

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«___» _____ 2020 р.

**Дипломний проєкт
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Технологія виробництва вакцини БЦЖ.
Дільниця сушіння продукту»**

Виконала:

студентка IV курсу, групи БТ-61
Бойко Тетяна Юріївна

Керівник:

к.б.н., доцент
Орябінська Лариса Борисівна

Консультант

з Розділу 5 Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу: старший викладач кафедри біотехніки
та інженерії, к.т.н., доцент
Шибецький Владислав Юрійович

Рецензент:

асистент кафедри
екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.
Левтун Ігор Ігорович

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студентка _____

Київ – 2020 року

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломний проєкт студенту

Бойко Тетяні Юрївні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва вакцини БЦЖ. Дільниця сушіння продукту», керівник проєкту Орябінська Лариса Борисівна, доц. к.б.н., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: рекомбінантний штам-продуцент живої аттенуйованої ліофілізованої вакцини БЦЖ – *M. bovis* VCG Tice/ald; середовище культивування – середовище Сотона; ферментер для промислового культивування – об'єм 20 л; параметри культивування: $t = 37 \pm 0,5^\circ\text{C}$; pH 7 – 7,2; тривалість – 6-7 діб, аерація – 15 л/год; спосіб очистки продукту – cross-flow фільтрація; кінцевий продукт – ліофільно висушена біомаса вакцинного штаму, розфасована у ампули по 20 доз.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва вакцини БЦЖ; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні

характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір вакуум-сублімаційної установки, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду вакуум-сушильної шафи вакуум-сублімаційної установки – 1 арк. А1, технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1

6. Консультанти розділів проєкту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Шибецький В.Ю., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проєкту	Термін виконання етапів проєкту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	26.02.19-08.03.19	
2.	Біохімічні основи виробництва	09.03.19-20.03.19	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	21.03.19-05.04.19	
4.	Технологічна частина	06.04.19-20.04.19	
5.	Складання апаратурної схеми	21.04.19-10.05.19	
6.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	11.05.19-21.05.19	
7.	Оформлення пояснювальної записки	22.05.19-10.06.19	

Студент

Тетяна БОЙКО

Керівник

Лариса ОРЯБІНСЬКА

**Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва вакцини БЦЖ.
Дільниця сушіння продукту»**

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект: 142 с., 10 рис., 5 табл., 174 посилань.

Тема: «Технологія виробництва вакцини БЦЖ. Дільниця сушіння продукту».

Актуальність: розробка проекту за темою є актуальним завданням в умовах високої захворюваності та відсутності національного виробництва.

Мета: розробка оптимального технологічного процесу для виробництва вакцини БЦЖ на території України.

Об'єкт: жива ліофілізована аттенуйована вакцина БЦЖ.

Методи: аналіз і обробка літературних джерел, патентів, спеціалізованих матеріалів та нормативної документації на об'єкт дослідження.

Зміст: наводиться огляд промислових продуцентів, яких використовують чи потенційно можуть використовувати для отримання вакцини; охарактеризовано біологічний агент, який обрано для роботи. Наведено характеристику кінцевого продукту, а також методи, що застосовують для відділення і очищення біомаси. Описано механізми формування імунної відповіді при введенні вакцини й особливості виробництва, пов'язані із використання даного біологічного агенту. Описано генетичні особливості біооб'єкту та метод створення промислового продуценту на його основі. Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва, наведено опис стадій технологічного процесу. Обґрунтовано вибір ліофільної сушарки для процесу сушіння, проведено її конструктивний, технологічний та тепловий розрахунки, на основі яких розроблено креслення загального виду апарату. Наведено вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.

Новизна: запропоновано використання рекомбінантного штаму – *Mycobacterium bovis* BCG Tice/ald, який забезпечує високий рівень захисту від туберкульозу, а також за рахунок додаткової аланіндегідрогеназної активності долає природне інгібування глутамін-синтази аланіном в організмі людини.

ТУБЕРКУЛЬОЗ, МІКОБАКТЕРІЇ, МΥСОВАСТЕРІУМ BOVIS, ВАКЦИНА БЦЖ, ВАКУУМ-СУБЛІМАЦІЙНЕ (ЛІОФІЛЬНЕ) СУШІННЯ

ABSTRACT

Diploma project: 142 pages, 10 figures, 5 tables, 174 references.

Topic: "Technology of BCG vaccine producing. Area of the product drying".

Purpose: development of the optimal technological process for the production of BCG vaccine in Ukraine.

Object: live attenuated freeze-dried BCG vaccine/

Methods: analysis and processing of literature sources, patents, specialized materials, and regulatory documentation for the object of study.

Content: provides an overview of industrial producers used or those that can be used to produce vaccines; the characteristics of the biological agent that is selected for work are induced. The characteristics of the final product are also given, as well as the methods used to separate and purify biomass. The mechanisms of the formation of the immune response during vaccine injection and production peculiarities associated with the use of this biological agent are described. The genetic characteristics of the biological object and the method of creating an industrial producer based on it are described. A technological and apparatus production scheme has been created, a description of the stages of the technological process is given. The choice of a freeze dryer for the drying process is proved, its structural, technological, and thermal calculations are made, on the basis of which a general view of the apparatus is developed. The requirements for labor protection and the environment are given.

Novelty: the use of a recombinant strain, *Mycobacterium bovis* BCG Tice / *ald*, which provides a high level of protection against tuberculosis, and due to additional alanine dehydrogenase activity, overcomes the natural inhibition of glutamine synthase by alanine in the human body.

