відфільтровують на фільтрах з активованим вугіллям від найбільш шкідливих домішок, таких як вільний хлор, для подальшого пропускання її через системи зворотного осмосу.

Одержання води очищеної на установці зворотного осмосу

В колонах зворотного осмосу відбувається очищення води від розчинених в ній солей із селективністю не менше ніж 99,00 %. Обладнання являє собою системи мембран, які мають розміри пор 0,0005–0,001 мкм.

Для перебігу процесу необхідно створити надлишковий тиск (тиск, вищий за осмотичний) для примусового фільтрування води крізь мембрану. Для збільшення ефективності процесу використовується тангенціальна подача води до поверхні мембрани при рециркуляції. Контроль систем зворотного осмосу здійснюється вимірюванням питомої електричної провідності води на виході з системи.

Зберігання води

Воду очищену зберігають в закритих місткостях, виготовлених з матеріалів, що забезпечують збереження властивостей води в межах вимог чинних нормативних документів і що захищають її від контамінації. Матеріалами місткості для зберігання води очищеної можуть бути поліпропілен тефлон, нержавіюча сталь AISI 316 або інші інертні матеріали.

Вода ін'єкційна

Воду для ін'єкцій одержують з води очищеної шляхом чотирьохступеневої дистиляції на установці для одержання ін'єкційної води. Виробництво води для ін'єкцій та її використання під час технологічного процесу виготовлення стерильних лікарських засобів здійснюють у відповідності з документом підприємства «Настанова СК.Р 02С.02-08 "Виробництво води для ін'єкцій"». Вода для ін'єкцій стерильна має бути прозорою і безбарвною.

Воду для ін'єкцій зберігають при температурі від 3°C до 7°C або від 80°C до 95°C в закритих місткостях виготовлених з матеріалів, котрі забезпечують збереження властивостей води в межах чинних нормативних документів і захищають її від попадання механічних включень і мікробіологічної контамінації. Тривалість зберігання встановлюється потім валідації.

При необхідності тривалого зберігання води для ін'єкцій необхідно організувати її циркуляцію при температурі в інтервалі 85-90°C. Для цього

застосовуються спеціальні місткості. У якості матеріалу усіх поверхонь, що знаходяться у контакті з водою для ін'єкцій, рекомендується використовувати нержавіючу сталь [112].

5.8 Обґрунтування вибору допоміжних речовин

Допоміжні речовини – це речовини органічної та неорганічної природи, котрі використовують у процесі виробництва та виготовлення лікарських форм з метою надання їм необхідних властивостей. Допоміжні речовини є обов'язковими компонентами практично всіх лікарських форм, складають єдину фізико-хімічну систему з лікарськими речовинами та контактують з організмом разом з останніми. Вони відповідно регулюють швидкість досягнення терапевтичного ефекту діючої речовини, а також забезпечують зручність застосування й споживчі якості ліків (смак, колір, запах, зовнішній вигляд, стабільність при зберіганні, рівень мікробної контамінації) [110].

Допоміжні речовини у виробництві субодиночної вакцини проти ВПГ-2 у вигляді ін'єкційної форми будуть наступні:

- *ад'ювант* - це різноманітні як за походженням так і за фізико-хімічними властивостями речовини: гель гідроокису алюмінію, алюмокалієвий галун, ліпіди, емульгатори, полімерні сполуки, що пришвидшують та підвищують імунногеність цільового антигену (діюча речовина) та створюють «депо» антигену у місці введення; (алюміній гідроксид);
- *допоміжна неактивна речовина-розчинник*, який коригуватиме сольовий баланс даної вакцини вакцини; (натрію хлорид);
- *буферні речовини, що стабілізують вакцину*, щоб її кислотний рівень збігався з рівнем нашого тіла, а також мають водоутримуючі властивості (натрію гідрофосфату дигідрат, натрію дигідрофосфату дигідрат); зазначені солі містяться у вакцинах, щоб допомогти збалансувати будь-яку кислотність у розчині, тому він є більш стабільним для зберігання та сумісним з тканиною тіла, в яку його вводять;
- *розчинник*, який є основною допоміжною речовиною у технології ліків з рідким дисперсійним середовищем, здатний розчинити різноманітні речовини,

тобто утворювати з ними однорідні системи – розчини, що складаються з двох або більше компонентів; (вода для ін'єкцій).

Таким чином наша субодинична вакцина проти ВПГ-2 включатиме наступні допоміжні речовини: алюмінію гідроксид, натрію хлорид, натрію гідрофосфату дигідрат, натрію дигідрофосфату дигідрат, вода для ін'єкцій [113].

5.9 Вибір та підготовка первинної упаковки для субодиничної вакцини ін'єкційного типу

Для отримання готового лікарського препарату, нам необхідно вибрати оптимальну первинну упаковку для розфасовки нашого готового лікарського засобу, так як вона знаходиться в безпосередньому фізичному контакті з лікарським засобом. Варто пам'ятати, що первинна упаковка виконує кілька функцій, найважливішими з яких є збереження якості і властивостей лікарських препаратів протягом обумовленого терміну зберігання, забезпечення герметичності та стабільності, а також зручність використання та дозування. Саме в цих напрямках ведуться інноваційні розробки.

Враховуючи те, що наша субодинична вакцина проти ВПГ-2 буде випускатись у вигляді ін'єкційної лікарської форми, тоді в якості первинної упаковки, зазвичай використовують ампули чи флакони з медичного нейтрального скла, яке призначене для ін'єкційних розчинів. При цьому скло вважається одним з найбільш екологічних матеріалів: не взаємодіє з навколишнім середовищем, а в процесі руйнування подрібнюється до кварцового піску [110].

При порівнянні флаконів і ампул, навіть не зважаючи на те, що останні забезпечують повну стерильність лікарського засобу аж до моменту їх розкриття, все ж вони мають ряд суттєвих недоліків [114]:

- хрупкіші ніж флакони, а отже легше розбити;
- складність у розкриванні при використанні (застосування ампульного скарифікатора);
- небезпека ураження медперсоналу або забруднення розчину скляним пилом при розтині ампул.

Інша тара для стерильних лікарських засобів - скляний флакон з гладким горлом та стандартною каучукової пробкою, що закріплюється обтиснутим алюмінієвим ковпачком. Цей тип первинної упаковки використовується в основному для виробництва стерильних лікарських засобів, які вводяться внутрішньовенно або внутрішньом'язево.

При цьому флакон має ряд переваг, в порівнянні з ампулами [115]:

- після відбору лікарського засобу з флакона через пробку герметичність і стерильність не порушуються;
- легкий при відкритті;
- зручний при транспортуванні та зберіганні;
- простіший технологічний процес при закупорці тари з лікарським засобом;
- при використанні флакона зводиться до мінімуму ймовірність руйнування скла.

Зважаючи на те, що розроблена дана субодична вакцина являє собою гомогенну та легко опалесцентну суспензію білого кольору, яка при відстоюванні розділяється на 2 шари: верхній - прозора безбарвна рідина; нижній - білий осад, який легко розбивається при струшуванні, а також має бути постійний контроль на наявність мікрозабруднень, тому доцільно буде обрати як лікарську форму розчин для ін'єкцій у прозорому флаконі зі скляної трубки нейтрального скла об'ємом 2 мл, як первинної упаковки даного лікарського засобу.

Таблиця 5.11

Порівняння первинної тари для протигерпетичної вакцини в ін'єкційній формі

Первинна тара	Переваги	Недоліки
Флакони	легкий при відкритті та використанні; багатодозовість; можна дезінфікувати та використовувати повторно; зручно використовувати для змішування декількох сполук хімічної природи; зручність при транспортуванні; можна зберігати ліки протягом тривалого часу; легкий процес виготовлення	найкраще зберігає лише стійкі елементи; не є типовим герметичним типом

<i>Ампули</i>	повна герметичність; зберігання летких та нестабільних хімічних сполук	складність у розкриванні при використанні; забруднення розчину скляним пилом при розтині ампул; не можна повторно використовувати; складніше обладнання для їх виробництва, щоб створити чітку горловину ампули; лише для разових доз ліків або розчинів; як пристрій тимчасового зберігання
---------------	--	--

Підготовка первинної упаковки

Флакони. У виробництві як інфузійних розчинів так і вакцин у вигляді ін'єкційних розчинів, в якості первинної упаковки використовують скляні та полімерні контейнери. В даному випадку використовуємо флакони з трубки скляної прозорі для парентеральних лікарських засобів (вакцин) об'ємом 2 мл фірми Taian Youlyu Industrial Co., Ltd., Китай. Вони як і інша фармацевтична тара для виробництва лікарських засобів повинна пройти ряд підготовки.

Процес підготування флаконів починається із замочування, миття зовнішньої та внутрішньої поверхні і подальша стерилізації. Під час замочування мийний розчин ПАР піддає деструкції частки забруднень, що у свою чергу веде до їх відшаровування із поверхні скла та видалення. Спочатку йде миття внутрішньої поверхні флаконів, під час якого відбувається механічне очищення забруднень. Миття зовнішньої і внутрішньої поверхні флаконів здійснюється із застосуванням шприцевого, ультразвукового або ж контактноультразвукового методів або їхньої комбінації. Останнє ополіскування флаконів проводять водою для ін'єкцій, профільтрованою через мембранний фільтр з порами розміром не більш як 5,0 мкм. Після миття флакони надходять на подальшу стерилізацію. Для цього використовують сушильно-стерилізаційні установки тунельного типу, де флакони проходять три зони: нагрів до температури стерилізації ($315 \pm 35^\circ\text{C}$), витримка за заданої температури протягом визначеного часу (5–30 хв) і далі йде охолодження профільтрованим через фільтр тонкого очищення стерильним повітрям.

Гумові пробки та алюмінієві ковпачки. Під час виробництва даної вакцини будемо використовувати пробки гумові типу 2 для флаконів 2 мл фірми ТОВ «Київгума», м. Бровари (виробництво), Україна та ковпачки алюмінієві типу К-2-13 фірми ТОВ «Статус», м. Харків, Україна. Для підготування пробок та ковпачків у виробничих умовах необхідно використовувати поліфункціональне устаткування із програмним керуванням, яке дозволяє здійснювати всі операції в одному апараті. Миття пробок і ковпачків містить у собі декілька операцій миття з ополіскуванням, яке чергуються. Положення МУ 42-51-21-93 і МУ 42-51-22-93 регламентують наступну послідовність дій: відмивання пробок від часточок гуми, миття у розчині мийного засобу, кип'ятіння в розчині натрію гідроксиду, соди кальцинованої або тринатрій фосфату, кип'ятіння в розчині соляної кислоти. Після кожної операції проводять ополіскування пробок проточною водопровідною водою, а потім очищеною. Останнє ополіскування проводять водою для ін'єкцій, профільтрованою через фільтр із порами розміром не більш 5,0 мкм. Перед стерилізацією пробки силіконують. Стерилізацію пробок і ковпачків проводять насиченою парою у стерилізаторах із наступним сушінням стерильним повітрям. Стерильні флакони, пробки і ковпачки вивантажують у стерильні ємності з кришками і тримають у чистій зоні з навколишнім середовищем, щонайменше, класу D не більш 24 год [110].

5.10 Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

На *першому етапі технологічного процесу виробництва субдиничної вакцини проти ВПГ-2 у вигляді ін'єкційного розчину* здійснюють приготування ін'єкційного розчину герпесвірусної вакцини, що містить рекомбінантний антиген (діюча речовина) та допоміжні речовини, у вигляді адьюванту, розчинників та буферних речовин, що стабілізують вакцину.

Для цього фармацевтичну субстанцію рекомбінантного глікопротеїну D та допоміжні речовини, попередньо зважені та просіяні, необхідно змішати у реакторі-змішувачі та додати відповідну кількість води ін'єкційної.

Виготовлення розчинів для ін'єкцій проводять у спеціальних приміщеннях першого або другого класу чистоти з дотриманням усіх правил асептики.

На *другому етапі* проводять фільтрування в поєднанні із стерилізацією ін'єкційного розчину герпесвірусної вакцини від хімічних, міробних та механічних забрудень, які можуть бути адсорбовані на всіх твердих частинках, а також бути в повітрі виробничого приміщення, вихідній сировині, комінікаціях і персоналу.

Для використаємо метод стерилізувальної фільтрації. Цей метод стерилізації включений у ДФУ для стерилізації *термолабільних розчинів*, що не підлягають кінцевій стерилізації. За механізмом дії фільтрувальні перегородки, які використовуються для стерильної фільтрації, поділяють на глибинні та мембранні з розміром пор не більше 0,3 мкм [110].

Для цього використовуємо стерилізуючий фільтр «пілотна система тангенціальної фільтрації для об'ємів від 1 л до 100 л на базі фільтроутримувача Sartacon® Slice та насоса Sarto Jet® Pump із ультрафільтром Hydrosart® розміром пор 0,22 мкм. Дана системою є тангенціальної ультра- та мікрофільтрації, призначеної для вилучення, концентрування та очищення різних біологічних розчинів та суспензій. Всі використовувані матеріали мають високу біологічну, хімічну і температурну стійкість, стійкі в широкому діапазоні рН [116].



Рис. 5.11 Комплект для мікрофільтрації та насос SartoJet® Slice (Росія)

На *третьому етапі* здійснюють наповнення та закупорку флаконів із ін'єкційним розчином герпесвірусної вакцини. Для цього обираємо

«автоматичну лінію розливу та закупорювання рідких препаратів у флакони модель ТБ-056» фірми ТОВ "Технологія-бізнес" (Україна) із продуктивністю 2470 флаконів за годину [117]. Лінія призначена для дозованого розливу та закупорювання рідких препаратів у флакони і може бути використана у фармацевтичній та інших близьких галузях промисловості. Головна відмінність від попередніх моделей полягає у застосуванні індивідуальних приводів на виконавчі механізми та загального управління роботою від програмованого контролера, що значно спростило конструкцію лінії та підвищило надійність роботи. Лінія випускається в різних модифікаціях, наприклад, для внутрішньої гумової пробки і зовнішнього алюмінієвого ковпачка [70].



Рис. 5.12 Автоматична лінія розливу та закупорювання рідких препаратів у флакони, модель ТБ-056 (Україна)

На *четвертому етапі* здійснюється перевірка флаконів на герметичність та наявність механічних включень в них. Для цього використаємо «Автоматичну інспекційну машину для ампул, картриджів та флаконів малого діаметру моделі А&V 600». Види перевірок: на присутність сторонніх частинок (відбиваючі та невідбивні, важкі та плаваючі); косметична перевірка (наявність алюмінієвого кільця, кришки та їх форма, наявність кольорових кілець та ОРС, бульбашки повітря у стінках, дефекти самої ампули/флакону); перевірка рівня заповнення; вузол перевірки на герметичність – Leak Test; 4-а станція оптичного контролю. Продуктивність складає 36 000 флаконів за годину [118].



Рис. 5.13 Автоматична інспекційна машина для ампул, картриджів та флаконів малого діаметру, модель A&V 600 (Росія)

На *п'ятому етапі* здійснюємо маркування та пакування готової продукції у вторинну тару - чарункові коробочки (шоу-бокси). Для цього використаємо «ефективну та безпечну систему упаковки флаконів у шоу-бокси». Лінія складається з наступних машин [119]:

- етикетувальна машина модель LR 105 , що дозволяє наносити етикетки зі швидкістю до 300 флаконів за хвилину;
- роторний стіл модель TR 1200 для накопичення та передачі флаконів в пакувальну машину;
- машина NCX для пакування флаконів у шоу-бокс з установкою поздовжніх та поперечних перегородок між флаконами, що обробляє до 12 шоу-боксів за хвилину.

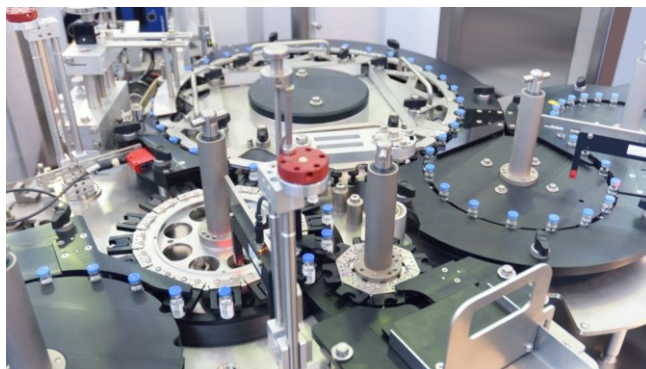


Рис. 5.14 Лінія для етикетування та пакування флаконів у шоу-бокс (Росія)

На *шостому етапі* відбувається пакування пачок (шоу-боксів) із флаконами у групову тару - гофровані ящики. Для цього обираємо машину для упаковки пачок у картонні коробки «Romaco Promatic PAK 100» [120]. Для кожного робочого процесу (груповання коробок, транспортування відповідно, згрупованих коробок і подальша упаковка в короб) відведена окрема робоча зона, яка дозволяє відстежувати критичні операції, а також знижувати час простою машини до мінімуму. Оператор вручну, відповідно, формує та встановлює короб в машину. Груповання та укладання коробок виконується в автоматичному режимі. Продуктивність складає 5 коробок на хвилину.



Рис. 5.15 Машину для упаковки пачок у картонні коробки (гофроящики) «Romaco Promatic PAK 100» (Німеччина)

РОЗДІЛ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу глікопротеїну D

6.1 Специфікація обладнання ділянки виробничого біосинтезу

Специфікація обладнання, котре зображене на апаратурній схемі (див. графічна частина), представлена у *табл. 6.1*.

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання виробництва поверхневого антигену (глікопротеїну D) вірусу простого герпесу II-типу

Позиція	Найменування обладнання	Кількість	Характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозбірник	1	Пристрій для забору повітря даховий, моделі RUCK DNA фірми «Кліматкомплект» виготовлений з високоякісного пластику ASA, стійкого до погодних умов і УФ-випромінювання та обладнаний оцинкованою металевую сіткою для видалення механічних забруднень. Ступінь захисту пристрою IP33. Максимальна робоча температура повітря, що транспортується до + 80°C. Країна виробник: Україна ¹ .
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр FILTERCEL WRE-12241, класу G4 компанії «General filter». Вогнетривкий. Фільтруючий матеріал – поліестер з перфорованим картоном. Продуктивність – 10 м ³ /хв. Ефективність: E = 90%. Перепад тиску: 70 – 250 Па. Виробник: Італія ² .
К-3	Компресор	1	Компресор JB-10CEBM (WR). Продуктивність: 160 л/хв. Тиск повітря 0,8 МПа. Потужність 1 кВт. Вага апарата: 7 кг. Країна виробник: Білорусь ³ .
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Водяний повітроохолоджувач типу CWK 250-3-2,5 фірми «Systemair». Вид енергоносія – вода (витрати: 0,06 л/с). Температура повітря на виході: t = 17-20°C Потужність вентилятора – 1,4 кВт Продуктивність: 6 м ³ /хв. Країна виробник: Швеція ⁴ .

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Бондарчук В.І.			Розділ 6. Опис технологічного процесу виробничого біосинтезу глікопротеїну D	Літ.	Арк.	Акрушів
Консульт.							119	173
Керівник		Скроцька О.І.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Зав. каф.		Стабніков В.П						

P-5	Ресивер	1	Повітряний ресивер 20 л CE EN 286-2 0437. Максимальний робочий тиск – 1,2 МПа. Матеріал листа – алюміній 3 мм (5083), гніздо AlMg3 (5754). Робочий діапазон температур: +50-60°C. Країна виробник: Турція ⁵ .
T-6	Теплообмінник-нагрівач	1	Повітрянагрівач типу RV 40-20/9 фірми «Systemair». Температура повітря на виході: t < 40°C. Нагрівальний елемент з н/ж сталі марки 316 L. Потужність вентилятора – 9 кВт. Продуктивність: 7 м ³ /хв. Країна виробник: Швеція ⁶ .
Ф-7	Головний фільтр очистки (тонкої)	1	Фільтр FILTERCEL HT9-12241, класу F9 компанії «General filter». Вогнетривкий. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно з оцинкованими розділювачами. Продуктивність – 8 м ³ /хв. Ефективність: E > 95%. Перепад тиску: 260 – 300 Па. Виробник: Італія ⁷ .
P3-8	Реактор-змішувач	1	Реактор-змішувач фірми Wise master об'ємом 23 л циліндричного типу. Виготовлений з н/ж сталі марки 316 L. Оснащений тенном з потужністю 2,5 кВт та перемішувальним пристроєм зі швидкістю обертів мішалки 98 об/хв. Робоча температура: 80°C. Маса порожнього апарата: 26 кг. Габаритні розміри: Ø400x575 (мм). Країна виробник: Україна ⁸ .
Ф-10,11	Фільтр індивідуальної очистки	2	Фільтр NEPAFIL TAM-141212, класу H14 компанії «General filter». Вогнетривкий. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно або боросилікат з анодовими алюмінієвими розділювачами. Продуктивність – 7 м ³ /хв. Ефективність: E = 99,999%. Перепад тиску: 140 – 600 Па. Виробник: Італія ⁹ .
Фр-9	Ферментер	1	Напівпромисловий ферментер моделі BIOSTAT® C plus об'ємом 30 л фірми Sartorius AG. Виготовлений з н/ж сталі марки 316 L. Оснащений паровою сорочкою; датчиками: температури, рівня піни, рН, розчиненого кисню; барботером; антипінним диском; лопатевою мішалкою та кольоровий графічний дисплей з сенсорним управлінням. Швидкість обертання мішалки: 20-600 об/хв. Маса порожнього апарата: 230 кг. Габаритні розміри: (Ш×В×Г) 1900×1020×750 (мм). Внутрішній діаметр: Ø350 (мм). Країна виробник - Фінляндія ¹⁰ .