TUBERCULOSIS, MYCOBACTERIA, MYCOBACTERIUM BOVIS, BCG VACCINE, VACUUM-SUBLIMATION (LYOPHILIC) DRYING

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	12
1.1 Основні промислові продуценти.....	12
1.2 Таксономія.....	17
1.3 Морфологія.....	18
1.4 Культуральні ознаки.....	18
1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки.....	19
1.6 Серологічні ознаки.....	20
1.7 Поширення в природі.....	22
РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	23
2.1 Характеристика кінцевого продукту.....	23
2.2 Схема хімічних перетворень.....	23
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	25
2.4 Методи очистки цільового продукту.....	27
2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	29
2.5.1 Загальна схема формування імунної відповіді.....	29
2.5.2 Вроджена імунна відповідь на вакцинацію БЦЖ.....	32
2.5.3 Адаптивна імунна реакція на вакцинацію БЦЖ.....	37
2.5.3.1 Т-лімфоцити.....	37
2.5.3.2 В-лімфоцити.....	41
РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	43
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	43

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>		
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Разрабид</i>		<i>Байко Т.Ю.</i>			<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>					<i>Д</i>	<i>7</i>	<i>142</i>
<i>Керівник</i>		<i>Орядінська Л.Б.</i>			<i>ЗМІСТ</i>		
<i>Затвер.</i>					<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		

3.2	Метод створення високопродуктивного промислового продуценту.....	47
3.3	Схема отримання продуценту, що використовується в роботі	50
3.4	Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента.....	51
РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....		55
4.1	Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	55
4.2	Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	58
4.3	Опис технологічного процесу.....	62
4.4	Матеріальний баланс.....	83
4.5	Контроль виробництва.....	89
РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....		101
5.1	Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	101
5.2	Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	106
5.2.1	Принцип роботи ліофільної сушарки.....	106
5.2.2	Вибір технологічних параметрів процесу та розрахунок.....	107
5.2.2.1	Розрахунок сублиматора.....	108
5.2.2.2	Розрахунок конденсатора.....	113
5.3	Вибір загальнозаводського обладнання.....	118
5.4	Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	119
5.4.1	Вимоги до охорони праці.....	119
5.4.2	Охорона навколишнього середовища.....	123
ВИСНОВКИ.....		125
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....		127

ВСТУП

Згідно з даними ВООЗ туберкульоз (ТБ) є однією із 10 основних хвороб, що мають летальний кінець. Річний показник захворюваності на ТБ у світі складає близько 10 млн осіб, при цьому станом на 2019 рік Україна входить у десятку лідерів серед захворюваності на ТБ із множинною (англ. *MDR – multidrug-resistant*) та екстенсивною (англ. *XDR – extensively drug resistant tuberculosis*) лікарською стійкістю [1]. В Україні за 2019 рік нових зареєстрованих випадків ТБ – 29 160, загальне ж число хворих складає близько півмільйону осіб [2], при цьому показник успішності лікування не перевищує 50% [1]. Все це вказує, по-перше, на низький соціально-економічний розвиток країни, по-друге, на відсутність системності у функціонуванні закладів та підрозділів охорони здоров'я, по-третє, на низьку самосвідомість громадян, які вчасно не звертаються до медслужб та, відповідно, не ізолюються від здорової частини населення, сприяючи розповсюдженню збудника (*Mycobacterium tuberculosis*).

Така масштабність ТБ призвела до того, що проблема боротьби із ТБ перейшла з медичної в державну сферу регулювання. Зокрема існує ряд нормативних документів національного та міжнародного значення, серед яких: «Концепція Загальнодержавної цільової соціальної програми протидії захворюванню на туберкульоз на 2018 – 2021 роки» [3]; Закон України «Про протидію захворюванню на туберкульоз» [4]; Резолюція Генеральної Асамблеї ООН «Перетворення нашого світу: Порядок денний в області сталого розвитку на період до 2030 року» [5] та інші.

Причинами стрімкого поширення ТБ є соціальний характер хвороби, легкий шлях передачі (95-97% випадків передачі здійснюється повітряно-крапельним шляхом) [6], а також первинна і вторинна набута стійкість

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>ВСТУП</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Байко Т.Ю.</i>				<i>Д</i>	<i>9</i>	<i>142</i>
<i>Консульт.</i>						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Орядінська Л.Б.</i>						
<i>Затвер.</i>								

збудника до протитуберкульозних лікарських препаратів основного (рифампіцин, ізоніазид, етамбутол, стрептоміцин, піразинамід) та резервного рядів (етіонамід, канаміцин, фторхінолони, циклосерин, віомицин, амікацин) [7], засобів дезінфекції [8].

Одним із найбільш ефективних методів боротьби із ТБ є БЦЖ-вакцинування, що проводиться на 3-5 день після народження та у 7 років. В Україні до 2012 року вироблялося 13 найменувань вакцин, серед яких і БЦЖ, наразі ж держава закуповує імпорتنу вакцину. Станом на березень 2020 року до «Державного реєстру лікарських засобів України» входить 3 виробника БЦЖ-вакцини: Статенс Серум Інститут (Данія), "БІОМЕД-ЛЮБЛІН" (Польща) та ББ-НЦПХ Лтд (Болгарія) [9]. Медичні ж заклади на 2020 рік в основному забезпечені болгарською вакциною, що закуповувалась на кошти Держбюджету 2017 року і запас якої станом на 01.06.2019 складав 2 млн 438 тис. доз [10]. З урахуванням статистики народжуваності [11, 12] та діючого календаря щеплень, ця кількість перевищить потребу на момент кінцевої дати строку придатності вакцини (січень 2021) на 1 млн 424 тис. доз, які доведеться утилізувати. Наступна держзакупівля БЦЖ-вакцини запланована на 2021 рік і вже внесена до Держбюджету 2020 року. Враховуючи збитки від попередньої закупівлі у величині понад 3 млн грн (без врахування утилізації), цілком очевидно, що даний механізм забезпечення держави вакциною є неефективним та економічно не вигідним.

З іншої сторони, за умови запровадження повного сучасного виробничого циклу БЦЖ всередині держави, можна більш тонко контролювати об'єми вакцини, що виготовляються. Зараз розрахунок потреби у вакцинах іде на три роки, який досить складно синхронізувати із динамікою демографічних процесів. Виробництво власної вакцини дозволить: уникнути проблеми утилізації невикористаної вакцини; зменшити кількість витрат на зберігання масиву БЦЖ, що не використовується; бути незалежними від закордонних імпортерів; створити новий грошовий потік у державі за рахунок експорту препарату.