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

1. <https://klimatkomplekt.com.ua/produkcija/dha-plastmas/> («Кліматкомплект», повітрязабірник)

2. <https://www.generalfilter.com/database/scheda.php?id=1983&lang=ru> («General filter», фільтр грубої очистки)
3. <https://inex.by/kompressornaya-golova-jb-10cebм-wr#content> («Старлайк», компресор)
4. <http://www.systemair-ukraine.com/pdf/accessories.pdf> («Systemair», водяний повітроохолоджувач).
5. <https://hydromarket.com.ua/ua/p605646663-vozdushnyj-resiver-256.html> («Hydromarket», ресивер)
6. <http://www.systemair-ukraine.com/pdf/accessories.pdf> («Systemair», повітронагрівач)
7. <https://www.generalfilter.com/database/scheda.php?id=1131&lang=ru> («General filter», фільтр тонкої очистки)
8. <https://wise-master.com.ua/ua/p1001262963-reaktor-dlya-prigotovleniya.html> («Wise master», реактор для приготування сумішей).
9. <https://www.generalfilter.com/database/scheda.php?id=1855&lang=ru> («General filter», фільтр індивідуальної (головної) очистки)
10. <https://www.gluvelab.com/catalog/fermentery-bioreaktory/fermenter-sterilizuemyy-biostat-cplus/> («Sartorius AG», ферментери).

6.2 Опис технологічної схеми виробництва глікопротеїну D

Технологічна схема біосинтезу поверхневого антигену глікопротеїну D (gD) за культивування *E.coli* BL21 (DE3) (pET28-gD-315) складається з таких допоміжних робіт як: підготовка аераційного повітря і поживних середовищ та безпосередньо технологічного процесу, а саме: підготовка посівного матеріалу та біосинтез поверхневого білку gD як цільового продукту.

Технологічна схема біосинтезу рекомбінантного білка наведено у графічній частині даного курсового проєкту.

ДР 1 Підготовка аераційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря на висоті 10 м, забирають через зазначений повітрозбірник (ПЗ-1), який розташовується як правило на висоті 2-3 метри від верху даху.

ДР 1.2 Очищення повітря у фільтрі грубої очистки

Далі повітря надходить на фільтр (Ф-2) на етап попередньої очистки від грубих домішок, а саме: від механічних домішок повітря та супутнього пилу. Ступінь очищення 80-90%.

ДР 1.3 Компресування повітря

За допомогою компресора (К-3) при тиску 0,8 МПа та за температури 120-150°C відбувається стиснення попередньо очищеного повітря.

ДР 1.4 Кондиціонування повітря

Стиснене повітря «переохолоджують» у теплообміннику: водяному повітроохолоджувачі повітря (Т-4) до заданої температури 17-20°C і подають на ресивер (Р-5) для його зберігання і де при цьому волога зріджується і таким чином її кінцевий відсоток становить 60%.

ДР 1.5 Нагрівання повітря

Із попередньої стадії охолоджене повітря із зниженим відсотком вологи подають на теплообмінник-повітронагрівач (Т-6), де воно нагрівається до оптимальної для культивування температури, а саме: 30°C.

ДР 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі

Подальше очищення повітря від мікроорганізмів здійснюється на тонкому фільтрі (Ф-7). При цьому ступінь очищення якого становить 95-98 %.

ДР 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Заключним етапом отримання високоочищеного стерильного аераційного повітря є використання індивідуальних фільтрів, в яких ступінь очищення становить 99,999 %. Дані фільтри (Ф-10,11) встановлюють перед ферментером (Фр-9) для виробничого біосинтезу та на виході відпрацьованого повітря.

ДР 2. Підготовка та стерилізація поживних середовищ

ДР 2.1 Підготовка та стерилізація поживного середовища з метою вирощування інокуляту в колбах на качалках

На першій стадії необхідно приготувати 1,3 л поживного середовища. Все готуємо та стерилізуємо в лабораторному посуді в автоклаві. Формування композицій наведено в *табл. 6.2*.

Таблиця 6.2

Композиції для стерилізації компонентів поживного середовища в автоклаві

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 1300 мл середовища, г (мл)	Композиція	Об'єм композиції, мл
Триптон	12	15,6	А	150
Дріжджовий екстракт	24	31,2		
Вода		103		
КН ₂ РО ₄	2,31	3	Б	1095
К ₂ НРО ₄ ·3Н ₂ О	12,54	16,3		
Вода		1075		
Гліцерин	4	5,2	В	5,2
Канаміцин	0,05	0,07	Г	50
Вода		50		
<i>Разом:</i>		1300		1300

ДР 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують 15,6 г триптону та 31,2 г дріжджового екстракту. Наважки переносять у термостійку плоскодонну коблу об'ємом 300 мл і додають 103 мл води

дистильованої. З метою кращого розчинення компонентів вміст колби перемішують, а саму колбу нагрівають на водяній бані за температури 40 °С. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112°С упродовж 30 хв за тиску 0,05 МПа. Надходить (до ТП 3.4.).

ДР 2.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують наступні солі: 3 г KH_2PO_4 і 16,3 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Наважки переносять у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 3 л і додають 1075 мл води дистильованої. Перемішують для кращого розчинення компонентів, а після закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві за температури – 131°С тиску – 0,2 МПа, впродовж 40 хвилин (до ТП 3.4.).

ДР 2.1.3 Приготування та стерилізація композиції В

За використання стерильної піпетки відміряють 5,2 мл гліцерину. Даний компонент поживного середовища не потребує стерилізації (до ТП 3.4.).

ДР 2.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують 0,07 г канаміцину. Наважку даного антибіотика переносять у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 100 мл і додають 50 мл води дистильованої. Ретельно перемішують. Розчин стерилізують, за використання фільтру з порами 0,2 мкм (до ТП 3.4.).

ДР 2.2 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування у виробничому ферментері об'ємом 30 л

На стадії виробничого культивування необхідно приготувати 13,6 л поживного середовища. Зазначимо, що 10% припадає на конденсат, який утворюється під час стерилізації середовища у самому ферментері. Для приготування композицій А, В, Г, Д використовуємо лабораторний посуд і стерилізуємо за відповідних параметрів, окрім композиції В (не потребує стерилізації), а для композицій Б використовуємо реактор для приготування сумішей об'ємом 23 л, а стерилізуємо у ферментері для виробничого біосинтезу об'ємом 30 л. Формування композицій наведено в табл. 6.3.

**Композиції для стерилізації компонентів поживного середовища
у ферментері об'ємом 30 л**

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	Кількість для приготування 13,6 середовища, кг (л)	Композиція	Об'єм композиції, л
Триптон	12	0,163	А	1,5
Дріжджовий екстракт	24	0,326		
Вода		1		
КН ₂ РО ₄	2,31	0,031	Б	12
К ₂ НРО ₄ ·3Н ₂ О	12,54	0,171		
Конденсат		1,2		
Вода		10,6		
Гліцерин	4	0,054	В	0,054
Канаміцин	0,05	0,0007	Г	0,051
Вода		0,05		
ІРТГ	0,24	0,0033	Д	0,053
Вода		0,05		
Разом:		13,6		13,6

ДР 2.2.1 Приготування та стерилізація композиції А

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують 0,163 кг (163 г) триптону та 0,326 кг (326 г) дріжджового екстракту. Наважки переносять у термостійку плоскодонну коблу об'ємом 3 л і додають 1 л води питної. З метою кращого розчинення компонентів вміст колби перемішують, а саму колбу нагрівають на водяній бані за температури 40 °С. Закривають колбу ватно-марлевою пробкою і стерилізують в автоклаві при 112°С упродовж 30 хв за тиску 0,05 МПа. Надходить (до ТП 4.1).

ДР 2.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують наступні солі: 0,031 кг (31 г) КН₂РО₄ і 0,171 кг (171 г) К₂НРО₄·3Н₂О. Наважки переносять у реактор-змішувач (РЗ-8) і доливають 10,6 л води питної, попередньо врахувавши і віднявши конденсат (1,2 л). Для кращого розчинення компонентів при постійному перемішуванні (50-100 об/хв) за допомогою лопатевої мішалки, якою оснащений реактор і вмикають тен для підігріву середовища в апараті до температури 40°С. Далі вміст реактора самоплином подають у апарат для

виробничого виробничого біосинтезу (ФР-9) для стерилізації композиції. Ферментер (Фр-9), з композицією розчину солей, стерилізують подачею гострої пари. Параметри стерилізації: за температура – 131°C, тиску 0,2 МПа, протягом 40 хвилин. Надходить (до ТП 4.1).

ДР 2.2.3 Приготування та стерилізація композиції В

За використання стерильної мірної колби відміряють 0,054 л (54 мл) гліцерину. Даний компонент поживного середовища не потребує стерилізації (до ТП 4.1).

ДР 2.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г

На технічних вагах у попередньо відтарованій ємності зважують 0,0007 кг (0,7 г) канаміцину. Наважку даного антибіотика переносять у термостійку плоскодонну колбу об'ємом 100 мл і додають 50 мл води дистильованої. Ретельно перемішують. Розчин стерилізують, за використання фільтру з порами 0,2 мкм (до ТП 4.1).

ДР 2.2.5 Приготування та стерилізація композиції Д

На технічних вагах, у попередньо відтарованій ємності, зважують 0,0033 кг (3,3 г) IPTG. Наважку переносять у колбу об'ємом 100 і додають 50 мл води дистильованої та перемішують. Розчин стерилізують, за використання фільтру з діаметром пор 0,2 мкм (до ТП 4.1).

ТП 3. Підготовка посівного матеріалу

ТП 3.1 Підтримання колекційної культури.

Колекційну культуру *E. coli* BL21 (DE3) зберігають у пробірках на скошеному МПА з канаміцином при температурі 4°C. Кожні 3-4 місяці в асептичних умовах проводять регулярні пересіви.

ТП 3.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі.

Трансформовані клітини *E. coli* BL21 (DE3) плазмідом рЕТ28-gD-315 розсівають мікробіологічною петлею на чашки Петрі з LB середовищем, доповненим канаміцином, до ізольованих колоній. Інкубацію проводять при 37°C протягом 24 годин.

ТП 3.3 Вирощування робочої культури в пробірках.

Ізольовані колонії, отриманні з попередньої стадії, за використання мікробіологічної петлі, пересівають петлею у пробірки зі скошеним LB середовищем з канаміцином із розрахунку - одна ізольована колонія використовується для засіву однієї пробірки. У пробірки пересівають ізольовані колонії, що знаходяться на відстані не менше 1 см. Тривалість вирощування протягом 24 год за температури 37°C.

ТП 3.4 Вирощування культури в колбах на качалках

Для вирощування рідкого посівного матеріалу у засівну колбу об'ємом 3 л, з 1095 мл композиції Б (від ДР 2.1.2) в асептичних умовах вносять 150 мл композиції А (від ДР 2.1.1), 5,2 мл композиції В (від ДР 2.1.3) та 50 мл композиції Г (від ДР 2.1.4). Ретельно перемішують і розливають по 125 мл у десять попередньо простерилізованих качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірку з робочою культурою, вирощеної на LB середовищі з канаміцином, вносять 10 мл фізіологічного розчину, суспендують клітини (змивають культуру), піпеткою відбирають одержану бактеріальну суспензію і вносять у колби з розлитим ТВ поживним середовищем. Для засіву однієї колби використовують бактеріальну суспензію одержану з однієї пробірки. Тривалість вирощування – 24 год за температури 37°C, перемішуванням 150 об/хв та оптимальним рН = 6,8-7,2.

Після закінчення даного процесу проводять наступний контроль: мікробіологічний аналіз культуральної рідини кожної колби та визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту. Після його проведення посівний матеріал з колб вносять в стерильну засівну колбу об'ємом 3 л.

ТП 4. Біосинтез

ТП 4.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 30 л

У попередньо простерилізований апарат (Фр-9) об'ємом 30 л, де міститься 12 л композиції Б (від ДР 2.2.2), в асептичних умовах за допомогою факела у патрубках подається 1,5 л композиції А (від ДР 2.2.1), 54 мл розчину композиції В (від ДР 2.2.3), 51 мл стерильного розчину композиції Г

(від ДР 2.2.4) і посівний матеріал *E. coli* BL21(DE3) (pET28-gD-315) (через засівну колбу від ТП 3.4).

На початку культивування вмикають мішалку і барботер. Далі культивування здійснюється за оптимальної температури 37°C, з відповідним ступенем аерації, перемішуванням 150 об/хв, при цьому також подається стерильне аераційне повітря. Загальна тривалість процесу складає 30 години при рН = 6,8-7,2. Надлишковий тиск становить 0,02 МПа. Рівень піни контролюється антипінним диском, яким оснащений даний ферментер. При досяганні OD₆₀₀=0,8 (24 год) додають 53 мл стерильного розчину IPTG (від ДР 2.2.5) для індукції синтезу рекомбінантного глікопротеїну D (gD), та культують ще 6 год при швидкості перемішування 200 об/хв. Через кожних 12 год відбирають проби для проведення мікробіологічного контролю та визначення концентрацій біомаси, джерела вуглецю і азоту (C, N). Визначення концентрації рекомбінантного gD проводять кожних 3 год після внесення індуктора.

Коли концентрація рекомбінантного глікопротеїну gD, який синтезується у вигляді тілець включень, становитиме 355 мг/л – культивування припиняється.

ЗВ 5. Знешкодження відходів

ЗВ 5.1 Знешкодження газоподібних відходів

Знешкодження відпрацьованого повітря на стадії виробничого біосинтезу (від ТП 4.1) здійснюється за використання системи біологічного очищення газових потоків біоскрубера, де витягнені із газів компоненти розкладаються при контактуванні їх із суспензією активного мулу.

6.3 Контроль виробництва глікопротеїну D

Протягом всього процесу культивування рекомбінантного продуцента кожні 12 годин відбирають проби культуральної рідини та здійснюють наступні процеси та їх моніторинг:

- мікробіологічний контроль (висів проб на щільні поживні середовища та мікроскопіювання зразків);
- визначення показників росту культури (концентрація біомаси);
- контроль ефективного споживання компонентів поживного середовища (вміст джерела вуглецю - гліцерин та джерела амінного азоту - триптон і дріжджовий екстракт).

Контроль синтезу цільового продукту (глікопротеїну D) проводять під час виробничого біосинтезу кожних 3 години після внесення індуктора IPTG.

Мікробіологічний контроль

Для визначення чистоти культури застосовують одночасно два способи: мікроскопіювання з імерсією та висів проби на щільні поживні середовища.

Мікроскопіювання зразків. Враховуючи довготривалість отримання результатів методу висіву на поживні середовища, в основному чистому культурі контролюють мікроскопіюванням, як значно швидшого методу виявлення мікрофлори, в тому числі і сторонньої.

Для цього готують препарат фіксованих забарвлених клітин і розглядають його з імерсією: за допомогою стерильної бактеріологічної петлі або ж піпетки краплю суспензії мікроорганізму наносять на знежирене предметне скло. Досліджуваний матеріал рівномірно тонким шаром розподіляють на площі поверхні 1-2 см². Здійснюють підсушування зразку та його фіксацію. Після на мазок наносять 2-3 краплі метиленового синього на 2-3 хв. Потім препарат висушують на повітрі і промокають фільтрувальним папером та мікроскопіюють з імерсією [121].

Штам *E. coli* BL21 (DE3) являє собою короткі поліморфні рухомі і нерухомі грамнегативні палички з відповідними розмірами: довжина 1-3 мкм, ширина 0,5-0,8 мкм (рис. 6.1), які розташовані поодинокі чи парами та не

утворюють спор [122]. У випадку виявлення мікробіоти з іншими морфолого-культуральними ознаками обов'язково здійснюють висів на щільні поживні середовища.

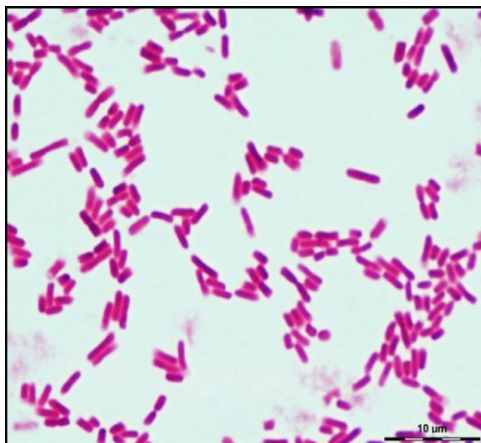


Рис. 6.1 Escherichia coli BL21 (DE3) під мікроскопом (збільшення ×90)

Висів на щільні поживні середовища. Окрім мікроскопіювання зразків, чистоту культур мікроорганізмів обов'язково перевіряють висівом на щільні поживні середовища.

Визначену пробу культуральної рідини розсівають петлею до ізольованих колоній на чашки Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) для виявлення бактерій, з сусло-агаром (СА) - для виявлення дріжджів і грибів та на LB середовище з канаміцином для ідентифікації клітин штаму *E. coli* BL21 (DE3).

Критерієм чистоти є відсутність колоній інших мікроорганізмів, а також однорідність вирослих колоній штаму *E. coli* BL21 (DE3) [123]. Колонії круглі, прозорі з сірувато-блакитним відливом.



Рис 6.2 Колонії Escherichia coli BL21 (DE3) на МПА

Визначення показників росту та синтезу

Визначення концентрації біомаси.

Концентрацію біомаси визначаємо за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком. За високих концентрацій клітин в культуральній рідині відбувається вторинне розсіювання світла, котре призводить до отримання значно занижених результатів. Таким чином суспензії культуральної рідини великої щільності перед вимірюванням необхідно розводити водою. Для цього у пробірки вносимо 9 мл дистильованої води і 1 мл культуральної рідини. Суміш збовтуємо, переливаємо у кювету об'ємом 1 мл і вимірюємо оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 600 нм, за якої поглинання світла даною суспензією клітин є мінімальним. Приріст клітинної біомаси реєструють фотометричним методом, заснованим на здатності бактеріальної суспензії поглинати або розсіювати світло пропорційно кількості бактерій, за оптичною щільності культуральної рідини. При $OD_{600} = 0,8$ значення біомаси буде $\sim 3,4$ г/л культуральної рідини [6].

Визначення концентрації цільового продукту - глікопротеїну D

Використовуємо метод Бредфорда (колориметричний кількісний метод визначення концентрації білку в розчині) для визначення концентрації вакцинного білку в попередньо підготовлених та очищених зразках проби культуральної рідини.

Суть методу. При взаємодії підготовленого зразку, методом послідовних реакцій виділення та очищення від баластних речовин, із кислотно-синім барвником Кумасі отримаємо забарвлений розчин інтенсивність якого вимірюємо на спектрофотометрі при довжині хвилі 595 нм.

Підготовка проби. Культуральну рідину об'ємом 50 мл ресуспендують в крижаному ультразвуковому буфері (50 мМ Трис-НСl, 5 мМ ЕДТА, 1 мМ фенілметилсульфоніл фторид, рН 8,0). Далі зразок лізують обробкою ультразвуком (фаза сплеску 30 секунд / фаза спокою 30 секунд / 130 Вт) протягом 8 циклів, використовуючи ультразвуковий процесор. Отримані клітинні лізати, з

гетерологічними білками центрифугують при 12 000 об/хв протягом 30 хв за температури 4°C, отримуючи при цьому гранули, що містять глікопротеїн D у вигляді тілець-включень. Отримані гранули промивають двічі, спочатку промивним буфером (1% дезоксихолат натрію, 2% Тритон X-100, 50 мМ Тріс–HCl, 5 мМ ЕДТА, рН 8,0), а потім водою Milli Q, де тілець-включень ресуспендують, проводячи реакцію ультразвуком протягом 2 циклів і подальшого повільного перемішування протягом 30 хв на трубчастому ротаторі. Після кожного циклу ресуспензійного промивання тілець-включень зразок центрифугували при 12000 об/хв протягом 30 хв за температури 4°C.

Техніка визначення. Попередньо очищені гранули вакцинних тілець-включень розчиняють в буфері А (8 М сечовини, 50 мМ Тріс-HCl, рН 8,5), далі зразок центрифугують, а супернатанти завантажують на колони аніонообмінної хроматографії із застосуванням сефарозної смоли ДЕАЕ, попередньо збалансувавши буфером А. Після 5 об'ємних промивань колони буфером В (8 М сечовини, 50 мМ Тріс – HCl, 5 мМ NaCl, рН 7,0), зв'язаний у колонці білок елюювали за допомогою буфера С (8 М сечовини, 50 мМ Тріс – HCl, 50 мМ NaCl, рН 7,0).

Елюйовані зразки аналізували за допомогою 12% SDS-PAGE (гель-електрофорез) і очищені фракції елюції змішували між собою, а концентрацію білка в отриманих об'єднаних зразках оцінювали за методом Бредфорда [6].

Отриманий очищений від баластних речовин зразок доводять до 0,5 мл дистильованою водою. Далі додають 0,5 мл реагенту Бредфорда, ретельно перемішують і чекають появу синього забарвлення (від 5 хв до 30 хв). Після вимірюють оптичну щільність, утвореного забарвлененого розчину, на спектрофотометрі при довжині хвилі 595 нм в кюветі об'ємом 1 мл. Вимірюють концентрацію поверхневого білка глікопротеїну D в пробі користуючись калібрувальним графіком залежність величини поглинання світла від концентрації білка в розчині.

Вміст досліджуваного білка (глікопротеїну D) в розчині розраховують за калібрувальним графіком, який будують в межах від 0,01 до 0,10 мг стандартного

зразка досліджуваного білка в 0,1 мл розчину. Калібрувальний графік будують при кожному аналізі [124].

Контроль споживання основних компонентів поживного середовища

Підготовка проби. Для визначення концентрації джерел вуглецю і азоту необхідно з дотриманням асептичних умов відібрати 40 мл культуральної рідини та відділити біомасу шляхом центрифугування при 6000 об/хв впродовж 20 хв.

Концентрація джерела вуглецю. В середовищі джерелом вуглецю слугує трьохатомний спирт - гліцерин. Для визначення його концентрації використовують достатньо велику кількість методів: застосування ВВЕРХ, тест наборів для ферментативного аналізу гліцеролу, дегідрогеназний метод, використання аналізатору загального органічного вуглецю ТОС-L тощо.

Серед всіх запропонованих оптимально-простим та швидким з економічної та виробничої точок зору варто запропонувати колориметричний метод з хромотроповою кислотою.

Суть методу. В результаті проведення хімічної реакції окислення гліцерину періодатом натрію в сірчано-кислом розчині з утворенням формальдегіду та його подальша реакція з хромотроповою кислотою та утворення ауринового фарбника, інтенсивність якого визначають колориметричним методом за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 570 нм.

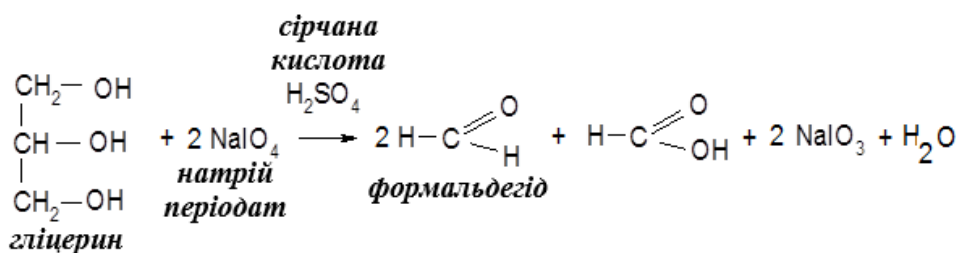


Рис. 6.3 Окислення гліцерину кислим періодатом натрію

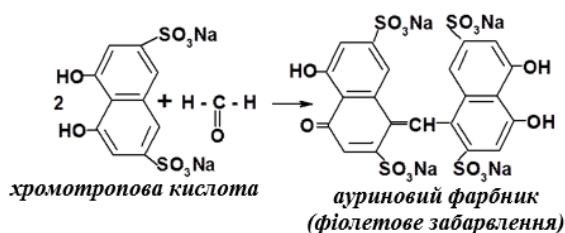


Рис. 6.4 Взаємодія формальдегіду з хромотроповою кислотою

Техніка визначення. За допомогою самплера відбирають 20 мкл зразка (підготовленої проби культуральної рідини) і вносять у пробірку об'ємом 15 мл і додають 10 мл води дистильованої. Далі 2 мл розведеної проби переносять у чисту пробірку об'ємом 5 мл, а в контрольну пробірку об'ємом 5 мл додають 2 мл води дистильованої. В обидві пробірки додають 0,1 мл 10 н H_2SO_4 і 0,5 мл 0,1 М $NaIO_4$. Витримують 5 хв і додають 0,5 мл $NaHSO_3$. Ретельно перемішують протягом 5 хв і відбирають по 1 мл суміші з кожної пробірки, які переносять в пробірки об'ємом 10 мл з притертим шліфом і додають по 5 мл хромотропової кислоти. Кожну пробірку закривають скляною кришкою і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30 хв. Далі пробірки охолоджують при кімнатній температурі і вимірюють оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 570 нм. В якості розчину порівняння використовують дистильовану воду.

Розрахунок концентрації гліцерину в пробі. Концентрацію гліцерину (г/л) в аналізованому зразку супернатанту розраховували за використання калібрувального графіка - стандартної кривої гліцерину з відомими його концентраціями.

Для цього готують серію стандартних розчинів з відомими концентраціями гліцерину, додають необхідні реагенти та вимірюють оптичну густину цих розчинів за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 570 нм [125].

Концентрація джерела азоту. В середовищі джерелом азоту слугує амінний азот (входить до вільних аміногруп ($-NH_2$), пептидів тощо) в якості триптонну та дріжджового екстракту, який визначають методом Сьоренсена (формольне титрування).

Суть методу: полягає у здатності формальдегіду зв'язувати вільні аміногрупи з утворенням метиленових похідних амінокислот (утворення основ Шифа - метиленамінокислот) і алкалометричним титрування еквівалентної кількості карбоксильних груп.



Рис. 6.5 Утворення метиленових похідних

Аміногрупи при цьому втрачають основні властивості, а вільні карбоксильні групи відтитровують розчином лугу:

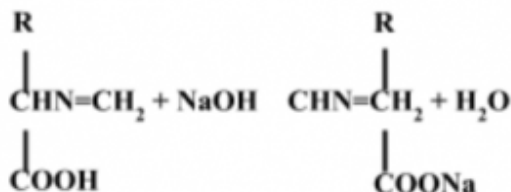


Рис. 6.6 Алкалометричне титрування карбоксильних груп розчином лугу

Техніка визначення: У склянку ємністю 50 мл внести 17 мл дистильованої води і 3 мл випробуваного зразка (попередньо підготовленої проби). Занурити в отриману суміш електроди рН - метри. При постійному перемішуванні титрувати рН суміші 0,1 М розчином їдкого натру до рН 7,0. Додати в отриманий розчин 2 мл формальдегіду розчину 35% і при постійному перемішуванні титрувати 0,1 М розчином їдкого натру до рН 9,2, що не змінюється при перемішуванні протягом 2 хв, або до появи слабо-рожевого забарвлення (індикатор - фенолфталеїну розчин 1%). Визначити (зафіксувати) кількість мл 0,1 М їдкого натру, який пішов на титрування.

Повторити випробування ще раз. Одночасно провести контрольне випробування, додавши замість 3 мл досліджуваного супенатанту 3 мл дистильованої води для перевірки реактивів. Визначити (зафіксувати) кількість мл 0,1 М їдкого натру, який пішов на титрування.

Розрахунок концентрації азоту в пробі. Розраховуємо вміст амінного азоту в досліджуваному розчині в двох паралельних визначеннях (X_1 і X_2) за формулою:

$$X\% = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 1,4 \cdot 100}{3}$$

V - кількість розчину натрій гідроксиду 0,1 М, взятого на титрування досліджуваного розчину (мл);

V₁ - кількість розчину натрій гідроксиду 0,1 М, взятого на титрування контрольної проби (мл);

K - уточнюючий коефіцієнт до титру розчину натрій гідроксиду (0,1 М);

1,4 - кількість азоту, що відповідає 1 мл 0,1 Н розчину їдкого натру, мг;

3 - кількість дослідного зразка, взятого на аналіз, мл.

Допускається розбіжність між результатами паралельних визначень не більше ніж $\pm 3\%$.

Розраховуємо середнє арифметичне значення результатів, отриманих при проведенні двох паралельних визначень амінного азоту в досліджуваних зразках, за формулою:

$$X_{\text{ср.}} \% = \frac{X_1 - X_2}{2}$$

Середнє арифметичне значення, отримане з двох паралельних досліджень вмісту амінного азоту в досліджуваних зразках є остаточним результатом [126].

Карта постадійного контролю виробництва глікопротеїну D

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
ДР 1 Підготовка аераційного повітря				
Кт 1.2 Очищення повітря у фільтрі грубої очистки	Повітря на виході із фільтра грубої очистки, ступінь очищення та перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 80 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Компресування повітря	Стиснене повітря, температура і тиск	Манометр технічний, термометр	Після компресування повітря	P = 0,8 МПа, t = 120-150 °C
Кт 1.4 Кондиціонування повітря	Охолоджене повітря і температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 17-20 °C, W = 60 %
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря і температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 30 °C
Кт 1.6 Очищення повітря в головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення та перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеню очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у головного фільтра	E = 95-98 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.7 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення та перепад тисків	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в індивідуальному фільтрі	E = 99,999 %, тиск згідно паспорту

1	2	3	4	5
ДР 2 Підготовка та стерилізація поживних середовищ				
ДР 2.1 Підготовка та стерилізація поживного середовища з метою вирощування інокуляту в колбах на качалках				
Кт, Км 2.1.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр та мікробіологічний контроль	Температура і тиск вимірюються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, $P = 0,05\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.1.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск вимірюються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,2\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт 2.1.3 Приготування композиції В	Композиція В, кількість	Стерильна піпетка	Об'єм вимірюємо стерильною піпеткою перед внесенням в поживне середовище	$V = 5,4\text{ мл}$
Кт, Км 2.1.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, діаметр пор, стерильність	Мембранні фільтри з відповідним діаметром пор, мікробіологічний контроль	Діаметр пор перевіряється перед початком стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$d = 0,2\text{ мкм}$, відсутність мікробіоти
ДР 2.2 Підготовка та стерилізація поживного середовища для культивування у виробничому ферментері об'ємом 30 л				
Кт, Км 2.2.1 Приготування та стерилізація композиції А	Композиція А, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр та мікробіологічний контроль	Температура і тиск вимірюються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30\text{ хв}$, $P = 0,05\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.2 Приготування та стерилізація композиції Б	Композиція Б, температура, час, тиск стерильність	Термометр технічний, годинник, манометр, мікробіологічний контроль	Температура і тиск вимірюються безперервно під час стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	$t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\tau = 40\text{ хв}$, $P = 0,2\text{ МПа}$, відсутність мікробіоти

1	2	3	4	5
Кт 2.2.3 Приготування композиції В	Композиція В, кількість	Стерильна мірна колба	Об'єм вимірюємо стерильною мірною колбою перед внесенням в поживне середовище	V = 54 мл
Кт, Км 2.2.4 Приготування та стерилізація композиції Г	Композиція Г, діаметр пор, стерильність	Мембранні фільтри з відповідним діаметром пор, мікробіологічний контроль	Діаметр пор перевіряється перед початком стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	d = 0,2 мкм, відсутність мікробіоти
Кт, Км 2.2.5 Приготування та стерилізація композиції Д	Композиція Д, діаметр пор, стерильність	Мембранні фільтри з відповідним діаметром пор, мікробіологічний контроль	Діаметр пор перевіряється перед початком стерилізації, мікробіологічний контроль після стерилізації	d = 0,2 мкм, відсутність мікробіоти
ТП 3 Підготовка посівного матеріалу				
Кт, Км 3.1 Підтримання колекційної культури <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Колекційна культура <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Температура, тривалість пересівів, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час зберігання, пересіви у визначений термін, мікробіологічний контроль після пересівів та збереження	t = 4 °C, τ = 3-4 місяці, відсутність сторонньої мікробіоти, колонії круглі, прозорі з сірувато-блакитним відливом
Кт, Км 3.2 Одержання робочої культури на агаризованому середовищі	Робоча культура <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28-gD-315 Морфологічна, однорідність трансформованих клітин плазмідною pET28-gD-315 температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після трансформації клітин та їх наступного вирощування	t = 37°C, τ = 24 год, відсутність сторонньої мікробіоти, колонії круглі, прозорі з сірувато-блакитним відливом

1	2	3	4	5
Кт, Км 3.3 Вирощування робочої культури в пробірках	Посівний матеріал Морфологічна, однорідність, температура, тривалість вирощування, відсутність сторонньої мікробіоти	Термометр, годинник, мікробіологічний контроль	Температура визначається безперервно під час вирощування, мікробіологічний контроль проводять після вирощування	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, відсутність сторонньої мікробіоти, колонії круглі, прозорі з сірувато-блакитним відливом
Кт, Кх, Км 3.4 Вирощування культури в колбах на качалках	Посівний матеріал Температура, тривалість вирощування, рН, частота обертів мішалки, мікробіологічна чистота культури, визначення концентрації біомаси, джерела вуглецю і азоту	Термометр технічний, годинник, датчик рН, тахометр, та мікробіологічний контроль, спектрофотометр, колориметричний метод, метод Сьоренсена	Температура та швидкість обертання контролюються автоматично весь час вирощування, рН визначається перед культивуванням та під час культивування, мікробіологічний контроль та концентрація біомаси, джерела вуглецю і азоту після вирощування	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 24$ год, $\text{pH} = 6,8-7,2$ $\omega = 150$ об/хв $c(\text{X}) = 3,4$ г/л $c(\text{C})$, $c(\text{N})$, відсутність сторонньої мікробіоти
ТП 4 Виробничий біосинтез				
Кт, Кх, Км 4.1 Виробниче культивування у ферментері об'ємом 30 л	Культуральна рідина Температура, тривалість вирощування, рН, частота обертів мішалки, надлишковий тиск, мікробіологічна чистота культури та визначення оптичної щільності, концентрації біомаси, джерела вуглецю та азоту і визначення концентрації рекомбінантного глікопротеїну gD	Термометр технічний, годинник, датчик рН, тахометр, манометр, мікробіологічний контроль, спектрофотометр, колориметричний метод, метод Сьоренсена, метод Бредфорда з попередньою підготовкою та очищенням зразку	Температура і швидкість обертання автоматично контролюється та підтримується на зазначеному рівні під час вирощування, рН визначається перед культивуванням та під час нього, мікроскопіювання та визначення оптичної щільності, концентрації біомаси, джерела вуглецю і азоту кожні 12 год, а концентрація рекомбінантного глікопротеїну gD кожні 3 години після внесення індуктора IPTG	$t = 37^{\circ}\text{C}$, $\tau = 30$ год, $\text{pH} = 6,8-7,2$ $\omega = 150-200$ об/хв $P_{\text{надл.}} = 0,02$ МПа, При $\text{OD}_{600} = 0,8$ вносимо IPTG $c(\text{X}) = 3,4$ г/л $c(\text{C})$, $c(\text{N})$, $c(\text{gD}) = 355$ мг/л, відсутність сторонньої мікробіоти

РОЗДІЛ 7. Опис технологічного процесу виробництва субодиночної вакцини проти ВПГ-2

7.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва субодиночної протигерпетичної вакцини

Специфікація обладнання, що зображене на апаратурній схемі (див. графічна частина), розписане у *табл. 7.1*.

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання виробництва субодиночної вакцини проти ВПГ-2 на основі поверхневого антигену глікопротеїну D

Позиція	Найменування обладнання	Кількість	Характеристика
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозбірник	1	Пристрій для забору повітря даховий, моделі RUCK DNA фірми «Кліматкомплект» виготовлений з високоякісного пластику ASA, стійкого до погодних умов і УФ-випромінювання та обладнаний оцинкованою металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Ступінь захисту пристрою IP33. Максимальна робоча температура повітря, що транспортується до + 80°C. Країна виробник: Україна ¹ .
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр FILTERCEL WRE-12241, класу G4 компанії «General filter». Вогнетривкий. Фільтруючий матеріал – поліестер з перфорованим картоном. Продуктивність – 10 м ³ /хв. Ефективність: E = 90%. Перепад тиску: 70 – 250 Па. Виробник: Італія ² .
В-3 В-7	Вентилятор	2	Камінний відцентровий промисловий вентилятор моделі КАМ 150 фірми VENTS. Його корпус виготовлений з оцинкованої сталі з використанням тепло- та звукоізоляційного матеріалу з негорючої мінеральної вати. Включення вентилятора можливе в діапазоні від 0°C до +90°C. Використовується для повітроводів діаметром 150 мм. Рівень шуму - 45 дБ. Продуктивність - 13 м ³ /хв. Частота обертання 2770 об/хв Виробник: Україна ³ .

					НУХТ БТЕК 02.02.04 КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Бондарчук В.І.			Розділ 6. Опис технологічного процесу виробництва субодиночної вакцини проти ВПГ-2	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушів</i>
<i>Консульт.</i>							141	173
<i>Керівник</i>		Скроцька О.І.				Кафедра БТМ		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Зав. каф.</i>		Стабніков В.П						

К-4	Кондиціонер	1	Кондиціонер DAIKIN FDXS35F/RXS35L3/ Потужність - 1,15 Вт. Напруга 220-240 В. Холодоагент - R410A. Теплопродуктивність - 4 кВт. Виробник: Чехія ⁴ .
Ф-5 Ф-27 Ф-31	Головний фільтр очистки (тонкої)	3	Фільтр FILTERCEL HT9-12241, класу F9 компанії «General filter». Вогнетривкий. Фільтруючий матеріал – мікроскловолокно з оцинкованими розділювачами. Продуктивність – 8 м ³ /хв. Ефективність: E > 95%. Перепад тиску: 260 – 300 Па. Виробник: Італія ⁵ .
ФН-6 ФН-8	Фільтр HEPA	2	Високопродуктивні HEPA фільтри моделі HQ121212 призначені для високоефективної (фінішної) очистки повітря. Максимальний робочий діапазон температури: 100°C. Продуктивність: 12 м ³ /хв. Ступінь очищення повітря більше 99,95%. Перепад тиску: 270 – 600 Па. Виробник: Італія ⁶ .
Н-9, Н-11, Н-13, Н-15	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий Grundfos JP 5-48 S-BBVP фірми ТОВ «ВІК-XXI». Продуктивність: 5 м ³ /год. Максимальний тиск: 6 бар. Температура до 40°C. Матеріал: н/ж сталь AISI316 Виробник: Угорщина ⁷ .
Ф-10	Піщаний фільтр для очистки води, заповнений піском	1	Промисловий піщаний фільтр великої ємності для очищення води. Продуктивність: 9 м ³ /год. Матеріал: н/ж сталь AISI316. Виробник: Україна ⁸ .
УПВ-12	Установка для пом'якшення води	1	Промислова система пом'якшення води cosoft FU 2472CE15. Продуктивність: 11 м ³ /год. Корпус фільтра заповнений аніоннообмінною смолою. Робочий тиск: 2-6 бар. Матеріал: н/ж сталь AISI316. Виробник: Україна ⁹ .
Ф-14	Вугільний фільтр, що заповнений активованим вугіллям	1	Фільтриз активованим вугіллям АКФ 31/30. Продуктивність: 9 м ³ /год. Діаметр фільтра: 0,762 м. Мінімальна подача води для промивання фільтра - 11 м ³ /год. Фільтруючий елемент стримує активоване вугілля та дрібний пісок: перший компонент поглинає розчинені домішки, а пісок затримує дрібні сторонні частки. Матеріал: н/ж сталь AISI 316 Виробник: Росія ¹⁰ .
УЗ-16	Установка зворотноосмотична	1	Промислова система зворотного осмосу OSFIL-5000 продуктивністю 5000 л/год очищеної води трьоступенева. Продуктивність – 5 м ³ /год. Робочий тиск: 1,5-6 бар. Максимальна робоча температура: 40°C. Ступінь видалення солей з очищеної води - до 99,9%. Виробник: Україна ¹¹ .

Н-17,Н-19, Н-21,Н-23	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий Grundfos JP 3-42 S-BBVP фірми ТОВ «ВІК-ХХІ». Продуктивність: 3 м ³ /год. Максимальний тиск: 6 бар. Температура до 40°C. Матеріал: н/ж сталь AISI316 Виробник: Угорщина ⁷ .
ГФ-18	Установка для одержання води ін'єкційної	1	Багатоступінчастий дистильатор тесо 4МЕ40. Призначений для отримання води для ін'єкцій, яка відповідає вимогам ФС.2.2.0019.15 Державної Фармакопеї, а також фармакопеї Європейського союзу (EP) та США (USP). Матеріал, що контактує з ВДІ - н/ж сталь AISI 316. Продуктивність по дистильату: 2 м ³ /год. Число колон - 4 шт., число підігрівників - 4 шт., Необхідний тиск технічної пари - 8 бар, шорсткість внутрішньої поверхні менше 0,8 мкм. Виробник: Росія ¹² .
З-20 З-22	Збірник води для ін'єкцій	2	Реактор хімічний на 2 м ³ з нержавіючої сталі AISI - 316 L, обладнаний сорочкою, мішалкою, торцевим ущільненням, електроприводом. Діапазон робочих температур від -25 до 300°C. Виробник: Україна ¹³ .
КТ-24	Кожухотрубний теплообмінник	1	Кожухотрубний теплообмінник SECESPOL B45.FF. Межі робочої температури: -10°C до +200°C. Максимальний тиск: 16 бар. Потужність: 13кВт. Матеріал: н/ж сталь 316L із 3% молібдену. Виробник: Росія ¹⁴ .
КУ-25	Установка миття, силіконування, стерилізації і сушіння гумових пробок та алюмінієвих ковпачків	1	Машина мийки, стерилізації (силіконування), сушіння гумових пробок та алюмінієвих ковпачків, MM-10000. Є повністю закритим модулем з трьома секціями - миття, стерилізації та сушіння. Усі технологічні операції виконуються автоматично. Система управління на базі програмованого контролера ПЛК з функцією безперервного моніторингу. Продуктивність: 10000 шт/год. Потужність: 13.5 кВт. Виробник: Росія ¹⁵ .
Ф-26 Ф-29 Ф-46	Фільтр для фільтрації води ін'єкційної	4	Глибинний фільтр ЕКОПЛАСТ-Ф марки ЕФП-100-L на основі політетрафторетилену марки фторопласт-4, корпус з нержавіючої сталі. Рекомендована швидкість потоку рідини - 300 л/год. Номінальна тонкість фільтрації: 0,2 мкм. Виробник: Росія ¹⁶ .
АМ-28	Автомат для миття та сушіння флаконів	1	Машина для миття ампул і флаконів SYD-10. Має чотири приймальні блоки в яких встановлені контейнери із флаконами. Кришка машини герметично закрита. В середині розташовані форсунки, які подають воду під тиском. Сушка відбувається за рахунок відцентрового обертання ємностей із флаконами. Продуктивність 15 000 флаконів за годину (1-20 мл). Швидкість обертів: 520 об/хв. Тиск змиву: 0,2 Мпа. Матеріал: н/ж сталь AISI316.. Виробник: Росія ¹⁷ .

СТ-30	Стерилізатор тунельний	1	Автоматичний стерилізатор тунельного типу ГКа-100М зрухомою нержавістальною стрічкою. Стерилізатор тунельного типу складається з трьох зон: нагрівання (термічної стерилізації), охолодження та обробки УФ випромінюванням та теплоелектронагрівачем. Стерилізатор оснащений системою захисту від перепадів напруги, а також датчиками, які своєчасно сигналізують про виникнення несправностей. Укомплектований фільтрами для очищення повітря. Продуктивність: 12 000 шт/година. Виробник: Росія ¹⁸ .
З-32	Збірник культуральної рідини з мішалкою та сорочкою	1	Збірники об'ємом 20 л з мішалкою 40 об/хв фірми ООО "Аврора ПАК Инжиниринг". Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений сорочкою. Габаритні розміри: (Ш×В×Д) 335×475×440 (мм). Країна виробник - Росія ¹⁹ .
Н-33 Н-48 Н-50 Н-52	Насос перестальтичний	4	Насос перестальтичний Rotho PSF3 фірми «Ватерпасс». Продуктивність - 183 л/год. Тиск - до 12 бар. Діаметр з'єднань - 10 мм. В'язкість - до 1000 кПа. Температура - до + 150 °С. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Країна виробник - Україна ²⁰ .
Ц-34	Центрифуга осаджувальна (відстійна) промислова	1	Центрифуга осаджувальна вертикальна із ручним верхнім вивантаженням осаду на платформі серії TDZ450 фірми «Мида» із вибухозахищеним електроустаткуванням. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Максимальна частота частотам обертання 6000 об/хв. Фактор розділення: 1200. Об'єм барабана - 20 л. Габаритні розміри: (Ш×В×Д) 1400×1450×1600 (мм). Країна виробник - Росія ²¹ .
Д-35	Дезінтегратор ультразвуковий	1	Ультразвуковий гомогенізатор TF-150N із затвердженням SE з коробкою із звукоізоляцією та діапазоном регулювання температури процесу Частота: 20 кГц. Місткість: 150 мл. Потужність 2000 В. Габаритні розміри: (Ш×В×Д) 340×345×570 (мм). Країна виробник - Китай ²² .
Ц-36 Ц-38 Ц-40	Центрифуга осаджувальна (відстійна) лабораторного типу	3	Лабораторна центрифуга Sigma 3-16KL настільна універсальна з охолодженням фірми ТОВ "Редмед" із вибухозахищеним електроустаткуванням. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Максимальна частота частотам обертання 15000 об/хв. Фактор розділення: 1200. Робочий об'єм - 4 x 400 мл. Максимальний тиск: 23 бар. Діапазон налаштувань температурного режиму: -10 – +40°С. Габаритні розміри: (В×Ш×Г) 310×550×570 (мм). Країна виробник - Україна ²³ .