									Арк.
									10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ				

Таким чином, розробка сучасної технології вакцини-БЦЖ, яка буде відповідати сучасним вимогам є актуальною задачею біотехнологічної галузі України.

Метою дипломного проекту є розробка оптимального технологічного процесу для виробництва вакцини БЦЖ на території України.

У відповідності з поставленою метою були сформульовані наступні завдання:

1. Обрати і охарактеризувати найбільш доцільний з точки зору протективних властивостей продуцент для виробництва БЦЖ-вакцини;
2. Проаналізувати методи створення високопродуктивних промислових продуцентів та запропонувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті;
3. Скласти технологічну і апаратурну схеми виробництва;
4. Обґрунтувати вибір конструкції апарату ліофільної сушки, здійснити його технологічний та конструктивний розрахунки
5. Провести аналіз шкідливих та небезпечних факторів виробництва і навести шляхи їх попередження.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		11

РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

БЦЖ (*Бацила Кальметта - Герена* або *Bacillus Calmette-Guérin, BCG*) – вакцина проти туберкульозу на основі ослабленої живої коров'ячої туберкульозної палички *Mycobacterium bovis*, отриманої в ході багатократного пасажування *in vitro* на синтетичному поживному середовищі [13].

Штам *M.bovis* вперше був ізольований в 1908 році й культивувався *in vitro* упродовж 13 років (загалом за цей період було здійснено 230-231 послідовний пасаж) [13, 14]. Культивування проводилося на середовищі, що містило екстракт картоплі, гліцерин та жовч [15]. Було показано, що даний штам втратив свою вірулентність вже після 39 пасажу і дана здатність є стабільною. Дане відкриття дозволило в 1921 р. вперше застосувати отриманий штам для вакцинації проти туберкульозу [16]. Показано, що геноми *M.bovis* BCG, *M.bovis* і *M.tuberculosis* різняться за наявністю делецій, які й опосередковують аттенування [14,17,18]. Більше того, для всіх вакцинних штамів *M.bovis* BCG, отриманих в результаті тривалого пасажування вихідного штаму [14], характерна делеція RD1, яка ймовірно відбулася ще до 1921 року [19] і можливо була первинною мутацією аттенування, що привела до утворення штаму *M.bovis* BCG [20]. RD1-область кодує білки ESAT-6 і CFP-10 – можливий ефектор цитолізу та його шаперон [20,21], тобто імуногенні фактори. Цікаво, що *M.bovis* BCG Russia та *M.bovis* BCG Japan не набули нових делецій, у порівнянні із вихідним *M.bovis* BCG, на відміну від решти штамів, що на даний момент існують [14].

Наразі у світі створено велику кількість субштамів на основі

					ДП 6104.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Байко Т.Ю.			РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	12	142
Керівник		Орядінська Л.Б.			КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ			
Затвер.								

Посилення імуногенності може бути досягнуто також шляхом введення в геном бактерії додаткових копій генів, які вже наявні в геномі і кодують відповідні їм білки. По такому принципу була створена лінія штамів БЦЖ, що експресують у великій кількості секреторний білок Ag85B. Даний білок входить до антигенного комплексу, представленого білками Ag85A, Ag85B, Ag85C, що мають муколіл-трансферазну активність і каталізують біосинтез найбільш розповсюджених гліколіпідів клітинної стінки, в тому числі і вірулентного корд-фактору [25 – 28]. Прикладом такого штаму є rBCG30, клінічні дослідження якого демонструють, що він викликає значно сильнішу імунну відповідь, ніж *M.bovis* BCG [29].

Ще однією рекомбінантною БЦЖ, що об'єднує властивості двох попередніх, є AERAS-422, яка експресує Ag85A, Ag85B та Rv3407 разом із перфрінголізином, гемолітична активність якого, на відміну від лістеріолізину, реалізується в більш широкому діапазоні рН [30]. Однак в ході клінічних випробувань у двох добровольців було виявлено тяжкі побічні ефекти і подальші дослідження передчасно закрили [25].

Крім наведених, створено велика кількість інших перспективних вакцин [31] із різної мірою ефективності та етапом випробувань, серед них такі:

1. BCG:RD1-2F9/BCG: RD1/BCG:ESX-1 (БЦЖ із вставкою RD1; експресує ESAT-6 та протеїн CFP10) [32, 33];
2. rBCG E6 (надекспресія ESAT-6) [34];
3. rBCG(mbtB30) (надекспресія Ag85B, порушення синтезу сидерофору мікобактину, що запобігає нормальному споживанню заліза) [35];
4. rBCG-1173:A (експресує Ag85B) [36];
5. rBCG:XB (експресує Ag85B та латентний HspX) [37];
6. (H)PE-ΔMPT64-BCG (експресує мікобактеріальний секреторний білок MPT64, злитий із PE-доменом PE_PGRS33 білка мікобактерій туберкульозу, що локалізується у клітинній стінці) [38];

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

7. BCG:ESAT-L28A/L29S (rBCG:ESX-1 варіант із мутацією в ESAT-6 гені) [39];
8. BCG:ESX-1Mmar (rBCG зі вставкою esx1 *Mycobacterium marinum*) [40];
9. BCG-IL-4, BCG-IL-6, BCG-GM-CSF, BCG-IFN- γ , BCG-IL-2 (експресують мишачі інтерлейкіни, інтерферони-гамма, а також гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор) [41];
10. rBCG- Ag85B-IL-15 (експресія об'єднаних антигену 85B та інтерлейкіну) [42];
11. rBCG- Ag85B- ESAT-6-TNF- α (експресія об'єднаних Ag85B- ESAT-6-TNF- α) [43];
12. rBCG- Ag85B- ESAT-6-IFN- γ (експресія об'єднаних Ag85B- ESAT-6-IFN- γ) [44];
13. BCGi (вставка гену Ipr1 – інтрацелюлярної патогенної резистентності 1) [45];
14. rBCG(MCP-3) (вставка хемотаксичного моноцитарного білка 3) [46];
15. rBCG Δ ureC::hly (pMPIIB01) (уреазна делеція, експресує латентні антигени Rv2659c, Rv3407, Rv1733c) [47];
16. BCG Δ zmp1 (БЦЖ з дефішенсом в гені zmp1 гіпотетичної Zn²⁺-металопротеази) [47];