РХ-37	Реактор хімічний з мішалкою та сорочкою	1	Реактор хімічний на 5 л із захисною оболонкою моделі Р-5 оснащений внизу тefлоновим спускним клапаном фірми «ООО Азовхімсервіс». Діапазон робочих температур від -80 до 250°C. Швидкість перемішування: 50-1200 об./хв Габаритні розміри: (Д×Ш×В) 570×620×650 (мм). Країна виробник - Україна ²⁴ .
РХ-39	Реактор хімічний з мішалкою та сорочкою	1	Реактор хімічний на 2 л із захисною оболонкою моделі Р-2 оснащений внизу тefлоновим спускним клапаном фірми «ООО Азовхімсервіс». Діапазон робочих температур від -60 до 200°C. Швидкість перемішування: 50-1200 об./хв Габаритні розміри: (Д×Ш×В) 400×450×500 (мм). Країна виробник - Україна ²⁴ .
ХУ-41	Хроматографічна колонка	1	Колонка для аніонообмінної хроматографії PRP-X100 Anion Exchange HPLC Column фірми «Hamilton». Колонка з нержавіючої сталі нержавіюча сталь AISI-316L. Швидкість потоку елюента: 5 мл/хв. Тиск максимальний: 34 МПа. Температурна межа при рН 8-13: 5-30°C. Об'єм колонки: 50 мл. Матриця: сеароза Країна виробник - Велика Британія ²⁵ .
СХ-42	Стакан хімічний з ручкою	1	Стакан хімічний об'ємом 250 мл. Термостійке скло стійке до механічного та хімічного (агресивні реагенти) впливів. Виробник: Україна ²⁶ .
ГФ-43	Гель-фільтраційна установка для рефолдингу	1	Колонка для гель-фільтрації HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg фірми «Сутіва». Скляна колонка зі скловолокно (армоване поліпропіленом) по кінцям наконечники з поліаміду. Для глобулярних білків 10-600 кДа. Швидкість потоку елюента: 1 мл/хв. Тиск: 0,3 МПа. Об'єм колонки: 120 мл. Матриця: композит агарозного декстрану та сефодекс G-50. Габаритні розміри колонки (Д×Ш) 600×16 (мм). Країна виробник - Німеччина ²⁷ .
ВСШ-44	Вакуум-сушильна шафа	1	Вакуум-сушильна шафа BINDER VD 23 об'ємом 23 л з двома полицями фірми ООО НПП «Аналитпромприбор». Матеріал нагрівальної камери: нержавіюча сталь AISI-304. Робочий діапазон температур: + 10... 200°C. Тип управління: контролер OptiControl. Точність підтримки температури: ± 0,1°C. Дискретність установки температури 1°C. Габаритні розміри колонки: (Ш×Г×В) 515×500×665 (мм). Країна виробник - Росія ²⁸ .
ВМ-45	Вібраційний млин	1	Вібраційний млин Retsch CryoMill 1311-02368 фірми «Химтест». Швидкість до 30 Гц. Принцип подрібнення (криогенне): удар, тертя. Кінцева тонкість - 3-5 мкм. Час подрібнення - 7-10 хв. Матеріал розмольної гарнітури: нержавіюча сталь AISI 316L або загартована сталь. Споживча потужність - 100-240 В. Габаритні розміри колонки: (Ш×В×Г) 395×373×577 (мм). Країна виробник - Україна ²⁹ .

РЗ-46 РЗ-51	Реактор (збірник) для приготування ін'єкційного розчину герпесвірусної вакцини	2	Реактор хімічний на 50 л скляний (боросилікатне скло GG-17 (ТЗ)) з рамою з н/ж сталі AISI-304. Діапазон робочих температур від -120 до 250°C. Швидкість перемішування: 600 об./хв. Активний тиск становить 0,2 МПа. Країна виробник - Україна ³⁰ .
ВД-47	Об'ємний дозатор для води	1	Об'ємний проточний дозатора SERV_WPT. Максимальна доза за один цикл – 999 л. Мінімальна доза за один цикл - 1 л. Максимальна витрата при дозуванні – 15-100 л/хв. Похибка дозування - ±1,5%. Виробник: Україна ³¹ .
СМ-49	Система стерилізуючої фільтрації розчину	1	Комплект для мікрофільтрації та насос SartoJet. Продуктивність: 1380 л/год. Робочий тиск 5,0 бар. Діаметр пор: 0,2 мкм. Матеріал мембрани: ультрафільтр Hydrosart®. Матеріал корпусу: нержавіюча сталь AISI 316L. Виробник: Росія ³² .
АР-53	Автомат для розливу розчину та закупорки флаконів	1	Автоматична лінія розливу та закупорювання рідких препаратів у флакони, модель ТБ-056. Лінія призначена для дозованого розливу та закупорювання рідких препаратів у флакони (для внутрішньої гумової пробки і зовнішнього алюмінієвого ковпачка). Продуктивність: 2470 шт/год. Об'єм доз: від 1 мл до 200 мл. Потужність: 600 Вт. Тиск в системі: 6 бар. Виробник: Україна ³³ .
ІМ-54	Інспекційна машина	1	Автоматична інспекційна машина для ампул, картриджів та флаконів малого діаметру, A&V 600. Здійснює перевірку на наявність механічних домішок, герметичність, рівень заповнення. Продуктивність складає 36 000 флаконів за годину. Виробник: Росія ³⁴ .
АФ-55	Фасувальний автомат	1	Лінія для етикетування та пакування флаконів у шоу-бокс. Складається з: етикетувальної машини моделі LR 105, роторного столу моделі TR 1200, машини NCX для пакування флаконів у шоу-бокс. Продуктивність: 300 флаконів/хв, 12 шоу-боксів/хв. Виробник: Росія ³⁵ .
МП-56	Машина для пакування у групову тару	1	Romaco Promatic PAK 100. Групування та укладання коробок виконується в автоматичному режимі. Продуктивність складає 5 коробок на хвилину. Енергоспоживання: 1,6 кВт. Конструкція відповідає GMP. Виробник: Німеччина ³⁶ .

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

1. <https://klimatkomplekt.com.ua/produkcija/dha-plastmas/> («Кліматкомплект», повітрязбірник)

2. <https://www.generalfilter.com/database/scheda.php?id=1983&lang=ru> («General filter», фільтр грубої очистки)
3. <https://vencon.ua/products/kaminnyy-ventilyator-vents-kam-150-eko-maks> («VENTS», вентилятор);
4. <https://shop.alterair.ua/ru/product/daikin-fdxs-35f-rxs-3513/#scrollDescription> («Alter air», кондиціонер);
5. <https://www.generalfilter.com/database/scheda.php?id=1131&lang=ru> («General filter», фільтр тонкої очистки)
6. <https://www.generalfilter.com/database/scheda.php?id=1298&lang=ru> («General filter», фільтр абсолютної очистки)
7. https://vik21.com.ua/catalog/nasosy_tsentrobezhnnye_samovsasyvayushchie/samovsasyvayushchiy_nasos_grundfos_jp_5_48/ («ТОВ «ВІК-XXI»», насос відцентровий);
8. <http://uk.cndayu.com/sand-filter-product/> (піщаний фільтр)
9. <https://xn--80afdezrft5a5ph.com.ua/ua/p1177323485-promyshlennaya-sistema-umyagcheniya.html> («Гідротехніка-сервіс», промислова установка пом'якшення води);
10. <https://www.bwt.ru/catalog/vodopodgotovka/activecoal/filtry-s-aktivirovannym-uglem-quot-akf-28-31-quot/> («Best water technology», вугільний фільтр);
11. <https://osmosfilter.com.ua/ua/p1174804636-promyshlennaya-sistema-obratnogo.html> («Osmosfilter», установка зворотного осмосу);
12. <https://www.reatorg.ru/equipment/item/mnogostupenchatyy-distillyator-meco-4me40/> («Реаторг», багатоступінчастий дистилятор для отримання води ін'єкційної);
13. <https://flagma.ua/nerzhaveyushchiy-reaktor-2-m3-reaktor-s-meshalkoy-2-o8252419.html> («Діоніс», реактор хімічний);
14. <https://unidim.com.ua/kozhuho-trubchatye-teploobmennik-secespol-b45ff-12m3> («Unidim», кожхотрубний теплообмінник);
15. http://www.aurorapak.ru/products/228764331mashina_moyki_sterilizatsii_silikonirovaniya_sushki_rezinovykh_probok_i_alyum («Аврора ПАК Інжиниринг», комплексна машина для пробок і алюмінієвих ковпачків);
16. https://www.express-eco.ru/catalog/filtri/filtri_zhidkosti/ecoplast-f («ЕкспрессЕко», фільтри для води);
17. https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/pharmaceutical_equipment/bottle-washing-and-sterilization-machines/ampoule-and-vial-washing-machine-syb-10/ («Минипресс», машинна для миття і сушки флаконів);
18. <https://aurora-pack.ru/catalog/sku/gka-100m/> («Аврора ПАК Інжиниринг», стерилізатор тунельного типу);
19. <https://flagma.by/reaktor-s-meshalkoy-i-rubashkoy-podogreva-emk-r-o2595179.html> (ООО "Аврора ПАК Інжиниринг", збірник).
20. https://vaterpass.com.ua/catalog/peristalticheskie_nasosyi («Ватерпасс», насоси).
21. https://mida.ru/tsentrifug/tsentrifug_TD_TDZ.php («Мида», центрифуга осаджувальна).
22. <http://ua.tefitech.com/ultrasonic-homogenizer/ce-approval-2l-probe-sonicator-with-sound.html> («Tefic Biotech Co., Limited», ультразвуковий гомогенізатор).
23. <https://redmedua.com/uk/product/407-centrifuga-Sigma-316KL-nastolnaya-laboratornaya-universalnaya-s-ohlazhdeniem> (ТОВ "Редмед", лабораторна центрифуга з охолодженням);
24. <https://azovhimservis.all.biz/reaktor-steklyannyj-r-5-obem-5-l-g7217434>, <https://azovhimservis.all.biz/reaktor-steklyannyj-r-2-obem-2-l-g721739> («ООО Азовхимсервіс», реактор хімічний);
25. <https://www.hamiltoncompany.com/laboratory-products/hplc-columns/79346> («Немілтон», колонка для іоннообмінної хроматографії);
26. <https://prom.ua/ua/p1307355689-stakan-himicheskij-nizkij.html> («ChemLifeOd», стакан хімічний з міткою та ручкою);

27. <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sigma/ge28989335> («Cytiva», колонка для гель-фільтрації);
28. <https://analytprom.ru/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-binder-vd-23/> (ООО НПП «Аналитпромприбор», вакуум-сушильна шафа);
29. https://chemtest.com.ua/ua/vibracionnaja_melnitsa_cryomill_ua («Хімтест», вібраційний млин).
30. <https://ukrchemgroup.com/ua/p1331234280-steklyannyj-himicheskij-reaktor.html> («Ukrchemgroup», скляний хімічний реактор);
31. http://servotehnika.in.ua/dozator_protocniy_serv_wpt.html («НПП SERVотехника», дозатор об'ємний);
32. <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php/> («Sartorius», комплект для мікрофільтрації);
33. <http://automatica.kiev.ua/tb056.html> («Технологія-бізнес», автоматична лінія для фармацевтичних флаконів);
34. <http://rolstech.ru/oborudovaniye/inspektsionnoe-oborudovanie/inspektsionnaya-mashina-a-v/> («Rolstech», інспекційна машина для флаконів);
35. <https://campakrussia.ru/liniya-dlya-etiketirovki-i-upakovki-flakonov-v-shou-boks/> («Сампак», лінія етикетування та фасування флаконів у шоу-бокси);
36. <https://www.romaco.com/ru/ispolzuemye-tekhnologii/promatic/promatic-serija-pak/> («Romaco», машина для упаковки пачок в картонні коробки).

7.2. Опис технологічного процесу виробництва субодиничної протигерпетичної вакцини

Опис технологічної схеми отримання субодиничної вакцини проти ВПГ-2 на основі рекомбінантного глікопротеїну D має як допоміжні дороби (підготовка вентиляційного повітря, приготування води очищеної та води ін'єкційної, а також підготування первинної упаковки, а саме: флакони та закупорювальні матеріали (резинові пробки та алюмінієві ковпачки) так і основний технологічний процес (отримання фармацевтичної вакцинної субстанції, змішування всіх компонентів і отримання ін'єкційного розчину, його подальша стерилізуюча фільтрація, розлив ін'єкційного розчину у флакони, закупорка флаконів, перевірка їх на герметичність та наявність механічних часток, етикетування та розфасовка флаконів у шоу-бокси і в подальшому у групову тару в гофровані ящики). Також в кінці повного виробничого циклу отримання субодиничної вакцини проводять знешкодження відходів (твердих, рідких, газоподібних).

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Свіже повітря всмоктується за допомогою повітрязабірника (ПЗ-1) шляхом припливної вентиляції в найменш забрудненій зоні.

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

Повітря через повітрязабірник (ПЗ-1) надходить на фільтр первинної очистки (Ф-2) від грубих домішок, серед яких механічні домішки повітря та супутній пил. Ступінь очищення 90%.

ДР 1.3. Стабілізація термодинамічних показників повітря

Далі попередно очищене повітря за допомогою вентилятора (В-3) надходить у кондиціонер (К-4), де охолоджується. З повітря конденсується волога, яка відводиться через конденсатовідвідник. Після цього повітря додатково підігрівається до оптимальної температури $(21+2)^{\circ}\text{C}$ взимку та $(23+2)^{\circ}\text{C}$ влітку, відносну вологість повітря – у межах від 30 до 50 % з урахування технологічних вимог.

ДР 1.4. Тонке очищення повітря

Після стабілізації термодинамічних показників повітря надходить на фільтр тонкої очистки (Ф-5). При цьому ступінь очищення становить 98 %.

ДР 1.5. Надефективне очищення повітря

На третій стадії очищення повітря для фармацевтичної промисловості використовуються НЕРА-фільтри (Ф-6) з метою видалення з повітря частинок розміром 0,1 мкм. Ефективність очищення повітря такими фільтрами становить 99,999%.

Після цього повітря направляється до приміщень класу В з локальною зоною А у вигляді однонаправленого ламінарного потоку, а також (до ДР 3.1.1., до ДР 3.2.1). Після виробничих приміщень відпрацьоване повітря повертається за допомогою вентилятора (В-7) через фільтр (Ф-8) назад на стабілізацію термодинамічних показників з подальшою метою циркулювання в приміщенні і з нього.

ДР 2. Підготовка води

ДР 2.1 Отримання води очищеної

ДР 2.1.1. Забір води

Забір води питної здійснюється з міського трубопроводу за допомогою забірників (насосу відцентрового) (Н-9).

ДР 2.1.2. Груба фільтрація

Груба фільтрація дозволяє видаляти з води частинки розміром більше як 50 - 100 мкм. Як устаткування для грубої фільтрації використовуються фільтри з піщаним набиванням (Ф-10). Фільтр періодично промивається. Справність фільтра контролюється різницею тиску води до і після фільтру.

ДР 2.1.3. Пом'якшення води

Далі попередньо очищена вода за допомогою насосу (Н-11) подається на промислову сісему пом'якшення води (УПВ-12) з метою зниження жорсткості води за рахунок видалення іонів кальцію і магнію шляхом заміни їх на іони натрію. Перед подачею води для очистки на мембранах зворотного осмосу. Пом'якшувачі періодично регенеруються розчином хлориду натрію. Справність

роботи пом'якшувача можна контролювати періодичним виміром жорсткості води на вході і на виході.

ДР 2.1.4. Фільтрування через вугільний фільтр

Після етапу пом'якшення воду, за допомогою насосу (Н-13), подають на фільтри з активованим вугіллям (Ф-14), де вода очищається від найбільш шкідливих домішок, таких як вільний хлор, з метою її подальшого пропускання через системи зворотного осмосу.

ДР 2.1.5. Одержання води очищеної на установці зворотного осмосу

Вода після попередньої очистки подається, на колони зворотного осмосу (УЗ-16), в яких відбувається очищення води від розчинених в ній солей із селективністю не менше ніж 99,00 %. Для перебігу процесу необхідно створити надлишковий тиск (вищий за осмотичний) для примусового фільтрування води крізь мембрану за допомогою насосу (Н-15). Контроль систем зворотного осмосу здійснюється вимірюванням питомої електричної провідності води на виході з системи.

Отримана вода очищена за допомогою відцентрованого насосу (Н-17) поступає до трубопроводів для потреб підприємства (до ДР 3.1.1, до ДР 3.2.1)

ДР 2.2. Одержання ін'єкційної води

ДР 2.2.1. Багатоступенева дистиляція

Воду для ін'єкцій одержують з води очищеної, отриманої на стадії (від ДР 2.1.5) та поданої по трубопроводам, шляхом чотирьохступеневої дистиляції на установці для одержання води ін'єкційної (ГФ-18). Виробництво води ін'єкційної має відповідати «Настанові СК.Р 02С.02-08 "Виробництво води для ін'єкцій"».

ДР 2.2.2. Зберігання води

Далі за допомогою відцентрового насосу (Н-19) знесолена вода подається у збірник (З-20) з якого вона подається у збірник (З-22) автоматично за допомогою насосу (Н-21), а з нього повертається у перший збірник за допомогою насосу (Н-23) тим самим створюючи її безперервну циркуляцію. Для тривалого зберігання води для ін'єкцій організують її циркуляцію при температурі в

інтервалі 85-90°C за допомогою кожухотрубного теплообмінника (КТ-24) подачею води гарячої у сорочку збірників. Воду подають (до ДР 3.1.1, до ДР 3.2.1, до ТП 16.1).

ДР 3. Підготовка первинної упаковки

ДР 3.1 Підготовка гумових пробок та алюмінієвих ковпачків

ДР 3.1.1 Миття, силіконування, стерилізація.

Резинові пробки та алюмінієві ковпачки отримують зі складу та подають на поліфункціональне устаткування - машина мийки, стерилізації (силіконування), сушіння гумових пробок та алюмінієвих ковпачків (КУ-25). Усі технологічні операції виконуються автоматично у повністю закритому модулі з трьома секціями: миття, стерилізації та сушіння.

Миття здійснюється за допомогою води очищеної (від ДР 2.1.5), що йде з трубопроводів. Далі проводять ополіскування водою для ін'єкцій (від ДР 2.2.2) профільтрованої через фільтр (Ф-26). Перед стерилізацією пробки силіконують. Стерилізацію пробок і ковпачків проводять насиченою парою із наступним сушінням стерильним повітрям (від ДР 1.5), яке проходить через фільтр тонкої очистки (Ф-27). Підготовлені резинові пробки та ковпачки за допомогою стрічкового конвеєру в стерильній зоні надходять на етап розливу та закупорки флаконів (до ТП 17.2). Браковані пробки та алюмінієві ковпачки (до ЗВ 20.1). Відпрацьована вода очищена та вода ін'єкційна (до ЗВ 20.2). Відпрацьоване повітря (до ЗВ 20.3).

ДР 3.2 Підготовка скляних флаконів

ДР 3.2.1 Миття та сушіння флаконів

Флакони надходять на виробництво зі складу за допомогою візків і подають їх на автомат для миття та сушіння флаконів (АМ-28). Машина має чотири приймальні блоки, в яких встановлені контейнери із флаконами. Кришка герметично закривається. Воду очищену (від ДР 2.1.5), що йде з трубопроводів подають в автомат для миття флаконів за допомогою форсунок під тиском 0,2 МПа. Далі здійснюють процес ополіскування флаконів водою для ін'єкцій (від ДР 2.2.2), профільтрованої через фільтр (Ф-29). Після процесу

промивання та ополіскування флакони сушать відцентровим обертанням ємностей з ними. Браковані флакони (до ЗВ 20.1). Відпрацьована вода очищена та вода ін'єкційна (до ЗВ 20.2)

ДР 3.2.2 Стерилізація флаконів

Стерилізатор тунельного типу складається з трьох зон: нагрівання (термічної стерилізації), охолодження та обробки УФ-випромінюванням.

З мийної установки (АМ-28) флакони подаються на вхідний конвеєр стерилізатора тунельного типу (СШ-30) з нержавіючої сталі. Після цього склотара піддається термічній обробці в камері із зоною нагрівання. Під впливом тепла відбувається випаровування можливої залишкової вологи. У зоні охолодження під впливом очищеного повітря (від ДР 1.5), флакони остуджуються до +30°C. Потік повітря, що пропускається через фільтр тонкого очищення (Ф-31), створює надлишковий тиск. Перед виходом із стерилізатора флакони обробляються світлом бактерицидної лампи. Відпрацьоване повітря (до ЗВ 20.3).

Після цього підготовлені флакони, за допомогою конвеєрної стрічки в стерильній зоні, надходять на ділянки наповнення, закупорювання та етикетування (до ТП 17.2).

ТП 4. Зберігання культуральної рідини

ТП.4.1 Зберігання культуральної рідини у збірнику

Культуральну рідину, яку отримали після стадії ферментації самоплином перекачують у збірник (З-32), в якому підтримують її постійну температуру на рівні 18-20°C подачею води технічної у сорочку апарата.

ТП 5. Відділення біомаси

ТП.5.1 Центрифугування культуральної рідини

Зі збірника для зберігання культуральної рідини (З-32) за допомогою перестальтичного насоса (Н-33) культуральна рідина надходить на промислову вертикальну центрифугу з верхнім ручним вивантаженням осаду на платформі типу TDZ450 (Ц-34). Час центрифугування становить 15 хв при частоті обертання 6000 об/хв. Супернатант культуральної рідини (до ЗВ 20.2), а осад

(близько 50 гр) вручну вигружається в хімічний лабораторний посуд і далі його переносять в ультразвуковий гомогенізатор (дезінтегратор) (Д-35).

ТП 6. Дезінтеграція клітин продуцента

ТП 6.1 Руйнування клітин ультразвуком

Руйнування клітин проходить за використання лабораторної ультразвукової установки (Д-35) у 8 етапів по 30 с при охолодженні $t=4^{\circ}\text{C}$. Після чого утворену суспензію, за допомогою хімічного лабораторного посуду, переносять у центрифугу (Ц-36) для її розділення.

ТП 7. Осадження гранул тілець включення

ТП 7.1 Центрифугування

Утворену дезінтегровану суспензію масою близько 50 гр, отриману з попередньої стадії, вручну подаємо на осаджувальну центрифугу з охолоджувачем та ручним вивантаженням осаду (Ц-36). Час центрифугування становить 20 хв при частоті обертання 14000 об/хв та температурі $t=4^{\circ}\text{C}$. Надосадову рідину (до ЗВ 20.2), а осаджені гранули тілець включення, у вигляді осаду, вручну переносять на стадію їх первинного очищення.

ТП 8. Первинне очищення тілець включення

ТП 8.1 Промивка тілець включення

У реактор хімічний (РХ-37), об'ємом 5 л, вручну загрузають отриманий осад масою 4 г, від попередньої стадії, який охолоджують до 10°C розчином NaCl охолодженим, який подають у сорочку апарата через трубопроводи. Далі в реактор додають 1 л промивального буферного розчину (1% дезоксихолат натрію, 2% Тритон Х-100, 50 мМ Тріс- HCl , 5 мМ ЕДТА, рН 8,0) та включають мішалку на 30 хв зі швидкістю обертів 100 об/хв. Після утворену суспензію подають в лабораторному хімічному посуді на центрифугування.

ТП 9. Відділення промитих тілець включення

ТП 9.1 Центрифугування

Утворену суспензію об'ємом 1,04 л вручну подають на осаджувальну центрифугу з охолоджувачем та ручним вивантаженням осаду (Ц-38). Час центрифугування становить 20 хв при частоті обертання 14000 об/хв та

температурі $t=4^{\circ}\text{C}$. Надосадову рідину (до ЗВ 20.2), а осаджені та попередньо очищені гранули тілець включення, у вигляді осаду, вручну переносять на стадію солубілізуванню.

ТП 10. Солубілізуванню тілець включення

ТП 10.1 Розчинення тілець включення денатуратом

Осад 3,7 г отриманий від попередньої стадії вручну переносять у хімічний реактор (РХ-39), який охолоджують до 10°C розчином NaCl охолодженим, який подають у сорочку апарата через трубопроводи. У реактор додають 100 мл буферного розчину А (8 М сечовина, 50 мМ Тріс -HCl, рН 8,5). В якості солубілізатора виступає денатуратор 8М сечовини. Після включають мішалку на 15 хв зі швидкістю обертів 50 об/хв. Далі утворену суспензію подають в лабораторному хімічному посуді на центрифугування.

ТП 11. Відділення розчинних тілець включення

ТП 11.1 Центрифугування

Утворену суспензію об'ємом 105 мл вручну подають на осаджувальну центрифугу з охолоджувачем та ручним вивантаженням осаду (Ц-40). Час центрифугування становить 20 хв при частоті обертання 14000 об/хв, температурі $t=4^{\circ}\text{C}$. Осад направляють (до ЗВ 20.2), а отриману надосадову рідину в кількості близько 90 мл разом з розчинними та попередньо очищеними тільцями включення разом з глікопротеїном D вручну переносять на хроматографію для ретельного очищення цільового продукту.

ТП 12. Очищення глікопротеїну D

ТП 12.1 Іонообмінна хроматографія

На попередньо врівноважену хроматографічну колонку (ХУ-41) буфером А (8 М сечовина, 50 мМ Тріс -HCl, рН 8,5) вручну подається супернатант з попереднього етапу та буферний розчин В (8 М сечовина, 50 мМ Тріс-HCl, 5 мМ NaCl, рН 7,0). Колонка елюйована при швидкості потоку 5 мл/хв. Після сорбції глікопротеїну D, в результаті 5 разів об'ємного промивання колонки буфером В, здійснюється елюція даної білкової сполуки використовуючи буфер С (8 М сечовина, 50 мМ Тріс -HCl, 50 мМ NaCl, рН 7,0). Чисті фракції

глікопротеїну D подаються на подальший етап рефолдингу. Промивний буфер (до ЗВ 20.2). Тривалість процесу хроматографічної очистки складає 10-15 хвилин.

ТП 13. Рефолдинг глікопротеїну D

ТП 13.1 Відновлення третинної структури білка (біологічно активна форма)

Після етапу іонообмінної хроматографії чисті фракції глікопротеїну D вручну переносять в термостійкий хімічний лабораторний стакан (СХ-42), куди також додають у співвідношенні 1:1 віновник β -меркаптоетанол, в концентрації 10 мМ та перемішують скляною паличкою за кімнатної температури 1 год.

ТП 13.2 Гель-фільтрація

Відновлений розчин білка для відокремлення мономерних форм переносять на попередньо врівноважені буферним розчином D (50 мМ Тріс, 150 мМ NaCl, рН 8,0) колонки гель-фільтрації із сефадексом G-50 16/600 Superdex 200 pg (ГФ-43) об'ємом 120 мл зі швидкістю потоку цього ж буферного розчину 1 мл/хв. Промивний буфер (до ЗВ 20.2). Тривалість процесу гель-фільтрації складає 15-20 хвилин.

Колонку об'ємом 120 мл відкалібрували набором високомолекулярних маркерів (GE Healthcare) для побудови стандартної кривої та визначення молекулярної маси олігомерів вакцини, що відповідає їх пікам елюції.

ТП 14. Отримання сухого порошку глікопротеїну D

ТП 14.1 Вакуумне висушування

Отримані після гель-фільтрації очищені, розчинні та правильно складені фракції білку ВПГ-2 глікопротеїну D вручну переносили в алюмінієві бокси для вакуумного висушування у вакуум-сушильну шафу (ВСШ-44). Потім відкривають вакуумний клапан, включають вакуумний насос, створюючи в сушильній камері необхідний тиск. Сушіння здійснюється під вакуумом 7 МПа. при температурі 40⁰С. Вологість висушеного глікопротеїну D становить 5-7%.

ТП 15. Подрібнення білкового препарату

ТП 15.1 Подрібнення сухого порошку глікопротеїну D

Після сушіння 1,5 г сухого білкового порошку глікопротеїну D з алюмінієвих бюксів вручну подають на вібраційний млин (ВМ-45). Час подрібнення 7-10 хв. Кінцевий продукт розміром 3-5 мкм.

ТП 16. Отримання ін'єкційного розчину субодиничної вакцини

ТП 16.1 Приготування ін'єкційного розчину

Склад вакцини (1 доза - 1 мл): діюча речовина - рекомбінантний білок 20 мкг; допоміжні речовини - алюмінію гідроксид 20 мкг, натрію хлорид 9 мг, натрію гідрофосфату дигідрат 0,98 мг, натрію дигідрофосфату дигідрат 0,71 мг, вода для ін'єкцій до 1 мл.

За один цикл наповнюється 29 640 флаконів (доз):

- рекомбінантний білок: $20 \text{ мкг} * 29\ 640 = 592\ 800 \text{ мкг} = 592,8 \text{ мг}$;
- алюміній гідроксид: $20 \text{ мкг} * 29\ 640 = 592\ 800 \text{ мкг} = 592,8 \text{ мг}$;
- натрію хлорид: $9 \text{ мг} * 29\ 640 = 266\ 760 \text{ мг} = 266,76 \text{ г} = 266,8 \text{ г}$;
- натрію гідрофосфату дигідрат: $0,98 \text{ мг} * 29\ 640 = 29\ 047,2 \text{ мг} = 29 \text{ г}$
- натрію дигідрофосфату дигідрат: $0,71 \text{ мг} * 29\ 640 = 21\ 044,4 \text{ мг} = 21 \text{ г}$
- вода для ін'єкцій: $1 \text{ мл} * 29\ 640 = 29\ 640 \text{ мл} = 29,64 \text{ л}$.

У попередньо підготовлений змішувальний реактор (РЗ-46) для приготування розчину герпесвірусної вакцини із ємності для зберігання за допомогою петлі циркуляції заливають 29,64 л води для ін'єкцій за допомогою об'ємного дозатору (ВД-47) (від ДР 2.2.2) і охолоджують її подачею води технічної в сорочку апарата до $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Потім в цей самий апарат при працюючій мішалці через люк завантажують, попередньо зважену на технічних вагах та просіяну на лабораторному просіювачі, 592,8 мг фармацевтичної субстанції білку-антигену HVS-gD, перемішують до повного розчинення, яке контролюють візуально та додають допоміжні речовини, попередньо зважену на технічних вагах та просіяну на лабораторному просіювачі, ад'ювант - гідроксид алюмінію 592,8 мг (у співвідношенні антиген : ад'ювант = 1:1) і перемішують протягом 15 хв та натрій хлорид з розрахованою концентрацією 0,9% на 1 мл готової вакцини

- 266,8 г, натрію гідрофосфату дигідрат 29 г, натрію дигідрофосфату дигідрат 21 г.

Готовий розчин перемішують протягом 20–30 хвилин до повного розчинення субстанції, яке контролюють візуально.

Після чого відбирають пробу пробовідбірником на аналіз вмісту діючої речовини та повноти розчинення готового розчину його прозорості та кольоровості, густини розчину. Залишки пакувального матеріалу та відпрацьовані алюмінієві бокси (до ЗВ 20.1).

ТП 17. Розлив розчину субодиночної вакцини

ТП 17.1 Стерилізуюча фільтрація ін'єкційного розчину

Отриманий ін'єкційний розчин за допомогою перестальтичного насосу (Н-48) подають на установку стерилізуючої фільтрації розчину (СМ-49) під тиском стиснутого повітря від 0,14 до 0,16 МПа за допомогою мембранних фільтрів з діаметром 0,22 мкм. З дозаторів відбирають пробу розчину, яку перевіряють на чистоту розчину візуально за допомогою чорно-білого екрану і лампи рефлектора. Далі профільтрований розчин за допомогою насосу (Н-50) направляється до збірника зберігання готового розчину (РЗ-51). При зниженні швидкості фільтрації - замінюють фільтроелемент.

ТП 17.2 Розлив та закупорка ін'єкційного розчину у флакони

Наповнення та закупорювання флаконів із стерильним розчином з (РЗ-51), який подається насосом (Н-52), за відсутності механічних включень в профільтрованому розчині, проводять у попередньо підготовленій та простерилізованій автоматичній лінії розливу та закупорювання рідких препаратів у флакони (АР-53). Чисті, сухі флакони із сушильно-стерилізаційного тунелю (від ДР 3.2.2) у вертикальному положенні подаються по конвеєру до осередку поворотного столу, де відбувається захоплення флакона поворотним столом та подача його на позицію дозування. Дозований розлив препарату відбувається вбудованим рідинним дозатором на одній позиції. Далі здійснюється закупорка флаконів підготовленими гумовими пробками (від ДР 3.1.1) у горловину флакона. Після відбувається надягання

підготовленими алюмінієвими ковпачками (від ДР 3.1.1) та подальша герметична роликів закатка ковпачка або закрутка кришки. В кінці процесу здійснюють розвантаження закупорених флаконів на конвеєр і подача на накопичувальний стіл або виштовхування в накопичувальну касету.

ТП 18. Перевірка флаконів після розливу та закупорки

ТП 18.1 Перевірка герметичності флаконів та на механічні домішки

Далі закупорені флакони подають по конвеєру на автоматичну інспекційну машина роторного типу з безперервним рухом головної каруселі для флаконів (ІМ-54), де здійснюється перевірка герметичності флаконів. На каруселі Leak-контролю контейнери розміщуються в герметичному дзвоні у вакуумному середовищі, зміни тиску в дзвоні свідчить про негерметичність того чи іншого контейнера, і він автоматично відбраковується та не надходить на карусель оптичного контролю.

Далі здійснюється наступна перевірка на присутність сторонніх частинок (відбиваючі та невідбивні, важкі та плаваючі), тобто механічні включення. Подальше відбувається косметична перевірка флаконів: наявність алюмінієвого кільця, кришки та їх форма, бульбашки повітря у стінках, дефекти самого флакону, перевірка рівня заповнення

Флакони, що пройшли всі перевірки, по конвеєру направляють на стадію на ПМВ. Флакони, що не пройшли перевірку (до ЗВ 20.1).

ПМВ 19. Маркування та пакування готової продукції

ПМВ 19.1 Етикетування флаконів та фасування у шоу-бокси

Перевірені флакони по конвеєру надходять на фасувальний автомат (АФ-55), де на них автоматично наклеюється етикетка з усією необхідною інформацією (назву препарату, концентрацію антигену, обсяг препарату в ампулі в мілілітрах, температуру зберігання, країну виробник, номер серії та термін придатності) і далі відбувається їх автоматичне фасування у шоу-бокси по 20 шт з інструкцією, яку попередньо вклали в приймальні пристрої пакувального автомату.

Шоу-бокси заповненні флаконами транспортером передаються до машини для пакування пачок у ящики. Залишки пакувального матеріалу (до ЗВ 20.1).

ПМВ 19.2 Пакування пачок з флаконами у групову тару

На установку пакування коробок із флаконами (МП-56) поміщають пустий ящик і вмикають її. Далі по транспортеру надходять заповненена вторинна тара (шоу-бокси) флаконами. Після заповнення пачками ящик з транспортеру переносять на пакувальний стіл. Заклеюють ящик клейовою стрічкою та прикріплюють групову етикетку Вручну штампом наносять номер серії та термін придатності. Залишки пакувального матеріалу (до ЗВ 20.1).

При отриманні позитивних результатів вимогам АНД та відповідності всіх результатів аналізу досьє серії, оформляється сертифікат якості та дозвіл на реалізацію. Після цього вся серія продукції ідентифікується зеленими картками «Дозволено до реалізації» Передають готову продукцію на склад тимчасового зберігання до відправки споживачу.

ЗВ 20. Знешкодження відходів

ЗВ 20.1 Знешкодження твердих відходів

Пакувальні матеріали від упаковок з допоміжних речовин (від ТП 16.1) а також залишки пакувального матеріалу (від ПМВ 19.1, від ПМВ 19.2) готового продукту передають на переробку в компанію ЗВПІ «Регіон 2001» [127]. Бракований закупорювальний матеріал (від ДР 3.1.1) та браковані флакони (від ДР 3.2.1). Також флакони, що не пройшли перевірку (від ТП 18.1) на переробку.

ЗВ 20.2. Знешкодження рідких відходів

Знешкодження відпрацьованої води очищеної та води ін'єкційної (від ДР 3.1.1, ДР 3.2.1), супернатант (від ТП 5.1), надосадову рідину (від ТП 7.1, ТП 9.1), вологий осад (ТП 11.1) та промивні буфери (від ТП 12.1, ТП 13.2) проводиться на анаеробній установці АВР-реакторі.

ЗВ 20.3. Знешкодження газоподібних відходів

Знешкодження відпрацьованого повітря (від ДР 3.1.1, ДР 3.2.2) здійснюється за допомогою системи біологічного очищення газових потоків - біоскрубера.

7.3 Контроль ділянки виробництва субодиничної протигерпетичної вакцини

Контроль готової субстанції

Під час процесів виділення та очищення глікопротеїну D необхідно контролювати певні критичні параметри, відповідних процесів, зокрема: температуру, час процесу промивки тілець включення та їх солюбілізації, рН, швидкість обертання ротора центрифуги тощо.

Всі ці критичні точки відображені в карті постадійного контролю виробництва субодиничної вакцини.

Готовий сухий порошок глікопротеїну D контролюють за такими показниками якості як: ідентифікація, кількісний вміст речовини, вологовміст [6].

Ідентифікація глікопротеїну D по молекулярній масі.

Принцип дії: для підтвердження наявності очищеного білку gD, як гетерологічного білка в лізаті аналізують методом електрофорез білків в поліакриламідному гелі з додаванням додецилсульфату натрію (SDS PAGE) та подальшим вестерн-блотингом з використанням анти-6xHis-tag антитіл.

Методика проведення електрофорезу: 5 мг висушеного порошку змішують з 2,5 мл буферного розчину 4X LDS і нагрівають до 70°C протягом 10 хв. Суміш переносили в спеціальні кювети з поліакриламідним гелем NuPAGE Novex 12% Bis-Tris. Потім додають 5 мл попередньо забарвлених стандартів SDS PAGE (Bio-Rad). Електрофорез проводили при кімнатній температурі протягом 45 хв. Глікопротеїн D має молекулярну масу 53 кДа, що буде відповідати розміщенню біля відповідного стандарту.

Методика проведення вестерн-блотингу: Білкові смуги з молекулярною масою 53 кДа розділені у SDS-PAGE, переносили на нітроцелюлозну мембрану (NC) для вестерн-блотингу. Мембрану NC блокували 5% BSA в PBS та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі з подальшим одноразовим промиванням PBS, що містить 0,05% Tween-20 (PBST). Далі 10 мл первинного антитіла проти 6xHis-tag при розведенні 1:20 000 в PBST додавали до

заблокованої NC-мембрани та інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі при повільному перемішуванні. Мембрану тричі промивали PBST, а потім інкубували з 10 мл вторинного антитіла при розведенні 1:180 000 в PBST протягом ще 1 години. Після триразової промивання PBST, 10 мл готового до використання розчину субстрату ТМВ (3,3', 5,5' тетраметилбензидин) додавали до NC-мембрани та інкубували в темній кімнаті протягом 20 хв до візуалізації (появи) бажаних смуг з молекулярною масою 53 кДа [6].

Кількісне визначення глікопротеїну D в субстанції та у готовій вакцині.

Принцип дії: даний метод заснований на зсуві максимуму поглинання оптичної щільності барвника кислотного синього 90 (Кумассі діамантовий синій R-250) при довжині хвилі від 470 нм до 595 нм, що спостерігається внаслідок зв'язування білка з барвником.

Для приготування всіх буферних розчинів і реактивів, вживаних уданому методі, використовують воду дистильовану Р.

Методика проведення: до 0,1 мл кожного розчину порівняння (стандартний зразок виробовуваного білка 1 мг на 10 мл буферного розчину (8 М сечовина, 50 мМ Тріс -HCl, 50 мМ NaCl, рН 7,0) [6], випробовуваного розчину (1 мг субстанції на 10 мл води) і холостого розчину (використовують буферний розчин, використовуваний для приготування випробовуваного розчину і розчинів порівняння - 8 М сечовина, 50 мМ Тріс -HCl, 50 мМ NaCl, рН 7,0) додають 5 мл реактиву кислотного синього 90. Перемішують, перевертаючи, уникаючи спінення, що призводить до поганої відтворюваності. Після 10 хв витримки за кімнатної температури вимірюють оптичну щільність розчинів порівняння і випробовуваного розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 595 нм, використовуючи холостий розчин, в якості компенсаційного.

Будують графік залежності оптичної густини розчинів порівняння від концентрацій білка в розчині і, використовуючи лінійну регресію, визначають стандартну криву. На підставі калібрувальної кривої і оптичної щільності випробовуваного розчину визначають концентрацію білка в випробовуваному розчині.

Препарат витримує випробування на кількісний вміст глікопротеїну D, якщо він становить не менше 90,0% і не більше 101,0% у перерахунку на безводну основу (ДФУ 2.5.33, 3 метод Бредфорда) [128].

Визначення вологості висушеного порошку субстанції глікопротеїну D

Після стадій висушування та подрібнення отримують готовий аморфний порошок глікопротеїну D, який потрібно перевірити на вологість. Для цього використовують високоточний лабораторний прилад METRINCO M100MA - аналізатор вологовмісту. Висока точність зважування забезпечується ваговим модулем НВМ (Німеччина) – 0,001 г дискретності. Сучасна технологія нагріву та вбудовані електронні ваги аналізатор дозволяють проводити точний аналіз на вологість.

Аналізатор вологості METRINCO M100MA *рис 7.1.* діє саме на основі гравіметричного аналізу. Це метод є класичним з певними перевагами (простий у застосуванні та надійний). Від типу нагрівача буде залежати інертність аналізатору вологи (час за який прилад виходить в робочий режим), швидкість висушування і точність вимірювання. Реалізація даного методу відбувається шляхом нагрівання джерела теплового випромінювання, котрим в METRINCO M100MA є джерело нагрівання - галогенова лампа.



Рис. 7.1. Аналізатор вологості METRINCO M100MA

Принцип дії: ґрунтується на визначенні масової частки води (у %) дослідному зразку за різницею маси речовини до і після висушування. Висушування проходить до повного видалення вологи і летких речовин при

температурі 100-105°C до тих пір, поки два наступних зважування до четвертого десяткового знака не покажуть практично однакову масу.

Методика проведення: 5 мг субстанції глікопротеїну D поміщають у зважений бюкс сушильної камери попередньо висушений за умов, описаних для відповідної випробуваної речовини. Сушіння здійснюється за температури 50-105 °C до постійної маси протягом 15-20 хв. Після сушіння проводять визначення різниці маси зразка субстанції до і після його висушування. Точність вимірювання вологості становить $\pm 0,1\%$ [129].

Якщо немає інших зазначень в окремій статті й субстанція не є кристалогідратом, то втрата в масі при висушуванні або вміст води не має перевищувати 0,5 % [128].

Контроль готового лікарського засобу

Контроль готового лікарського засобу, а саме субодиничної вакцини проти ВПГ-2 на основі рекомбінантного глікопротеїну D проводиться згідно аналітично-нормативної документації (АНД) та специфікації, зазначеної в розділі 4, підпункті 4.5 Опис лікарського засобу згідно АНД.