Даний перелік не є вичерпним і може бути розширеним, але спираючись на результати досліджень та їх результатів, можна резюмувати, що [31]:

1. Серед великого різноманіття вакцин нового покоління найбільші перспективи має вакцина VPM1002, клінічні дослідження якої перебувають на завершальному етапі;
2. Більшість вакцин, в яких реалізовується принцип підвищення рівня експресії антигенів мають високий ризик прояву побічних ефектів і часто не проходять вимог безпеки;
3. Вакцини, при створенні яких метою було підвищення рівня імуногенності в більшості випадків не показали бажаного посилення ефективності і достатньої протективності.

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

Таким чином, підходи та методологія створення нових варіантів БЦЖ-вакцини мають значні перспективи та потенціал для розвитку як в нових напрямках так і в удосконаленні відомих.

Спираючись на дослідження 2016 року 13 відомих БЦЖ штамів можна класифікувати за рівнем вірулентності на 5 груп: BCG-Phipps, BCG-Pasteur, BCG-Frappier, BCG-Tice > BCG-China > BCG-Russia, BCG-Moreau > BCG-Danish > BCG-Glaxo, BCG-Prague, BCG-Japan, BCG-Sweden, BCG-Birkhaug. Ступінь вірулентності визначається делеціями та дуплікаціями у геномі штамів. При цьому чим більш вірулентний штам, тим більший рівень захисту від туберкульозу він забезпечує, тобто характеризується вищими протективними властивостями [49], при цьому разова доза введення препарату зменшується [50], що з однієї сторони економічно вигідно, а з іншої – дозволяє зменшити ризик прояву реактогенності. Серед наведеного переліку найбільш вірулентною групою є BCG-Phipps, BCG-Pasteur, BCG-Frappier і BCG-Tice.

Враховуючи, що BCG-Tice є однією із вакцин, що:

1. Забезпечує високий рівень захисту від туберкульозу як у вихідній штамовій формі так і в рекомбінантній rBCG30, яка характеризується вищою імуногенністю та безпечністю [51];
2. Активно використовується при лікуванні онкозахворювань, зокрема сечового міхура, і показує високий відсоток виживаності об'єктів дослідження без прогресування онкології (до 95%) [29, 52, 53], а отже на його основі можна виготовляти одразу два типи вакцини – протитуберкульозної та для онкотерапії;
3. Є більш чутливою до антибіотиків у порівнянні із іншими представниками високовірулентної групи, зокрема до рифампіцину, що продемонстровано у таблиці 1.1[54], а отже у разі зараження його легше контролювати;

BCG-Tice був обраний для конструювання субштаму для даного проекту.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

Таблиця 1.1

Значення мінімальної інгібуючої концентрації лікарської речовини для різних штамів БЦЖ вірулентної групи

Штам БЦЖ	Мінімальна інгібуюча концентрація лікарської речовини, мг/мл				
	Стрептоміцин	Рифампіцин	Рифабутин	Етамбутол	Ізоніазид
Frappier	0,125	0,0005	0,002	1	1
Pasteur	0,125	0,0005	0,002	0,5	1
Phipps	0,125	0,001	0,002	1	1
Tice	0,125	0,00025	0,002	0,5	1

На основі патентного пошуку та із врахуванням можливих наслідків прояву реактогенності при застосуванні генно-інженерних методів направлених на посилення експресії конкретних антигенних факторів, було обрано рекомбінантний субштам БЦЖ, сконструйований на основі VCG-Tice, який долає природну властивість інгібуватися аланіном (L, D) та L-серіном за рахунок експресії аланіндегідрогенази, серіндегідрогенази або надекспресії глутамінсинтетази, яка у вихідному штамі блокується наведеними амінокислотами [55]. Такий субштам характеризується кращою виживаністю, довше персистує в організмі хазяїна і тим самим забезпечує довготривалий імунний захист. Дані переваги особливо доцільні для штаму VCG-Tice, який за літературними даними не експресує метоксиміколати, що з одної сторони захищають бактерію (а відповідно VCG-Tice є більш вразливим), а з іншої – є факторами вірулентності [56].

1.2 Таксономія

Мікобактерії входять до відділу *Firmicutes* за Берджі [57] і їх можна класифікувати наступним чином:

Тип: *Actinobacteria*

Ряд: *Actinomycetales*

Підряд: *Corynebacterineae*

Родина: *Mycobacteriaceae*

Рід: *Mycobacterium*

										Арк.
										17
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ					

1.3 Морфологія

Туберкульоз може бути викликаний декількома видами мікобактерій: людський – *Mycobacterium tuberculosis*, бичачий – *Mycobacterium bovis* пташиний – *Mycobacterium avium*, мишачий – *Mycobacterium murium*. Мікобактерії ТБ характеризуються вираженим поліморфізмом (коковидні, ниткоподібні, гіллясті, колбовидні форми), але здебільшого вони мають форму тонких (*M. tuberculosis*, *M. africanum*) або коротких і товстих (*M. bovis*) паличок $1,5-4 \times 0,3-0,5$ мкм [58]; довжина *M. bovis* становить $1,5 - 2$ мкм [59]. Різномітність форм не рідко залежить від складу поживного середовища, дії на них антибіотиків та хіміотерапевтичних речовин [58].