Аналіз сучасних методів контролю виробництва протигерпетичної вакциної сировини - глікопротеїну D

Метод імуноферментного аналізу ELISA (ІФА)

Метод імуноферментного аналізу ІФА є високочутливим та високоспецифічним імунодіагностичним методом, за допомогою якого, відповідно, проводять якісне і кількісне визначення різних речовин, котрі володіють властивостями антигену, гаптена (неповноцінного антигену) або антитіла. Метод ІФА в біотехнології використовується для підтвердження якості біологічних лікарських препаратів або їх кількісного та якісного визначення.

Принцип ІФА полягає в специфічній взаємодії антигену і антитіла, створенні комплексу Аг/Ат і кон'югат і визначенні утворюваного комплексу за допомогою субстратної суміші за ступенем забарвлення. Детекція може бути як прямою (коли досліджувана речовина саме має ферментативну активність, або вона позначена ферментною міткою), так і непрямую (коли досліджувана

речовина, пов'язана з іммобілізованими на твердій фазі антитілами, інкубується з білками (антитіла проти імуноглобулінів, білок А стафілококів і ін.), міченими ферментами). Якісний аналіз дозволяє отримати інформацію про зміст антигену або антитіла в досліджуваному матеріалі за принципом «є / немає».

Метод ІФА включає 3 основні етапи:

- 1) утворення імунного комплексу «антиген (досліджувана речовина) - специфічне до нього антитіло» та навпаки;
- 2) формування зв'язку кон'югату із утворюваним, на попередньому етапі, імунним комплексом або з вільними місцями зв'язування (детермінантами);
- 3) перетворення субстрату під дією ферментної мітки в реєстрований сигнал в результаті біохімічної реакції [130].

Метод «сендвіча» як варіант постановки ІФА

Найбільш поширеним неконкурентним методом є «сендвіч» метод. Під час його виконання, на твердій фазі, іммобілізують первинні антитіла із їх подальшим блокуванням. Потім до них додають, відповідно, досліджувану речовину, яка містить антиген, та інкубують. Після процесу інкубації утворений комплекс антиген-антитіло відмивають саме від незв'язаних антигенів та додають вторинні антитіла, мічені ферментом. В кінці проводять детекцію [131].

Приклад методики проведення

Стандартна крива ELISA була створена за допомогою серії стандартів gD VTI540 від 1,6 до 100 нг/мл. Відповідні лунки 96-лункових середовищних полістирольних пластин покривали серійно розведеними зразками культури клітин (100 мкл/лунка). Планшети герметизували парафільмовим листом і інкубували у зволоженій камері при 4°C протягом ночі. Далі планшети з лунками врівноважували до кімнатної температури і тричі промивали свіжоприготованим розчином фосфату, що містить 0,05% Твін 20 (PBST), за допомогою автоматичної мийки пластин ELX405.

Після промивання планшети блокували 1% BSA-PBS при кімнатній температурі протягом 2 год. Після того, як планшети тричі промивали PBST, мишаче моноклональне антитіло до gD C65019M розводили 1:700 у PBST

безпосередньо перед розподілом у лунки, покриті антигеном. Потім сотні мікролітрів розведеного мишачого моноклонального антитіла до gD інкубували у зразках клітинної культури, покритих пластинами з полістиролу при 37°C протягом 1 години. Усі інкубації на майбутніх етапах також проводили при 37°C. Після інкубації лунки промивали тричі. Потім кожну лунку інкубували з 100 мкл розведення 1: 2000 (об./об.) козячого антимишиного I gG, кон'югованого з пероксидазою хрому, протягом 45 хв. Планшети промивали тричі. Лунки інкубували в темряві із 100 мкл проявного розчину, приготованого безпосередньо перед використанням, при кімнатній температурі протягом 20 хв. Проявляючу реакцію в кожній лунці зупиняли 40 мкл 2 М H₂SO₄.

Оптичну щільність при довжині хвилі 490 нм визначали для кожної лунки за допомогою універсального зчитувача мікропланшетів ELX800. Кількість рекомбінантного gD обчислювали за значеннями OD₄₉₀, які були в низхідній частині стандартної кривої ELISA для стандартів gD [19].

Метод вестерн-блотингу

Вестерн-блот - аналітичний метод, який використовується для визначення специфічних білків в зразку, розділених шляхом електрофорезу в поліаріламідном гелі. Далі білки з гелю переносять на нітроцелюлозну або PVDF мембрану, потім проводять детекцію досліджуваних білків з використанням антитіл, специфічних до конкретного білку і виявляють, використовуючи вторинні антитіла.

Вестерн-блот - перенесення на мембрану (нітроцелюлозну або з полівінолідендіфторіда (PVDF) білків, попередньо розділених в ході ДСН-ПААГ електрофорезу. Перенесені на мембрану білки зазвичай обробляються міченими антитілами і будь-яким чином візуалізуються.

Нижче наводиться найбільш часто використовувана процедура вестерн-блотингу з послідовною обробкою мембрани двома антитілами. У цій процедурі первинні антитіла є специфічними до досліджуваного білку, а вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому - специфічними до первинного антитіла. Така двостадійна обробка дає сильніший сигнал (оскільки з одним первинним

антитілом може зв'язатися кілька вторинних антитіл), а за використання пероксидази хрому в якості мітки дає можливість використовувати дуже чутливий хемілюмінесцентний метод детекції. Така процедура вестерн-блотингу володіє чутливістю, достатньої для детекції білків, присутніх в клітині в кількості декількох молекул [132].

Приклад методики проведення

Білки розділяли гель-електрофорезом і фарбували Кумассі синім R250. Для аналізу вестерн-блот розділені білки переносили на PVDF-мембрани на 1 годину. Мембрани блокували 5% знежиреним молоком у забуференому Тріс фізіологічному розчині з 1% Твін 20 (TBST, рН 7,4) протягом 1 год при кімнатній температурі. Рекombінантний білок глікопротеїн D виявляли шляхом інкубації з моноклональним антитілом проти His-tag або мишачої сироваткою протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після трикратного промивання TBST мембрани інкубували з кон'югованими з пероксидазою хрому HRP, як вторинним антитілом (1:5000) протягом 1 год. В результаті сигнали проявляли за допомогою хемілюмінесцентного субстрату ECL, який дозволяє виявляти пікограми молекулярних розмірів білків високому рівні фемтограми за допомогою вестерн-блот-аналізу [18].

Карта постадійного контролю виробництва субодиночної вакцини проти ВПГ-2

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
1	2	3	4	5
Кт 1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра грубого очищення, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стабілізація термодинамічних показників повітря	Охолоджене повітря, нагрівання повітря, вологість	Термометр технічний, логометр	Після кондиціонування повітря	t = 22-23 °C, W = 40%
Кт 1.4 Тонке очищення повітря	Повітря, ступінь очищення	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі тонкого очищення	E = 98 % тиск згідно паспорту
Кт 1.5 Надтонке очищення повітря	Повітря, ступінь очищення, кількість колонеутворюючих одиниць	Манометр технічний, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра, мікробіологічний контроль	Після очистки повітря у фільтрі надтонкого очищення, мікробіологічний контроль- не рідше 1 разу на тиждень	E = 99,995 % тиск згідно паспорту
Кт 2.1.2 Груба фільтрація	Вода після пісочного фільтру, тиск	Манометр технічний	Під час фільтрації	P= 0,3 МПа

1	2	3	4	5
Кт, Кх 2.1.3 Пом'якшення води	Вода після пом'якшення, жорсткість води	Хімічний метод	Після пом'якшення	Р= 0,3 МПа С = не більше 0,3 мг-екв/дм ³
Кт, Кх 2.1.4. Фільтрування через вугільний фільтр	Вода після пісочного фільтру, тиск	Манометр технічний, хімічний метод	Під час фільтрації вимірюють тиск, а після перевіряють воду на наявність хлору	Р= 0,3 МПа, відсутність хлору
Кт 2.1.5 Одержання води очищеної на установці зворотного осмосу	Вода знесолена, тиск	Манометр технічний	Під час фільтрації	Р= 5 МПа ЕП менше 4,3 мкСм-см'
Кт, Км 2.2.1. Багатоступенева дистиляція	Вода ін'єкційна	Якість води для ін'єкцій	Після дистиляції	«Настанові СК.Р 02С.02-08 "Виробництво води для ін'єкцій"» відсутність часточок і мікробіоти
Кт 2.2.2. Зберігання води	Вода ін'єкційна	Термометр технічний	Кожний виробничий цикл, перед початком робіт температура визначається безперервно	t = 85-90 °С
Кт 3.1.1 Миття, силіконування, стерилізація, сушіння гумових пробок та алюмінієвих ковпачків	Гумові пробки, алюмінієві ковпачки	Термометр технічний	Під час процесу миття, сушіння та стерилізації	t ₁ = 40°С, Силіконування з допомогою води ін'єкційної за t ₂ =85-90°С Стерилізація за t ₃ =120-124°С

1	2	3	4	5
Кт 3.2.1 Миття та сушіння флаконів	Склянні флакони	Термометр технічний, манометр, тахометр	Під час процесу миття і сушіння	$t = 40^{\circ}\text{C}$, $P = 0,2 \text{ МПа}$, $W = 520 \text{ об/хв}$,
Кт 3.2.2 Стерилізація флаконів	Склянні флакони	Термометр технічний	Під час стерилізації	Стерилізація за $T = 120\text{-}124^{\circ}\text{C}$
Кт 4.1. Зберігання культуральної рідини у збірнику	Температура	Датчик температури	Перед початком кожного виробничого циклу	$t = 18\text{-}20^{\circ}\text{C}$
Кт 5.1. Центрифугування культуральної рідини	Частота обертів, тривалість процесу	Тахометр, годинник	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, час під час проведення операції	$W = 6\ 000 \text{ об/хв}$, $T = 15 \text{ хв}$
Кт 6.1 Руйнування клітин ультразвуком	Частота, час, напруга, кількість обробок	Датчики в установці, годинник	Під час проведення процесу	$F = 20 \text{ кГц}$ $T = 30 \text{ сек}$, $U = 130 \text{ Вт}$, $N = 8$
Кт 7.1 Центрифугування (осадження тілець включення)	Частота обертів, тривалість процесу, температура процесу	Тахометр, годинник, датчик температури	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, час і температура під час проведення операції	$W = 14\ 000 \text{ об/хв}$, $T = 20 \text{ хв}$, $t = 4^{\circ}\text{C}$
Кт, Кх 8.1 Промивка тілець включення	Температура, частота обертів мішалки, час, рН буфера	Термометр, тахометр, годинник, датчик рН в реакторі	Температура, частота обертів, рН буферу перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, тривалість під час проведення операції	$t = 10^{\circ}\text{C}$ $W = 100 \text{ об/хв}$, $T = 30 \text{ хв}$, $\text{pH} = 8,0$
Кт 9.1 Центрифугування (осадження промитих тілець включення)	Частота обертів, тривалість процесу, температура процесу	Тахометр, годинник, датчик температури	Частота обертів перевіряється до, під час процесу, час і температура під час проведення операції	$W = 14\ 000 \text{ об/хв}$, $T = 20 \text{ хв}$, $t = 4^{\circ}\text{C}$

1	2	3	4	5
Кт, Кх 10.1 Розчинення тілець включення денатуратом	Температура, частота обертів мішалки, час, рН буфера	Термометр, тахометр, годинник, датчик рН в реакторі	Температура, частота обертів, рН буферу перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, тривалість під час проведення операції	$t = 10^{\circ}\text{C}$ $W = 50 \text{ об/хв}$, $T = 15 \text{ хв}$, $\text{pH} = 8,5$
Кт 11.1 Центрифугування (розчинних тілець включення)	Частота обертів, тривалість процесу, температура процесу	Тахометр, годинник, датчик температури	Частота обертів перевіряється безпосередньо перед і під час процесу, час і температура під час проведення операції	$W = 14\,000 \text{ об/хв}$, $T = 20 \text{ хв}$, $t = 4^{\circ}\text{C}$
Кт, Кх 12.1 Іонообмінна хроматографія	Час, швидкість елюента, рН буферу А, рН буферу В, рН буферу С	Годинник, датчик швидкості, датчик рН	Під час проведення хроматографічної очистки	$T = 10\text{-}15 \text{ хв}$ $V = 5 \text{ мл/хв}$ $\text{pH}_A = 8,5$ $\text{pH}_B = 7,0$ $\text{pH}_C = 7,0$
Кт 13.1 Відновлення третинної структури білка (біологічно активна форма)	Час відновлення	Годинник	Під час проведення процесу відновлення	$T = 60 \text{ хв}$
Кт, Кх 13.2 Гель-фільтрація (відокремлення від мономерних форм)	Час проведення процесу, швидкість елюента, рН буферу D,	Годинник, датчик швидкості, датчик рН	Під час проведення гель-фільтрації	$T = 15\text{-}20 \text{ хв}$ $V = 1 \text{ мл/хв}$ $\text{pH}_D = 8,0$
Кт 14.1 Вакуумне висушування	Тиск, температура	Манометр, датчик температури	Під час процесу вакуумного висушування	$T = 40^{\circ}\text{C}$ $P = 7 \text{ МПа}$
Кт 15.1 Подрібнення сухого порошку глікопротеїну D	Час подрібнення	Годинник	Під час процесу подрібнення	$T = 7\text{-}10 \text{ хв}$

1	2	3	4	5
Кт 16.1 Приготування ін'єкційного розчину	Температура води ін'єкційної, час перемішування, швидкість обертів мішалки	Термометр технічний, годинник, тахометр	Під час процесу приготування ін'єкційного розчину	$t = 25^{\circ}\text{C}$ $W = 50 \text{ об/хв}$, $T_1 = 15 \text{ хв}$, $T_1 = 30 \text{ хв}$
Кт 17.1 Стерилізуюча фільтрація ін'єкційного розчину	Фільтрувальний матеріал, тиск, діаметр пор	Манометр, мембранні фільтри з відповідним діаметром пор	Під час проведення стерилізуючої фільтрації	Вчасна заміна фільтрувального матеріалу $P = 0,5 \text{ МПа}$ $d = 0,2 \text{ мкм}$
Кт 17.2 Розлив та закупорка ін'єкційного розчину у флакони	Об'єм ін'єкційного розчину в 1 флаконі, наявність гумових пробок і алюмінієвих ковпачків на флаконах	Програма в апараті (автомат для розливу розчину та закупорки флаконів), візуальний контроль	Під час наповнення та закупорки флаконів	$V = 1 \text{ мл}$, візуальний контроль
Кт 18.1 Перевірка герметичності флаконів та на механічні домішки	Закупорені флакони із ін'єкційним розчином	Програма в апараті (інспекційна машина)	Під час проведення перевірок	Візуальний контроль (розчин в ампулах має бути прозорим, відсутність зміни тиску, відсутність механічних включень)
Кт 19.1 Етикетування флаконів та фасування у шоу-бокси	Флакони, кількість флаконів у шоу-боксах	Датчик наповнення, візуальний контроль	Під час фасування	$N = 20 \text{ флаконів}$ візуальний контроль
Кт 19.2 Пакування пачок з флаконами у групову тару	Пачки, кількість пачок у коробці	Візуальний контроль	Під час пакування	$N = 78 \text{ штук}$ візуальний контроль

Список використаної літератури:

1. Чепурнова Н.С., Маркелова Е.В., Яковлева Ю.В. Перспективы применения противогерпетических вакцин. *Современные проблемы науки и образования*. 2015, 5: 1-11. УДК 615.371:578.825.11-084
2. Karch C.P, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem Pharmacol*. 2016, 120: 1-14. doi:10.1016/j.bcp.2016.05.001
3. Синиця П.В. Генітальний герпес: етіопатогенетичні, клініко-епідеміологічні аспекти, комплексна діагностика та лікування, профілактика. *Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология*. 2011, № 1-4: 115-129. УДК 616.972.614: 616.972-085
4. Макарова О.Є., Пенчук Ю.М., Гергель М.В. Сучасний стан розробки та застосування вакцин. *Фармацевтичний журнал*. 2011, 4: 39-42.
5. Tan M., Jiang X. Recent advancements in combination subunit vaccine development. *Hum Vaccin Immunother*. 2017, 13(1) :180-185. doi:10.1080/21645515.2016.1229719
6. Vikas K.S., Sandeep K., Rajeev K.D., Abdul S.A., Nirmal K., Suman T. Generation of oligomers of subunit vaccine candidate glycoprotein D of Herpes Simplex Virus-2 expressed in fusion with IgM Fc domain(s) in *Escherichia coli*: A strategy to enhance the immunogenicity of the antigen. *3 Biotech*. 2020, 10(11): 463 doi:10.1007/s13205-020-02452-6.
7. Amorim J.H., Porchia B.F.M.M., Balan A., Cavalcante R.C.M., da Costa S.M., de Barcelos Alves A.M., de Souza Ferreira, L.C. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *Journal of Virological Methods*. 2010, 167(2): 186–192. doi:10.1016/j.jviromet.2010.04.003.
8. Athmaram T.N., Saraswat S., Misra P., Shrivastava S., Singh A.K., Verma S.K., Gopalan N., Behera P.K., Rao, P.V.L. Optimization of Dengue-3 recombinant NS1 protein expression in *E. coli* and in vitro refolding for diagnostic applications. *Virus Genes*. 2012, 46(2): 219–230. doi:10.1007/s11262-012-0851-5.

-
9. Sankar S.G., Dhanajeyan K.J., Paramasivan R., Thenmozhi V., Tyagi B.K., Vennison, S.J. High-Level Expression of Functionally Active Dengue-2 Non-Structural Antigen 1 Production in *Escherichia coli*. *BioMed Research International*. 2013: 343195. doi:10.1155/2013/343195
10. Das D., Mongkolaungkoon S., Suresh M.R. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*. 2010, 66(1): 66–72. doi:10.1016/j.pep.2009.02.003.
11. Puspasari F., Putri R.D., Aisyah, Damayanti R.R.R., Yuwita A., Alisjahbana B., Handali S., Ihsanawati, Natalia D. Construction and expression of a synthetic gene encoding nonstructural glycoprotein NS1 of dengue 2 virus in *Pichia pastoris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017, 7(8): 689–693. doi:10.1016/j.apjtb.2017.07.017.
12. Bragança C.R.S., Colombo L.T., Roberti A.S., Alvim M.C.T., Cardoso S.A., Reis K.C.P., de Paula S.O., da Silveira W.B., Passos F.M.L. Construction of recombinant *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 to express dengue virus type 1 nonstructural protein 1 (NS1). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 99(3): 1191–1203. doi:10.1007/s00253-014-5963-5.
13. Zhang W., Qu P., Li D., Zhang C., Liu Q., Zou G., Rouzeyrol-Dupont M., LAvillette D., Jin X., Yin F., Huang Z. Yeast-produced subunit protein vaccine elicits broadly neutralizing antibodies that protect mice against Zika virus lethal infection. *Antiviral Research*. 2019, 170: 104578. doi:10.1016/j.antiviral.2019.104578
14. He J., Peng L., Lai, H., Hurtado J., Stahnke J., Chen, Q. A Plant-Produced Antigen Elicits Potent Immune Responses against West Nile Virus in Mice. *Biomed Res Int*. 2014: 952865 doi:10.1155/2014/952865.
15. Qu P., Zhang W., Li D., Zhang C., Liu Q., Zhang X., Wang X., Dai W., Xu Y., Leng Q., Zhong J., Jin X., Huang, Z. Insect cell-produced recombinant protein subunit vaccines protect against Zika virus infection. *Antiviral Research*. 2018, 154: 97–103. doi:10.1016/j.antiviral.2018.04.010.
16. Han J.F., Qiu Y., Yu J.Y., Wang H.J., Deng Y.Q., Li X.F., Zhao H., Qin C.F. Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective

immune response in mice. *Scientific Reports*. 2017, 7:10047 doi:10.1038/s41598-017-10595-5.

17. To A., Medina L.O., Mfuh K.O., Lieberman M.M., Wong T.A.S., Namekar M., Nakano E., Lai C.Y., Kunar M., Nerurkar V.R., Lehrer A. T. Recombinant Zika Virus Subunits Are Immunogenic and Efficacious in Mice. *mSphere*. 2018, 3(1): e00576-17 doi:10.1128/msphere.00576-17.

18. Wang M., Jiang S., Zhou L., Wang C., Mao R., Ponnusamy M. Efficient production of recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 in *Pichia pastoris* and its protective efficacy against viral challenge in mice. *Archives of Virology*. 2017, 162(3): 701–711. doi:10.1007/s00705-016-3154-7.

19. Tao L., Hui-jun D., Ji-feng L., Wei Z., Zhi H., Shui-fen Z. Two step culture for production of recombinant herpes simplex virus type 2 glycoprotein D in immobilized *Spodoptera frugiperda* cells. *African Journal of Biotechnology*. 2012: 16655-16660. doi: 10.5897/AJB11.3356.

20. El-Nurkey, El-Attar, Aboulata A.E., Othman B., El-dougDoug K.A. Expression of Recombinant gD2 Protein in Transgenic Tomato plants for development of a plant-derived vaccine against Human herpes virus 2. *Current Egyptian J. Virol*. 2014, 11(2): 1–13.

21. Qi Y., Xu Y., Pan Y., Li S., Li B., Pan M., Li Y. Overexpression and purification of HSV-2 glycoprotein D in suspension *CHO cells* with serum-free medium and immunogenicity analysis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2015, 63(3): 312–319. doi:10.1002/bab.1386.

22. Bommakanti G., Lu X., Citron M.P., Najjar T.A., Heidecker G.J., ter Meulen J., Varadarajan R., Liang X. (2012). Design of *Escherichia coli* - expressed stalk domain immunogens of H1N1 hemagglutinin that protect mice from lethal challenge. *Journal of virology*. 2012, 86(24): 13434–13444. doi: 10.1128/JVI.01429-12.

23. Wang S.C., Liao H.Y., Zhang J.Y., Cheng T.R., Wong C.H. Development of a universal influenza vaccine using hemagglutinin stem protein produced from *Pichia pastoris*. *Virology*. 2019, 526: 125–137. doi: 10.1016/j.virol.2018.10.005.

-
24. Mallajosyula V.V., Citron M., Ferrara F., Lu, X., Callahan C., Heidecker, G.J., Sarma S.P., Flynn J.A., Temperton N.J., Liang X., Varadarajan R. Influenza hemagglutinin stem-fragment immunogen elicits broadly neutralizing antibodies and confers heterologous protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014, 111(25): E2514–E2523. doi: 10.1073/pnas.1402766111.
25. Mallajosyula V.V., Citron M., Ferrara F., Temperton N.J., Liang X., Flynn, J.A., Varadarajan R. Hemagglutinin Sequence Conservation Guided Stem Immunogen Design from Influenza A H3 Subtype. *Frontiers in immunology*. 2015, 6: 329. doi: 10.3389/fimmu.2015.00329.
26. Sączyńska V., Romanik A., Florys K., Cecuda-Adamczewska V., Kęsik-Brodacka M., Śmietanka K., Olszewska M., Domańska-Blicharz K., Minta Z., Szewczyk B., Płucienniczak G., Płucienniczak A. A novel hemagglutinin protein produced in bacteria protects chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses by inducing H5 subtype-specific neutralizing antibodies. *PloS one*. 2017, 12(2): e0172008. doi: 10.1371/journal.pone.0172008.
27. Athmaram T.N., Saraswat S., Santhosh S.R., Singh A.K., Suryanarayana, W.S., Priya R., Gopalan N., Parida M., Rao P.V., Vijayaraghavan R. Yeast expressed recombinant Hemagglutinin protein of novel H1N1 elicits neutralising antibodies in rabbits and mice. *Virology journal*. 2011, 8: 524. doi: 10.1186/1743-422X-8-524.
28. Pietrzak M., Macioła A., Zdanowski K., Protas-Klukowska A.M., Olszewska M., Śmietanka K., Minta Z., Szewczyk B., Kopera E. An avian influenza H5N1 virus vaccine candidate based on the extracellular domain produced in yeast system as subviral particles protects chickens from lethal challenge. *Antiviral research*. 2016, 133: 242–249. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.08.001.
29. Kanagarajan S., Tolf C., Lundgren A., Waldenström J., Brodelius P.E. Transient expression of hemagglutinin antigen from low pathogenic avian influenza A (H7N7) in *Nicotiana benthamiana*. *PloS one*. 2012, 7(3): e33010. doi: 10.1371/journal.pone.0033010.

-
30. Huang B., Wang W., Li R., Wang X., Jiang T., Qi X., Gao Y., Tan W., Ruan L. Influenza A virus nucleoprotein derived from *Escherichia coli* or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice. *Virology journal*. 2012, 9:322. doi: 10.1186/1743-422X-9-322.
31. Back Y.W., Shin K.W., Choi S., Park H.S., Lee K.I., Choi H.G., Kim H.J. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2005c Induces Dendritic Cell Maturation and Th1 Responses and Exhibits Immunotherapeutic Activity by Fusion with the Rv2882c Protein. *Vaccines*. 2020, 8(3): 370. doi:10.3390/vaccines8030370.
32. Bando-Campos G., Juárez-López D., Román-González S.A., Castillo-Rodal A.I., Olvera C., López-Vidal Y., Arreguin-Espinosa R., Espitia C., Trujillo-Rodan M.A., Valdez-Cruz, N.A. Recombinant O-mannosylated protein production (PstS-1) from *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as a tool to study tuberculosis infection. *Microbial Cell Factories*. 2019, 18: 11 doi:10.1186/s12934-019-1059-3.
33. Byun E.H., Kim, W.S., Kim J.S., Jung I.D., Park Y.M., Kim H.J., Cho S.N., Shin S.J. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0577, a novel TLR2 agonist, induces maturation of dendritic cells and drives Th1 immune response. *The FASEB Journal*. 2012, 26(6): 2695–2711. doi:10.1096/fj.11-199588.
34. Xue Y., Bai Y., Gao X., Jiang H., Wang L., Gao H., Xu Z. Expression, purification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* RpfE protein. *Journal of biomedical research*. 2012, 26(1): 17–23. doi: 10.1016/S1674-8301(12)60003-7.
35. Aghababa H., Mobarez A.M., Behmanesh M., Khoramabadi N., Mobarhan M. Production and Purification of Mycolyl Transferase B of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tanaffos*. 2011, 10(4): 23–30.
36. Zarif R., Sankian M., Gholubi A., Farshadzadeh Z., Soleimanpour S., Youssefi F., Karamoddini M., Ghazvini K., Varasteh A. Cloning and Expression of *Mycobacterium tuberculosis* Major Secreted Protein Antigen 85B (Ag85B) in *Escherichia coli*. *Jundishapur J Microbiol*. 2013, 6(2):112-116. doi: 10.5812/jjm.4701.

-
37. Chamchoi N., Rudeejaronrung K., Nantamas T., Suwan P., Lormlek S., Sritalaharauthai V., Boonyarattanakalin S. Rv1886c Gene Expression for the Production of *Mycobacterium tuberculosis* Major Secreted Protein Antigen 85B in *Escherichia coli*. *Science & Technology Asia*. 2017, 22(1): 19-26. doi: 10.14456/tijsat.2017.3
38. Shi D.Y., Chen B.Y., Mao Y.Y., Zhou G., Lu J.S., Yu Y.Z., Xhou X.W., Sun, Z.W. Development and evaluation of candidate subunit vaccine against botulinum neurotoxin serotype B. *Hum Vaccin Immunother*. 2019, 15(3): 755–760. doi:10.1080/21645515.2018.1547613.
39. Shi D.Y., Liu F.J., Mao Y.Y., Cui R.T., Lu J.S., Yu Y.Z., Fong X.J., Yang Z.X., Sun Z.W., Pang, X. Development and evaluation of candidate subunit vaccine and novel antitoxin against botulinum neurotoxin serotype E. *Hum Vaccin Immunother*. 2020, 16(1): 100–108. doi:10.1080/21645515.2019.1633878.
40. Yari K, Fatemi S.S, Tavallaei M. High level expression of recombinant BoNT/A-Hc by high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012, 35(3):407-14. doi: 10.1007/s00449-011-0579-y.
41. Gil L.A., da Cunha C.E., Moreira G.M., Salvarani F.M., Assis R.A., Lobato F.C., Mendonça M., Dellagostin O.A., Conceição F.R. Production and evaluation of a recombinant chimeric vaccine against clostridium botulinum neurotoxin types C and D. *PloS one*. 2013, 8(7): e69692. doi: 10.1371/journal.pone.0069692.
42. Yu Y.Z., Zhang S.M., Ma Y., Zhu H.Q., Wang W.B., Du Y., Zhou X.W., Wang R.L., Wang S., Yu W.Y., Huang P.T., Sun Z.W. Development and evaluation of candidate vaccine and antitoxin against botulinum neurotoxin serotype F. *Clin Immunol*. 2010, 137(2):271-80. doi: 10.1016/j.clim.2010.07.005.
43. Alizadeh H., Dezfulian M., Rahnema M., Fallah J., Esmaeili D. Protection of BALB/c mice against pathogenic *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* by vaccination with recombinant Omp16. *Iran J Basic Med Sci*. 2019, 22(11): 1302–1307. doi: 10.22038/ijbms.2019.36369.8665.
44. Akbari R., Sekhavati M.H., Bahrami A., Majidzadeh Heravi R., Yousefi S. Production of *Brucella* lumazine Synthase Recombinant Protein to Design a Subunit

Vaccine against Undulant Fever *Arch Razi Inst.* 2019, 74(1): 1-6. doi: 10.22092/ari.2019.117997.

45. Zhu L., Wang Q., Wang Y., Xu Y., Peng D., Huang H., Hu L., Wei K., Zhu R. Comparison of Immune Effects Between *Brucella* Recombinant Omp10-Omp28-L7/L12 Proteins Expressed in Eukaryotic and Prokaryotic Systems. *Frontiers in veterinary science.* 2020, 7: 576. doi: 10.3389/fvets.2020.00576.

46. Lim J.J., Kim D.H., Lee J.J., Kim D.G., Min W., Lee H.J., Rhee M.H., Kim S. Protective effects of recombinant *Brucella abortus* Omp28 against infection with a virulent strain of *Brucella abortus* 544 in mice. *Journal of veterinary science.* 2012, 13(3): 287–292. doi: 10.4142/jvs.2012.13.3.287.

47. Liu W.X., Hu S., Qiao Z.J., Chen W.Y., Liu L.T., Wang F.K., Hua R.H., Bu Z.G., Li X.R. Expression, purification, and improved antigenic specificity of a truncated recombinant bp26 protein of *Brucella melitensis* M5-90: a potential antigen for differential serodiagnosis of brucellosis in sheep and goats. *Biotechnol Appl Biochem.* 2011, 58(1):32-8. doi: 10.1002/bab.11.

48. Wen Z., Boddicker M.A., Kaufhold R.M., Khandelwal P., Durr E., Qiu P., Lucas B.J., Nahas D.D., Cook J.C., Touch S., Skinner J.M., Espeseth A.S., Przysiecki C.T., Zhang L. Recombinant expression of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein in *E. coli* outer membrane as a substrate for vaccine research. *BMC microbiology.* 2016, 16(1): 165. doi: 10.1186/s12866-016-0787-3.

49. Kalbina I., Wallin A., Lindh I., Engström P., Andersson S., Strid K.A. Novel chimeric MOMP antigen expressed in *Escherichia coli*, *Arabidopsis thaliana*, and *Daucus carota* as a potential *Chlamydia trachomatis* vaccine candidate. *Protein Expr Purif.* 2011, 80(2): 194-202. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.010.

50. Madico G., Gursky O., Fairman J., Massari P. Structural and Immunological Characterization of Novel Recombinant MOMP-Based Chlamydial Antigens. *Vaccines.* 2017, 6(1): 2. doi: 10.3390/vaccines6010002.

51. Olsen A.W., Theisen M., Christensen D., Follmann F., Andersen, P. Protection against Chlamydia promoted by a subunit vaccine (CTH1) compared with

a primary intranasal infection in a mouse genital challenge model. *PloS one*. 2010, 5(5): e10768. doi: 10.1371/journal.pone.0010768.

52. Vromman F., Perrinet S., Gehre L., Subtil A. The DUF582 Proteins of *Chlamydia trachomatis* Bind to Components of the ESCRT Machinery, Which Is Dispensable for Bacterial Growth *in vitro*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2016, 6:123. doi: 10.3389/fcimb.2016.00123.

53. Choi J.Y., Shin S., Kim N.Y., Son W.S., Kang T.J., Song D.H., Yu C.H., Hur G.Y., Shin, Y. K. A novel staphylococcal enterotoxin B subunit vaccine candidate elicits protective immune response in a mouse model. *Toxicon*. 2017, 131: 68-77. doi:10.1016/j.toxicon.2017.03.012.

54. Agrawal R., Singh P.K., Sharma S.K., Kamboj D.V., Goel A.K., Singh L. Highly Expressed Recombinant SEB for Antibody Production and Development of Immunodetection System. *Indian Journal of Microbiology*. 2012, 52(2): 191–196. doi:10.1007/s12088-011-0173-7.

55. Li T., Huang M., Song Z., Zhang H., Chen C. Biological characteristics and conjugated antigens of ClfA A-FnBPA and CP5 in *Staphylococcus aureus*. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*. 2018, 82(1): 48–54.

56. Horii T., Shirai H., Jie L., Ishii K.J., Palacpac N.Q., Tougan T., Hato M., Ohta N., Bobogare A., Arakaki N., Matsumoto Y., Namazue J., Ishikawa T., Ueda S., Takahashi M. Evidences of protection against blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36. *Parasitology International*. 2010, 59(3): 380–386. doi:10.1016/j.parint.2010.05.002.

57. Cowan G.J.M., Bockau U., Eleni-Muus J., Aldag I., Samuel K., Creasey A.M., Wartmann M.W.W., Cavanagh D.R. A Novel Malaria Vaccine Candidate Antigen Expressed in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS ONE*. 2014, 9(1): e87198. doi:10.1371/journal.pone.0087198

58. Cowan G.J., Creasey A.M., Dhanasarnsombut K., Thomas A.W., Remarque E.J., Cavanagh D.R. A malaria vaccine based on the polymorphic block 2 region of

MSP-1 that elicits a broad serotype-spanning immune response. *PloS one*. 2011, 6(10): e26616.

59. McAtee C.P., Seid C.A., Hammond M., Hudspeth E., Keegan B.P., Liu Z., Wei J., Zhan B., Arjona-Sabido R., Cruz-Chan V., Dumonteil E., Hotez P.J., Bottazzi M.E. Expression, purification, immunogenicity and protective efficacy of a recombinant nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*, a vaccine candidate for preventing cutaneous leishmaniasis. *Protein Expr Purif*. 2017, 30: 129-136. doi: 10.1016/j.pep.2016.10.008.

60. Hudspeth E.M., Wang Q., Seid C.A., Hammond M., Wei J., Liu Z., Zhan B., Pollet J., Heffernan M.J., McAtee C.P., Engler D.A., Matsunami R.K., Strych U., Asojo O.A., Hotez P.J., Bottazzi M.E. Expression and purification of an engineered, yeast-expressed *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase with immunogenic properties. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2016, 12(7): 1707–1720. doi: 10.1080/21645515.2016.1139254.

61. Baharia R.K., Tandon R., Sharma T., Suthar M.K., Das S., Siddiqi M.I., Saxena J.K., Sundar S., Dube A. Recombinant NAD-dependent SIR-2 protein of *Leishmania donovani*: immunobiochemical characterization as a potential vaccine against visceral leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015, 9(3): e0003557. doi: 10.1371/journal.pntd.0003557.

62. Gupta R., Kushawaha P.K., Tripathi C.D.P., Sundar S., Dube A. A novel recombinant *Leishmania donovani* p45, a partial coding region of methionine aminopeptidase, generates protective immunity by inducing a Th1 stimulatory response against experimental visceral leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*. 2012, 42(5): 429–435. doi:10.1016/j.ijpara.2012.02.013.

63. Goto Y., Bhatia A., Raman V.S., Liang H., Mohamath R., Picone A.F., Vidal S.E., Vedvick T.S., Howard R.F., Reed S.G. KSAC, the first defined polyprotein vaccine candidate for visceral leishmaniasis. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2016, 18(7): 1118–1124. doi: 10.1128/CVI.05024-11.

64. Cruz J.J., Lizama L.V., Huchim V.D., Sierra M.J.R., Vega P.M., Vallado M.R., Lopez J.O., Pucheta C.I.F., Gillespie P., Khan B., Bottazzi M.E., Hotez P.J.,

Dumonteli E. Production of recombinant TSA-1 and evaluation of its potential for the immuno-therapeutic control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Hum Vaccin Immunother.* 2019, 15(1): 210–219. doi: 10.1080/21645515.2018.1520581.

65. Bivona A.E., Alberti A.S., Matos M.N., Cerny N., Cardoso A.C., Morales C., Gonzalez G., Czorla S.I., Malchiodi E.L. *Trypanosoma cruzi* 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018, 12(3): e0006384. doi: 10.1371/journal.pntd.0006384.

66. Leroux-Roels G., Clément F., Vandepapelière P., Fourneau M., Heineman T.C., Dubin G. Immunogenicity and safety of different formulations of an adjuvanted glycoprotein D genital herpes vaccine in healthy adults: a double-blind randomized trial. *Human vaccines & immunotherapeutics.* 2013, 9(6): 1254–1262. doi: 10.4161/hv.24043

67. Широкова И. Вакцины - специфический сегмент фармрынка. *Ремедиум.* 2012, №12: 22-29.

68. Широкова И. Фармацевтическая упаковка: общие тенденции и российские перспективы. *Ремедиум.* 2012, 2: 18-23.

69. Чисельність населення (за оцінкою) на 1 січня 2021 року та середня чисельність у січні-грудні 2020 року [Електронний ресурс] Режим доступу: http://database.ukrcensus.gov.ua/PXWEB2007/ukr/news/op_popul.asp

70. Автоматична лінія розливу та закупорювання рідких препаратів у флакони. Модель ТБ-056 [Електронний ресурс] Режим доступу: <http://automatica.kiev.ua/tb056.html>

71. Баринский И.Ф., Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Махмудов Ф.Р., Сергеев О.В. Вакцины как средство специфической иммунокоррекции при герпетических инфекциях. *Вопросы вирусологии.* 2014, №1: 5-11.

72. Застосування і ефективність вакцини від герпесу [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://bezbolezni.info/herpes/privivka-ot-gerpesa.html>

73. Мірошникова Є.О. Вакцинація від герпесу [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://mrfilin.com/privivka-ot-gerpesa>

-
74. Perez-Hernandez M., Gadea I., Escribano J., Tabares E., Gomez S. Expression and characterization of the gD protein of HSV-2 fused to the tetramerization domain of the transcription factor p53. *Protein Expr Purif.* 2015, 115: 54–60. doi: 10.1016/j.pep.2015.07.009
75. Zian J., Tao S., Xueshan X., Qiujiang W., Yuzhu S., Qinqin H., Qiang C., Juan H., Jinyang Z. Optimized Expression, Purification of Herpes B Virus gD Protein in *Escherichia coli*, and Production of Its Monoclonal Antibodies. *Jundishapur J Microbiol.* 2016: 32183. doi: 10.5812/jjm.32183
76. Man W., Shuai J., Li Z., Chaoqun W., Ruifeng M., Murugavel P. Efficient production of recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 in *Pichia pastoris* and its protective efficacy against viral challenge in mice. *Arch Virol.* 2017, 162(3): 701-711. doi: 10.1007/s00705-016-3154-7
77. Byrne B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Current Opinion in Structural Biology.* 2015, 32: 9–17. doi:10.1016/j.sbi.2015.01.005
78. Awasthi S., Lubinski J. M., Shaw C. E., Barrett S. M., Cai M., Wang F., Friedman H. M. Immunization with a Vaccine Combining Herpes Simplex Virus 2 (HSV-2) Glycoprotein C (gC) and gD Subunits Improves the Protection of Dorsal Root Ganglia in Mice and Reduces the Frequency of Recurrent Vaginal Shedding of HSV-2 DNA in Guinea Pigs Compared to Immunization with gD Alone. *Journal of Virology.* 2011, 85(20): 10472–10486. doi:10.1128/jvi.00849-11
79. Быкова А.С., Ващенко Е.В. Общая микробиология. – Харьков: НТУ “ХП”, 2016. – 181 с.
80. Пирог Т.П., Игнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
81. Зав'ялов В.Л., Зоткіна Л.В., Немирович П.М., та інші Процеси і апарати біотехнологічних виробництв // Метод. рекомендації до вивч. дисц., викон. курс. і контр. робіт для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2012. – 98 с.

82. Мельничук М.Д., Кляченко О.Л., Бородай В.В., Коломієць Ю.В. Промислова біотехнологія. – Київ: ФОП Корзун Д.Ю., 2014. – 252 с.

83. Стерилізуємий ферментер BIOSTAT® C plus [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.gluvexlab.com/catalog/fermentery-bioreaktory/fermenter-sterilizuemyu-biostat-cplus/>

84. Ручай Н.С. Технология микробного синтеза: электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» / Н. С. Ручай, И. А. Гребенчикова. – Минск : БГТУ, 2014. – 167 с.

85. Концентрування та висушування біопрепаратів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://mojaosvita.com.ua/biologija/koncentruvannya-ta-visushuvannya-biopreparativ//>.

86. Центрифугування. Характеристика процесу [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://chemworld.com.ua/index.php/klinichnabiokhimiia/59-tsentrifuguvannya>.

87. Карлаш Ю.В. основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій / Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.

88. Гильчук П.В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме. *Біополімери і клітина*. 2004, 20(3): 182-192
УДК 579.69 + 576.311.31

89. Остапченко Л.І, Компанець І.В., Скопенко О.В. Біоорганічна хімія. Практикум: навч. посіб. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2019. – 400 с.

90. Соникация Lysis: Сотовый срыв & экстракция [Електронний ресурс] Режим доступу: // <https://www.hielscher.com/ru/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm>

91. Ультразвуковой гомогенизатор JY96-IIN [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://alemtrade.com/p49086962-ultrazvukovoj-gomogenizator-jy96.html>

92. Difference Between Detergent and Chaotropic Agent [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.differencebetween.com/difference-between-detergent-and-chaotropic-agent/>

93. Clark E.D.B. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001, 12(2): 202–207. doi:10.1016/s0958-1669(00)00200-7

94. Волошина О.С., Антонюк М.М. Методи досліджень в біотехнології: конспект лекцій для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2012. – 157 с.

95. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа: учебник. – Москва. : МГУ им. Ломоносова М.В., 2007. – 109 с.

96. Ибрагимов А.Н., Бикмуллин А.Г., Сатаева Д.А и др. Хроматографические методы очистки белков. учебно-методическое пособие. – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. – 48 с.

97. Сова В.В., Кусайкин М.И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.

98. Колонка PRP-X100 Anion Exchange HPLC Column. Колонка для іонообмінної хроматографії [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.hamiltoncompany.com/laboratory-products/hplc-columns/79346>

99. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посіб. – К.: НУХТ, 2010. – 323 с.

100. Методы сушки продуктов фармацевтической промышленности. [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://life-prog.ru/1_22779_metodi-sushki-produktov-farmatsevticheskoj-promishlennosti.html

101. Вакуумный сушильный шкаф Binder VD 23 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://analytprom.ru/vakuumnyj-sushilnyj-shkaf-binder-vd-23/>

102. Зав'ялов В.Л., Бодров В.С., Мисюра Т.Г. Процеси і апарати біотехнологічних виробництв: курс лекцій для студ. спец. 6.092900 напр. 0929 „Біотехнологія” ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2007. – 88 с.

103. Солоня О.В., Білик Д.А. Вібраційні млини для помелу сипких матеріалів сільськогосподарського виробництва. *Вібрації в техніці та технологіях*. 2013, 70(2): 196-199.

104. Букін С.Л., Букіна А.С. Нова конструкція бігармонійного вібротрипа для тонкого подрібнення різноманітних матеріалів. *Підготовчі процеси збагачення*. 2015, 91(50): 60-65.