Мікобактерії мають зернисту цитоплазму, яка містить від 2 до 12 зерен різної величини (зерна метафосфатів – зерна Муха). Іноді мікобактерії утворюють ниткоподібні структури, які нагадують грибний міцелій, що і стало причиною їх назви: *mykes* – гриб і *bacterium* – бактерія. Нерухомі, спор не утворюють, мають мікрокапсулу. Грампозитивні, але погано сприймають анілінові барвники, тому забарвлюються більш жорсткими методами, наприклад, за Целем-Нільсоном, при цьому вони мають вигляд яскраво-червоних одиничних чи у невеликих скупченнях (по 2-3 клітини) паличок [60]. У зв'язку із високим вмістом ліпідів (до 50%) мікобактерії є кислото- та лугостійкими, [58]. Основним методом диференціації *M. bovis* від *M. tuberculosis* є ніацинова проба, яка у *M. bovis* негативна, а також – біологічна проба на кролях, які резистентні до зараження *M. tuberculosis*. [59, 61].

1.4 Культуральні ознаки

На щільних поживних середовищах збудники туберкульозу утворюють сухі зморшкуваті колонії кремового кольору із дещо припіднятим центром та порізаним краєм (вірулентні R-форми). Інколи виростають більш вологі, м'які колонії – послаблені S-форми, які можна виділити у хворого після курсу хіміотерапії [62]. У рідких ПС мікобактерії туберкульозу утворюють

									Арк.
									18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ				

плівку на 7-9 [58, 13] день, яка поступово потовщується, стає грубою, зморшкуватою, ламкою і в силу своєї маси іноді падає на дно. Культуральний бульйон під плівкою залишається прозорим [58].

При вирощуванні в рідкому поживному середовищі на склі (метод Прайса) мікобактерії туберкульозу утворюють структури, що нагадують джгути, коси, мотузки. Ці структури називаються корд-фактором [63].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Mycobacterium tuberculosis, *Mycobacterium bovis* і *Mycobacterium africanum* є облігатним аеробами. Оптимальна температура росту 37-38°C. Ростуть повільно через наявність в клітинній стінці ліпідів, що уповільнюють обмін речовин з навколишнім середовищем. Внутрішньоклітинне дихання мікобактерій здійснюють оксидоредуктази, з яких особливо важливі каталаза і пероксидаза, так як з ними пов'язана вірулентність збудників. [63]. Оптимальне значення рН 6,8-7,2 [60, 61]. Мікобактерії вимогливі до поживних середовищ і вимагають присутності в середовищах гліцерину (гліцеринзалежні бактерії), яєчного жовтка, сироватки крові, факторів росту (біотину, нікотинової кислоти), солей магнію, калію, натрію, заліза, активованого вугілля [63]. Гліцерин стимулює ріст мікобактерій, але *M. bovis* не є гліцеринзалежним [61, 58].

Для придушення розвитку сторонньої мікрофлори в середовища додають пеніцилін або малахітовий зелений. Мікобактерії туберкульозу розмножуються простим поділом. Цикл поділу досить тривалий і становить 14-18 годин. Елективними ПС для мікобактерій є:

- яєчні середовища Левенштейна-Йєнсена, Фінн-2;
- гліцеринові агарові ПС Міддлбрука;
- картопляні ПС із жовчю (середовище Петраньяні);
- напівсинтетичне ПС Школьнікової;
- синтетичні ПС Сотона, Дюбо.

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

Найбільш часто для вирощування мікобактерій використовують щільні яєчні середовища Левенштейна-Йенсена та Фінна-2. Ці середовища рекомендовані ВООЗ як стандартні при діагностиці туберкульозу [63].

Склад клітинної стінки. Муреїновий каркас зв'язаний із арабіногалактаном – полісахаридом, що складається із арабінози й галактози, а він у свою чергу пов'язаний із ліпідами – міколевими кислотами, що надають бактеріям кислотостійкості [64]. Міколеві кислоти представлені вільними сульфоліпідами і корд-фактором.

Шар зовнішніх ліпідів називають мікозидами (специфічними восками), що визначають антигенні властивості мікобактерій. Ліпоарабіноманан, закріплений на мембрані цитоплазми, пронизує клітинну стінку і виходить на поверхню мікробної клітини термінальними фрагментами (манозними радикалами). Клітинна стінка пронизана порами, що забезпечують транспорт речовин [63].

1.6 Серологічні ознаки

Мікобактерії містять білки (туберкулопротеїни), полісахариди і ліпіди. Туберкулопротеїни складають до 56% сухої маси речовини мікробної клітини. Вони є основними носіями антигенних властивостей мікобактерій, високотоксичні. Викликають формування гіперчутливості сповільненого типу. Полісахариди складають до 15% сухої маси клітини. Є гаптенами. Ліпіди складають до 40% сухої маси клітин.

Виявлено три фракції ліпідів: фосфатидна (розчинна в ефірі), жирова (розчинна в ефірі і ацетоні), воскова (розчинна в ефірі і хлороформі). Ліпіди представлені міколевою, фтіоною, масляною, пальмітиною, туберкулостеариною кислотами [63].

Високий вміст ліпідів визначає такі властивості туберкульозних паличок:

1. Стійкість до кислот, лугів і спирту.
2. Несприйнятливість до анілінових барвників.

										ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							20

3. Відносно висока стійкість до висушування і дії сонячних променів.
4. Стійкість до дії звичайних дезінфікуючих речовин: 5% розчин фенолу при додаванні в рівному обсязі до мокроти викликає загибель туберкульозних паличок через 6 год, однак 0,05% розчин бензилхлорфенолу вбиває через 15 хв.
5. Висока гідрофобність, яка знаходить своє відображення в культуральних властивостях.
6. Патогенність туберкульозних бактерій [65].