105. Лабораторные алюминиевые бюксы - назначение и использование [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://metallicheckiy-portal.ru/articles/nauka/laboratornoe_oborudovanie/laboratornie_aluminievie_byksi-naznachenie_i_ispolzovanie

106. Зони чистих приміщень та вимоги до них. Клас приміщення GMP. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://profinstall.com.ua/ua/statt%D1%96/farmaczevtichne-virobnictvo/zonyi-chistyix-pomeshhenij-i-trebovaniya-k-nim.-klass-pomeshheniya-gmp>

107. Дезінфектант БІОКОНТАКТ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://agronet.ua/obyavlenie/id25199-preparat-kormoviy-biokatalizatorniy>

108. Дезекон ОМ [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://interdez.com.ua/product/dezinficiruyuschee-sredstvo-desekon-om-baltiachemi-kiev>

109. Фермисепт средство для мытья и дезинфекции [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://profiplus.in.ua/p772014975-fermisept-sredstvo-dlya.html>

110. Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів: конспект лекцій. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.

111. Мотина Г., Абрамов А. Система подготовки вентиляционного воздуха. *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике*. 2003, (3):72-74.

112. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій для студентів спеціальності 133 «Галузеве машинобудування» спеціалізація «Обладнання фармацевтичних та

біотехнологічних виробництв» / Уклад.: В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251 с.

113. Настанова СТ-Н МОЗУ 42–6.2:2021. Лікарські засоби доклінічна оцінка вакцин [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://moz.gov.ua/uploads/6/32521-dn_1765_19_08_2021_dod.pdf

114. *Турянская Г.М., Гришук Л.В.* Технологія лікарських форм промислового виробництва. Стерильні та асептично приготовлювані лікарські форми: навчально-методичний посібник. – О.: Одеський національний університет ім. Мечникова І.І., 2007. – 77 с.

115. *Губин М.М.* Требования, конструктивные особенности применительно к GMP [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.vipsmed.ru/sections/information/publications/obshhie-statyi/upakovka-dlya-lekarstvennykh-preparatov>

116. Комплект для мікрофільтрації та насос SartoJet [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://www.sartorius-sd.com.ua/index.php>

117. Автоматическая линия разлива и укупорки жидких препаратов во флаконы, ьодель ТБ-056 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://automatica.kiev.ua/tb056.html>

118. Автоматическая инспекционная машина для ампул, картриджей и флаконов малого диаметра, А&V [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://rolstech.ru/oborudovaniye/inspektsionnoe-oborudovanie/inspektsionnaya-mashina-a-v/>

119. Лінія для етикетування та пакування флаконів у шоу-бокс [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://campakrussia.ru/liniya-dlya-etiketirovki-i-upakovki-flakonov-v-shou-boks/>

120. Romaco Promatic ПАК [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://cphem.com/files/Promatic/Romaco_DB_Promatic_PAK_320-RU.pdf

121. *Пирог Т.П., Антонюк М.М.* Загальна мікробіологія і вірусологія: Лаб. практикум. – К.: НУХТ, 2016. – 112 с.

-
122. *Aryal S. Escherichia coli (E. coli) - An Overview* [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://microbenotes.com/escherichia-coli-e-coli/>
123. *Пирог Т. П., Пенчук Ю. М. Технологія мікробного синтезу лікарських засобів* // Метод. рекомендації до викон. курс. роботи для студ. напряму 6.051401 «Біотехнологія» ден. форм. навч. – К.: НУХТ. – 2015. – 59 с.
124. Ernst O., Zor T. Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualized Experiments*. 2010, (38): e1918. doi:10.3791/1918
125. Volova T., Demidenko A., Kiselev E., Baranovskiy S., Shishatskaya E., Zhila N. Polyhydroxyalkanoate synthesis based on glycerol and implementation of the process under conditions of pilot production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019, (103): 225–237. doi: 10.1007/s00253-018-9460-0
126. *Хромова Н.Ю. Біотехнологічна конверсія зернової сировини для отримання пробіотичних продуктів і кормових білкових добавок: дис. на здобуття наук. ступеня канд. техн. наук: спец. 03.01.06 – «Біотехнологія» (в тому числі нанобіотехнологія) / Н.Ю. Хромова. - Москва, 2019. - 167 с.*
127. Переробка сміття і відходів в Україні [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://region-2001.com.ua/services/pererobka-vtorsirovini/pererobka-smittyta-ta-vidkhod>
128. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доповнення 4. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2011. — 540 с
129. Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M100MA [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://simvolt.ua/ru/laboratorniy-analзатор-vologost-metrinco-m100ma.html/>
130. Метод иммуноферментного анализа в диагностике [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://novamedline.com/ru/enzyme-immunoassay>
131. Иммуноферментный анализ ELISA [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://imtek.ru/support/methods/elisa/>
132. Вестерн-блоттинг Высококачественная продукция для различных этапов вестерн-блоттинга [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://itsltd.kz/millipore/membrana-blotting/western-blotting.pdf>

ДОДАТКИ

Додаток 1

Перелік публікацій, за період навчання на бакалавраті

Тези у збірниках міжнародних та всеукраїнських конференцій:

1. Бондарчук В.І., Скроцька О.І. Рекомбінантні білки, як основа субодиничних вакцини проти вірусу денге (Dengue virus) // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2020» (м. Сєвєродонецьк, 4 грудня 2020 р.). – С. 25-26.
2. Бондарчук В.І. Рекомбінантний глікопротеїн gD як основа для створення протигерпетичної вакцини // Матеріали 87-ї Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті», (м. Київ, НУХТ, 15-16 квітня 2020 р.). – С. 392.
3. Бондарчук В.І., Скроцька О.І. Перспективи в розробці субодиничних вакцин проти вірусу простого герпесу 2 типу // Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин» (Харків, 17 березня 2021 р.). – С. 21.-22.

РЕКОМБІНАНТНІ БІЛКИ, ЯК ОСНОВА СУБОДИНИЧНИХ ВАКЦИНИ ПРОТИ ВІРУСУ ДЕНГЕ (DENGUE VIRUS)

Бондарчук В.І. ФБ-1-2М

Скроцька О.І., доцент, кандидат біологічних наук
Національний університет харчових технологій

Вакцинація – один з ефективних та безпечних способів захисту населення від інфекційних захворювань. Однією з таких є вірус Денге (Dengue virus), який став глобальною загрозою для здоров'я, оскільки щороку ним хворіє до 390 мільйонів людей і фіксується 25 тис. смертей. Зважаючи на те, що спеціальної протівірусної терапії проти вірусу Денге немає, то профілактика шляхом вакцинації є головним фактором зменшення тягаря захворювання. Оскільки єдина ліцензована жива атенуйована вакцина проти Денге (Dengvaxia) не може забезпечити збалансований захист від усіх серотипів, а також виявлений високий ризик госпіталізації вакцинованих, тоді критичним постало питання, щодо створення ефективної вакцини. Розробка субодиничної вакцини на основі рекомбінантних білків набуває величезного значення в наші дні завдяки її широкому застосуванню як біофармацевтичного продукту та підтвердженій безпеці, ніж традиційні вакцини.

Amorim із співавторами запропоновано спосіб рефолдингу рекомбінантного білка (NS1) вірусу Денге. Він включав солубілізацію білка NS1, яку провели після денатурації тілець включень і повторного відтворення конформації досліджуваного білка. Отриманий таким способом білок NS1 не потребує глікозилювання або інших посттрансляційних модифікацій для формування димерної форми і взаємодіє з антитілами *in vitro*. В ході роботи використовували *Escherichia coli* BL21 та 0,5 мМ IPTG в якості індуктора. В результаті виділення і очищення вдалось отримати 3,5 мг очищеного білку NS1 [1].

Сконструйовано рекомбінантний штам *Pichia pastoris* KM71, клітини якого синтезують неструктурний глікопротеїн NS1 вірусу Денге. Встановлено, що оптимальні умови для експресії рекомбінантного білка у 2% метанолі були досягнуті через 72 год індукції. В результаті було показано, що рекомбінантний NS1 взаємодіє з моноклональними антитілами у комерційному діагностичному наборі *in vitro* та викликає імунну відповідь *in vivo* [2].

Є повідомлення про синтез розчинного білка NS1 у генетично-модифікованих клітинах *E. coli*. Авторам вдалось досягти концентрації рекомбінантного білку 155 мг/л при використанні 0,2 % арабінози як індуктора, яку вносили після 4 годин культивування *E. coli*. Антигенні властивості білку було проаналізовано *in vitro* і показано, що він ефективно взаємодіє з антитілами і не потребує посттрансляційної модифікації [3].

Таким чином, отримання рекомбінантних білків, зокрема NS1 вірусу Денге є перспективним шляхом методу діагностики даного захворювання, а також потенційним

кандидатом вирішення створення ефективної та безпечної вакцини проти лихоманки вірусу Денге.

Література:

1. Amorim J. H., Porchia B.F.M.M., Balan A., Cavalcante R.C.M., da Costa, S.M., de Barcelos Alves A.M., de Souza Ferreira L.C. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *Journal of Virological Methods*. 2010, 167(2): 186-192.
2. Puspasari F., Putri R.D., Aisyah Damayanti R.R.R., Yuwita A., Alisjahbana B., Natalia D. Construction and expression of a synthetic gene encoding nonstructural glycoprotein NS1 of dengue 2 virus in *Pichia pastoris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017, 7(8): 689-693.
3. Sankar S.G., Dhanajeyan K.J., Paramasivan R., Thenmozhi V., Tyagi B.K., Vennison S.J. High-level expression of functionally active Dengue-2 non-structural antigen 1 production in *Escherichia coli*. *BioMed Research International*. 2013, 343195.

Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", 15–16 квітня 2021 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1.

11. Рекомбінантний глікопротеїн gD як основа для створення протигерпетичної вакцини

Валерія Бондарчук, Оксана Скроцька
Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Розробка субдиничної вакцини на основі рекомбінантних білків набуває величезного значення в наші дні завдяки її широкому застосуванню як безпечного та якісного біофармацевтичного продукту, що не потребує рефрижераторів, в порівнянні з традиційними вакцинами

Матеріали та методи. Проведено аналіз релевантних наукових літературних джерел в Google Scholar та PubMed за останні 10 років, з метою пошуку та порівняння ефективності синтезу рекомбінантних білків, як основи субодиничних вакцин, за використання мікроорганізмів як систем експресії, та дослідження їх біологічної дії на моделі *in vitro* та *in vivo*.

Результати та обговорення. На противагу традиційним вакцинам, які мають ряд недоліків, серед яких культивування інфекційних віріонів та їх залишкова вірулентність, стають субодиничні вакцини. Це відносно новий тип вакцин на основі рекомбінантних білків, які є антигенами. При цьому вони вважаються безпечніші та економічно вигідні з промислової точки зору так як не потребують участі інфекційного агента у своїх виробничих процесах, є стабільними, характеризуються імуногенною спрямованістю і не викликають побічних реакцій [1].

Розробкою нового кандидата рекомбінантного глікопротеїну gD як основи субодиничної вакцини проти вірусу простого герпесу II типу займались Vikas зі співавтор. [2]. Експресія gD в *Escherichia coli* BL21 (DE3) відбувалась у вигляді тілець включень, а концентрація становила 355 мг/л. Wang із співавторами для синтезу рекомбінантного gD культивували дріжджі *Pichia pastoris* GS115, при цьому концентрація рекомбінантного білка становила 425 мг/л [3]. Варто зазначити, що всі отримані рекомбінантні білки взаємодіяли з відповідними антитілами *in vitro*, а також викликали імунну відповідь *in vivo*.

Висновки. Отже, наведені літературні дані свідчать, що отримання рекомбінантних білків, як основи субодиничних вакцин, за допомогою систем експресії мікроорганізмів є перспективним завданням як з біологічного так і з технологічного аспектів.

Література

1. Brisse M., Vrba S.M., Kirk N., Liang Y., Ly H. Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. *Front Immunol.* 2020, 11: 583077. doi:10.3389/fimmu.2020.583077
2. Vikas K.S., Sandeep K., Rajeev K.D., Abdul S.A., Nirmal K., Suman T. Generation of oligomers of subunit vaccine candidate glycoprotein D of Herpes Simplex Virus -2 expressed in fusion with IgM Fc domain(s) in *Escherichia coli*: A strategy to enhance the immunogenicity of the antigen. *3 Biotech.* 2020, 10(11): 463 doi:10.1007/s13205-020-02452-6.
3. Wang M., Jiang S., Zhou L., Wang C., Mao R., Ponnusamy M. Efficient production of recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 in *Pichia pastoris* and its protective efficacy against viral challenge in mice. *Archives of Virology.* 2017, 162(3): 701–711. doi:10.1007/s00705-016-3154-7.

Секція № 1. Лабораторна діагностика хвороб людини

ПЕРСПЕКТИВИ В РОЗРОБЦІ СУБОДИНИЧНИХ ВАКЦИН ПРОТИ ВІРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСУ 2 ТИПУ

Бондарчук В.І., Скроцька О.І.

Національний університет харчових технологій, м. Київ, Україна

Актуальність. Мільйони людей по всьому світу заражені вірусом простого герпесу 2-го типу (ВПГ-2), який в структурі смертності від вірусних захворювань знаходиться на другому місці. Вакцинація є найбільш ефективною стратегією зниження високих показників захворюваності та смертності, а також зменшення величезного соціального і економічного впливу. Створювати вакцини, використовуючи старі випробувані технології, вдається не завжди. У багатьох випадках вакцини на основі інактивованих мікроорганізмів виявляються неефективними, а живі вакцини — надто небезпечними. В свою ж чергу розробка субодиничної вакцини на основі рекомбінантних білків набуває величезного значення в наші дні завдяки її широкому застосуванню, у поєднанні із ад'ювантами, як високоімуногенного біофармацевтичного продукту та підтвердженій безпеці, ніж традиційні вакцини.

Матеріали і методи. На основі літературних даних, за останні 10 років, проведено ґрунтовний аналіз наукових публікацій з метою порівняння ефективності синтезу рекомбінантного білку вірусу простого герпесу 2-го типу за використання як бактеріальних так і еукаріотичних систем експресії. Дослідження ефективності глікопротеїну gD на моделі *in vitro* та *in vivo*.

Результати і висновки. Глікопротеїн gD вірусу простого герпесу II типу використовується як антиген у різних протигерпетичних субодиничних вакцинах завдяки своїй участі у зв'язуванні рецепторів чутливих клітин. Використовують gD як ключовий імуноген у більшості субодиничних вакцин, як окрему молекулу, або ж один із компонентів комбінованих рецептур інших глікопротеїнів, що беруть участь у проникненні вірусу герпесу у клітину. Виробництво рекомбінантного gD було досягнуто в декількох експресійних системах, включаючи прокаріотичні та еукаріотичні клітини. Прокаріотичні системи мають ряд переваг щодо маніпуляцій: низьку вартість і можливість отримувати за відносно короткий проміжок часу велику кількість білка. Найпоширенішою прокаріотичною системою можуть слугувати рекомбінантні клітини *Escherichia coli*, в яких усичений gD успішно експресується за рахунок індуктора IPTG, а рекомбінантний білок викликає стійку відповідь антитіл IgG у мишей. Vikaš зі співавтор. (2020) вдалося досягти високої експресії рекомбінантного глікопротеїну gD при створенні та оптимізації ними вектора експресії pET28-gD-315, який трансформували в *E. coli* BL21 (DE3) методом теплового шоку. Культуру вирощували на середовищі LB із селективним антибіотиком канаміцином 50 мкг/мл при за температури 37°C. Експресія рекомбінантного глікопротеїну gD відбувалась у вигляді тілець включень за індукції 1 мМ IPTG упродовж 6 годин при досягненні OD₆₀₀ = 0,6. Концентрація білку в культуральній рідині становила 355 мг/л, а в результаті виділення і очищення отримали 24 мг рекомбінантного gD. Поряд з цим у практиці широке застосування знайшли і еукаріотичні системи, прикладом використання

Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин – 17 березня 2021 року

яких можуть бути метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris*, які використовують в якості експресійної системи для секретованої форми gD за використання метанолу як індуктора. Дріжджі *P. pastoris* поєднують переваги низької вартості, простоти використання та високої продуктивності з еукаріотичними системами котрансляції та посттрансляції. Man зі співавтор. (2017) створили рекомбінантний вектор експресії pPIC9K-gD 1-340, який вводили в *P. pastoris* GS115 електропорацією. Культуру вирощували на середовищі YMMY упродовж 72 годин при 28°C. З метою отримання максимальної експресії рекомбінантного білка gD його індукцію проводили в різних умовах (концентрація метанолу та час внесення індуктора). Накопичення gD досягло піку через 24 години після індукції 1% метанолом і його концентрація у культуральній рідині становила 425 мг/л. Рекомбінантний gD, також продукується в системі експресії бакуловірусу. Тао зі співавтор. (2012) вдалось розробити двоступеневу культуру для експресії рекомбінантного білка gD2 за допомогою іммобілізованих клітин *Spodoptera frugiperda* Sf9, що включало в себе культивування клітин Sf9, на середовищі з 10% бичачою сироваткою, та подальшого їх іммобілізування за допомогою гідрогелю шовкового фіброїну і культивування в біореакторі після їх зараження рекомбінантним бакуловірусом, що експресує повнорозмірний ген gD2. Культивування проводились при 120-150 об/хв за температури 27°C у середовищі Grace's Insect Medium із антибіотиками 100 од/мл пеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину та 0,25 г/мл амфотерицину. Максимальна концентрація рекомбінантного білка gD2 у культуральній рідині становила 135 мг/л після 120 годин культивування. Результати дослідження показують, що іммобілізовані клітини та двоступенева культура можуть продовжити період експресії та значно підвищити синтез рекомбінантного білка.

Варто зазначити, що всі отримані рекомбінантні білки взаємодіють з антитілами *in vitro*, а також спостерігається посилена гуморальна та клітинна імунні відповіді з високим титром антитіл проти gD у мишей під час досліджень *in vivo*.

Отже, в результаті огляду літературних джерел здійснено різноплановий аналіз рекомбінантних продуцентів глікопротеїну gD для перспективи розробки сучасної імуногенної субодиночної вакцини проти вірусу простого герпесу II типу за використання мікроорганізмів. Результати свідчать про те, що конструювання субодиночних вакцин на основі рекомбінантних білків все більше доводить свою ефективність та безпечність у боротьбі зі смертельними інфекційними захворюваннями.



Generation of oligomers of subunit vaccine candidate glycoprotein D of Herpes Simplex Virus-2 expressed in fusion with IgM Fc domain(s) in *Escherichia coli*: A strategy to enhance the immunogenicity of the antigen

Vikas Kumar Singh¹ · Sandeep Kumar¹ · Rajeev Kumar Dhaked² · Abdul S. Ansari² · Nirmal K. Lohiya³ · Suman Tapryal³

Received: 19 June 2020 / Accepted: 23 September 2020
 © King Abdulaziz City for Science and Technology 2020

Cloning of chimeric vaccine constructs

The glycoprotein D DNA fragments (gD-315, gD-305, and gD-305C) were cloned in pET28b (+) plasmid (Novagen) between *NdeI* and *NotI* restriction sites. The chimeric constructs were generated by subsequent cloning of μ CH4/ μ CH3-CH4 gene fragments downstream of the respective gD gene between *NotI* and *XhoI* restriction sites. Briefly, the gD DNA fragments of different lengths were amplified by PCR using specific primers, as described earlier, and purified using a PCR clean-up kit (Macherey–Nagel). The purified samples of pET28b (+) and gD DNA were double digested using respective restriction enzymes (New England Biolabs) as per the manufacturer’s protocol. The restricted DNA samples were gel extracted using a gel extraction kit (Macherey–Nagel). The vector (~ 50 ng) and insert DNA (~ 25 ng) fragments were ligated at a 1:3 molar ratio using T4 DNA ligase (New England Biolabs) as per manufacturer’s instructions. Thereafter, the ligation mixture was heat-inactivated (65 °C for 20 min) and used to transform competent *E. coli* DH5 α cells by heat shock method (Froger and Hall 2007). The transformed cells were spread over LB agar plates (supplemented with 50 μ g/ml kanamycin) and incubated overnight at 37 °C. The colonies of the transformed cells were obtained the next day in case of all the vaccine candidates.

of vaccine candidates, each vaccine chimeric clone was re-sequenced, confirming its correct sequence and reading frame.

Protein expression

E. coli BL21 (DE3) cells were transformed with the recombinant plasmids carrying vaccine constructs, (e.g., pET28-gD-315) and plated on kanamycin supplemented LB-agar plates. The next day, 5 ml of LB media (supplemented with kanamycin (50 μ g/ml) was inoculated with a single colony and incubated at 37 °C in an orbital shaker overnight with continuous shaking at 150 rpm. 400 ml TB media (supplemented with 50 μ g/ml kanamycin) was inoculated with 4 ml (1%) of the overnight grown culture and allowed to grow till OD₆₀₀ of ~ 0.8 at 37 °C. The culture were induced with 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) and after that allowed to grow in an orbital shaker at 37 °C for 6 h with continuous shaking at 200 rpm. Cells were harvested and resuspended in ice-cold sonication buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 8.0). Cultured cells were lysed by sonication (30-s burst phase/30-s rest phase/ 130 W) through 8 cycles, using Ultrasonic Processor (Cole-Parmer). The heterologous proteins in the

Table 4 Summarized information about the expression; purification; in vitro refolding; molecular weight, stoichiometry, secondary structure profile, hydrodynamic radius and polydispersity index of the vaccine proteins

Construct code	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Construct name	gD-315	gD-315- μ CH3-CH4	gD-305- μ CH4	gD-305C- μ CH4	gD-305- μ CH3-CH4	gD-305C- μ CH3-CH4
Wet weight of biomass per 1000 ml of culture (grams)	3.425	3.095	3.335	3.365	3.255	3.24
Wet weight of washed inclusion bodies (IBs) per 1000 ml of culture (gm)	0.355	0.305	0.38	0.345	0.32	0.345
% purity of IBs	35	30	35	35	30	30
Purified protein (mg)	24	19	22	25	19	20
% purity of vaccine proteins	75	70	75	75	70	70
Refolded protein (mg)	20	16	18	21	16	17
% refolding yield	83.3	84.2	81.8	84	84.2	85
Molecular weight of oligomeric candidate protein estimated by SEC (kDa) (O)	984.66	984.66	1178.15	1188.3	1184.23	1220.35
Calculated molecular weight of monomeric candidate protein (kDa) (M)	53.08	64.75	52.18	52.28	63.85	63.95