Загалом до факторів патогенності мікобактерій відносяться:

- корд-фактор – гліколіпід клітинної стінки (ефір трегалози й миколевої кислоти), який викликає пошкодження клітинних мембран;
- ліпіди включають міколеву, фтіонову, масляну, пальмітинову, туберкулостеаринову кислоти, що викликають формування гігантських клітин;
- сульфатиди – сірковмісні поверхневі гліколіпіди, що посилюють токсичну й антифагоцитарну дію корд-фактору і перешкоджають злиттю фагосоми із лізосоною;
- ліпоарабіноманан (LAM) – гетерополісахарид, що пригнічує активацію Т-лімфоцитів і лейкоцитів і викликає секрецію фактору некрозу пухлин макрофагами (під дією цього фактору розвивається лихоманка, знижуються маса тощо) та ІЛ-10 (гальмує проліферацію Т-клітин);
- мікозиди – специфічні воски, що утворюють захисний екран на поверхні клітини. Збудники туберкульозу не утворюють екзотоксинів. Високотоксичними є продукти розпаду бактеріальних клітин.

Головним фактором патогенності є корд-фактор (*англ. cord* – джгут, мотузка) – гліколіпід, що знаходиться в клітинній стінці і сприяє утворенню джгутів, кіс. Корд-фактор обумовлює “скупений ріст” бактерій в рідких ПС у вигляді тяжів, що звиваються, в яких клітини розташовуються паралельними ланцюжками. Авірулентні й умовно-патогенні мікобактерії корд-фактору не утворюють й ростуть хаотично. При люмінесцентній мікроскопії корд-

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк. 21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

фактор проявляється у вигляді міцелія. Корд-фактор пригнічує міграцію лейкоцитів, пошкоджує мембрани мітохондрій, інгібує утворення фаголізосом, сприяє адгезії мікробної клітини. Наявність корд-фактору приводить до того, що фагоцитоз при ТБ носить незавершений характер [60, 63]

Таким чином, антигенні структури мікобактерій представлені білковими (зокрема секреторними білками груп ESAT-6, Ag85 та CFP32, на основі яких створюють вакцини нового покоління [28]), полісахаридними та ліпоїдними компонентами.

1.7 Поширення в природі

Основним джерелом розповсюдження збудника є хвора людина, яка виділяє його разом із мокротинням у навколишнє середовище; також джерелом може стати хвора тварина (велика рогата худоба, свині, вівці тощо), молоко чи людина, хвора на нелегенеу форму туберкульозу. Основний механізм зараження – аерогенний [60].

Мікобактерії достатньо стійкі до навколишнього середовища: в пилу вони зберігають 10 днів; на книгах, іграшках – до 3-х місяців; у воді – до 5 місяців; в олії – до 10 місяців; в сирі – до 8 місяців; у мокротинні – до 10 місяців, а у висохлій мокроті життєздатність зберігається упродовж багатьох тижнів. При кип'ятінні гинуть через 5 хвилин [66], а при пастеризації – через 30 хв [63].

Розсіяне сонячне світло вбиває мікобактеріальні палички через 8 - 10 діб [65], а пряме – через 1,5 год; ультрафіолетове випромінювання – всього за 2-3 хв. Досить стійкі мікобактерії і до дії низьких температур. Також проявляють резистентність до дії звичайних дезінфікуючих засобів: 5% розчин фенолу викликає загибель паличок лише через 6 годин, а розчини, які вивільняють активний хлор (3-5% розчини хлораміну та 10-20% розчини хлорного вапна) вбивають збудника упродовж 3-5 год [63].

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Ліофілізована вакцина БЦЖ – це імунобіологічний препарат, що містить живі бактерії, отримані з аттенуйованого штаму *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (БЦЖ), висушені у стабілізаторі L-глутаматі натрію, призначений для внутрішньошкірного застосування. Вакцинація проводиться для попередження захворювання на туберкульоз. Для проведення щеплення суху вакцину розводять у розчиннику – 0,9% розчин хлориду натрію для ін'єкцій. У дозі в кількості 0,05 мг вакцини міститься близько $(1,5 - 6,0) \cdot 10^5$ живих мікробних клітин. Серед набору вимог, висуваються до даної вакцини, основними є: стерильність, апірогенність, безпечність та нетоксичність [13], які забезпечуються шляхом дотримання вимог ВООЗ до даного препарату та вимог GMP з виробництва ін'єкційних препаратів.

Відповідно до анатомо-терапевтичної класифікації (АТС) БЦЖ-вакцина має кодування J07AN01, що має наступне значення [67]:

J - Протимікробні засоби для системного застосування

J07 - Вакцини

J07A - Бактеріальні вакцини

J07AN - Протитуберкульозні вакцини

J07AN01 - Туберкульозна жива ослаблена вакцина

2.2 Схема хімічних перетворень

Як уже повідомлялося, мікобактерії є досить вибагливими до складу поживних середовищ, тому найбільш доцільно використовувати для їх культивування синтетичні ПС зі сталим складом. Стандартним ПС для їх

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Разрабид</i>		<i>Байко Т.Ю.</i>				<i>Д</i>	<i>23</i>	<i>142</i>
<i>Консульт.</i>						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Орядінська Л.Б.</i>						
<i>Затвер.</i>								

культивування є рідке ПС Сотона. Склад рідкого ПС Сотона із співвідношенням компонентів, яке дає максимальний приріст живої біомаси (КУО) у грамах на літр наступне [68]:

Заліза амонійного цитрат – 0,05

L-Аспарагін ($C_4H_3NO_3 \cdot H_2O$) – 2,27

Лимонна кислота ($C_6H_5O \cdot 7H_2O$) – 2

Магнію сульфат ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) – 1

Калію гідрофосфат (K_2HPO_4) – 0,5

25 мл гліцеролу

дистильована вода – довести розчин до 1000 мл,

Кінцеве значення рН даного середовища при 25°C становить $7,2 \pm 0,2$ (доводиться шляхом додавання 4 N NaOH)

Солі типу цитрату амонійного заліза і сульфату магнію необхідні для росту мікобактерій в якості неорганічних іонів та азоту; аспарагін додають з метою стимуляції росту мікобактерій, а гліцерин – джерело вуглецю. Твін-80 – диспергатор [68, 69].

Оптимальна температура росту становить $37 \pm 0,5^\circ C$; оптимальне значення рН 6,8-7,2 [13, 60, 61], однак цікаво, як показують дослідження, що чим довше штам мікобактерій культивується при конкретному значенні рН, тим більше він стає вимогливим до підтримування звичної для нього концентрації іонів водню. Тому, задавшись певним значенням рН, необхідно намагатися його утримувати упродовж процесу культивування [70].

Так як мікобактерії є аеробами, важливим фактором для забезпечення їх нормальної життєдіяльності є регулярна подача кисню. При використанні біореактору на 20 літрів із заповненням поживним середовищем у кількості 12 літрів, оптимальною подачею стерильного повітря на поверхню ПС є 15 л/год. Одночасно працює мішалка із частотою обертання 840 об/хв. За наведених умов накопичення біомаси мікобактерій триває упродовж 164 –

										ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
											24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							

170 год [13], після чого її відділяють та направляють на наступні технологічні стадії.

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Вакцина являє собою біомасу вакцинного штаму *Mycobacterium bovis* ліофільно висушену у 1,5% розчині стабілізатора – глутаматі натрію моногідрат. Таким чином вакцина містить дві компоненти: мікробіологічну та хімічну.

Мікробіологічна компонента. При мікроскопії мазків, забарвлених по Цилію-Нільсону, повинні ідентифікуватися забарвлені в червоний колір (кислотостійкі) тонкі, прямі або злегка зігнуті палички довжиною 1 – 4 мкм і шириною 0,3 – 0,5 мкм, часто із невеликими вздуттями на кінцях, які не утворюють спор та капсул. При посіві на щільне ПС Левенштейна-Йенсена – через 28-30 діб інкубації за температури $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на поверхні ПС повинні вирости характерні шорсткуваті щільні колонії від 0,5 до 8,0 мм в діаметрі жовтуватого кольору із нерівними краями.

Загальний вміст бактерій визначається фотометрично. Оптична густина повинна знаходитися в межах 0,30 – 0,40, що відповідає 1,0 мг/мл мікробних клітин БЦЖ, при цьому в 1 мг порошку повинно бути не менше 10 млн життєздатних клітин. Розчинена вакцина повинна мати вигляд грубодисперсної суспензії білого із сіруватим чи жовтуватим відтінком, без сторонніх включень.

Не допускається наявність будь-якої іншої мікрофлори, окрім БЦЖ. Також не допускається наявності у вакцині вірулентних мікобактерій [71].

Хімічна компонента. Для ліофілізації БЦЖ була запропонована велика кількість варіантів кріопротекторів, а саме: желатин і сахароза, лактоза, декстран і глюкоза та інші. Загалом до кріопротекторів, завданням

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

яких є захист від пошкоджень кристалами льоду мембран мікроорганізмів, висувуються наступні вимоги:

1. Максимальне збереження нативної структури мікроорганізмів.
2. Відсутність антигенних, адьювантних, токсичних та пірогенних властивостей.
3. Біосумісність.
4. Висока розчинність після проведення сублімації.

Надають перевагу натуральним, стабільним при зберіганні, легко розчинним у водних розчинах, негігроскопічним та економічно доступним кріопротекторам. Сьогодні найбільшого поширення набули: гідролізований желатин із температурою замерзання -32°C ; сорбітол (-28°C); глутамат натрію (-54°C); лактоза (-24°C); сахароза (-33°C) та інші [13]. Очевидно, що використання желатину та лактози обмежується можливими алергічними реакціями. Тоді із даного переліку, як видно, найбільш низьку температуру замерзання має глутамат натрію, який крім того є досить поширеним і економічно доступним. Саме глутамат натрію моногідрат і є наразі стабілізатором, що використовується для виробництва БЦЖ-1 [71].

Мононатрієву сіль глутамінової кислоти (див. структурну формулу на рис.2.1.) використовують у пероральних фармацевтичних препаратах та харчових продуктах (харчова добавка E621) як буферну речовину та коригент (підсилювач) смаку (0,2–0,9% у солоних продуктах, 10–30% — у продуктах, що містять соєвий білок).

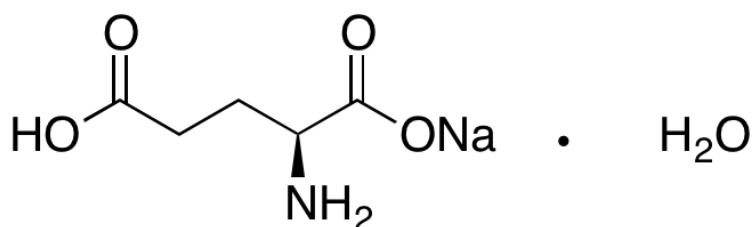


Рис 2.1 Структурна формула глутамату натрію моногідрату

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

Також вона входить до складу підшкірних ін'єкційних розчинів живих вакцин проти кору, епідемічного паротиту (свинки), краснухи та вітряної віспи. Розглядається як помірно токсична (можливі побічні ефекти: сонливість, галюцинації, головний біль, задишка, нудота або блювання, дерматит). Найнижча летальна доза при пероральному прийомі в організмі людини – 43мг/кг [72]. Не зважаючи на те, що відносно безпечності використання даної речовини постійно точаться дискусії, з 1987 року ВООЗ визнала її як безпечну, але при цьому достовірних, остаточно підтверджених даних досі немає [73].

2.4 Методи очистки цільового продукту

Існує три базові методи відділення культуральної рідини від біомаси. Це фільтрування, центрифугування та осадження. Осадження є доволі тривалим процесом і не гарантує повного відділення цільового продукту від баласту і не є доцільним при виготовленні фармацевтичної продукції.

Для відділення біомаси мікобактерій від культуральної рідини прийнято використовувати або центрифугування у безперервному потоці, або фільтрування із використанням мембранних cross-flow фільтрів (тобто фільтрація у тангенційному потоці).

Фільтрування у безперервному потоці прийнято вважати доцільним для великих об'ємів продукту, однак зараз існують моделі, оптимізовані як для лабораторних досліджень, так і для пілотних чи промислових масштабів із різною продуктивністю. Перевагою і причиною застосування таких центрифуг є їх висока автоматизація та значний фактор розділення, що дозволяє відділити дуже малі частинки при їх незначному вмісті (бактерії, віруси, структурні елементи клітин, такі як мітохондрії, рибосоми тощо).

Для мікобактерій, культивованих глибинним способом, за одними літературними даними, додають Твін 20, для запобігання агрегації клітин під час культивування, що одночасно позитивно впливає і на процес

						<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			27

фільтрування. Хоча було помічено, що Твін 20 знижує вірулентність бактерій [74]. За іншими даними, додають Твін 80, хоча було показано, що Твін 80 гальмує ріст культури мікобактерій [13], а в деяких дослідженнях взагалі не додають полісорбат [68]. Зважаючи та оцінюючи можливі негативні наслідки при використанні одного чи іншого полісорбату та спираючись на стандартизований склад ПС, для даного дипломного проекту вибір зупинився на Твіні-80.

Для даного дипломного проекту пропонується використовувати фільтрацію у тангенційному потоці.

Cross-flow фільтри широко використовуються у фармації, зокрема для наступних процесів:

1. Концентрування у виробництві альбуміна та імуноглобуліна.
2. Очищення у виробництвах вакцин та сироваток.
3. Доведення водних розчинів фармацевтичних та біологічних продуктів до необхідної концентрації.
4. Освітлювальна фільтрація фармрозчинів.
5. Отримання умовно-стерильних інфузійних розчинів.
6. Депірогенізація води та розчинів.

Фільтри даного типу отримали широке розповсюдження завдяки високій автоматизації, продуктивності, відсутності необхідності введення додаткових фільтруючих речовин, довгому строку експлуатації мембран та їх легкій регенерації (для регенерації використовують режим зворотнього потоку). Також дані фільтри оснащені CIP/SIP, що робить їх ідеальним варіантом для для виробництва стерильних ін'єкційних препаратів.

Тиск експлуатації у різних виробників може варіювати, але приблизно він становить 4 бар; продуктивність від 10 до 800 л/год (по фільтрату); матеріал – неіржавіюча сталь AISI 316L; мембрани – для ультра- і мікрофільтрації мають відповідний набір різних діаметрів, для даного проекту пропонується (зважаючи на розмір продуцента) використовувати 0,2/0,45 мкм [75].

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

2.5 Механізми впливу цільового продукту на біохімічні процеси

2.5.1 Загальна схема формування імунної відповіді

У 2021 році буде рівно 100 років, відколи здійснили перше БЦЖ-вакцинування і, що цікаво, не зважаючи на велику кількість досліджень з розробки нових типів вакцин (рекомбінантних, субодиничних), первинний варіант БЦЖ залишається найбільш ефективним у боротьбі із туберкульозом уже впродовж століття.

Отже, як відомо, БЦЖ-вакцина призначена для специфічної профілактики туберкульозу. У відповідь на вакцинацію розвивається клітинна імунна відповідь, яка в значній мірі залежить від активності макрофагів, у яких бактерії штаму БЦЖ розмножуються. Механізм захисту полягає в обмеженні розповсюдження мікобактерій туберкульозу із осередку запалення, що обумовлено формуванням імунологічної пам'яті Т-лімфоцитів, утворення яких індукується первинним інфікуванням при введенні БЦЖ [71].

Початкова імунна відповідь на БЦЖ виникає в місці інокуляції (зазвичай дерма шкіри), де резидентні макрофаги та дендритні клітини (ДК) взаємодіють з бактеріями через різні рецептори, експресовані на їх поверхні. Макрофаги та ДК фагоцитують бактерії, що ініціює вроджену імунну відповідь через секрецію імуномодулюючих компонентів, таких як цитокіни та хемокини. Бактерії деградуються за допомогою внутрішньоклітинних механізмів, а їх пептиди передаються до плазматичної мембрани разом з основним комплексом гістосумісності (МНС) I та II класу, де вони презентуються клітинам адаптивної імунної системи. Нейтрофіли також потрапляють у місце щеплення та беруть участь у формуванні імунної відповіді. Активовані дендритні клітини мігрують у лімфатичні вузли. При попаданні в лімфатичні вузли дендритні клітини стимулюють CD4+, CD8+, CD1+-обмежені Т-клітини, TFH-клітини, Т-регуляторні клітини та В-клітини. Клітини CD4+ і CD8+ мігрують з лімфатичних вузлів у бік місця щеплення і забезпечують необхідну стимуляцію клітинам вродженого імунітету. Клітини

										ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
											29
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							

CD4+ (Т-хелпери) диференціюються на клітини Th1, Th17 або Th2 залежно від подразників, наявних у їх мікросередовищі та сприяють активації макрофагів, тоді як клітини CD8+ (Т-кілери, або цитотоксичні Т-лімфоцити – ЦТЛ) опосередковують свої функції шляхом лізису інфікованих клітин або секреції цитокінів. В-клітини диференціюються на В-клітини пам'яті або плазматичні В-клітини (плазмоцити), що синтезують антитіла. Упродовж всього процесу клітини пам'яті утворюються з тих, які зреагували на інфекцію і заселяють периферичні органи, наприклад, легені. Разом клітини адаптивної імунної системи забезпечують формування імунної відповіді та імунітету до мікобактерій [76].

Загальну схему формування імунної відповіді зображено на рисунку 2.2, а також більш детальна схема взаємодії між клітинами імунної системи – на рисунках 2.3 [77]. Інформацію про особливості формування імунної відповіді для БЦЖ на прикладі різних клітин імунної системи [76] наведено в наступних розділах.

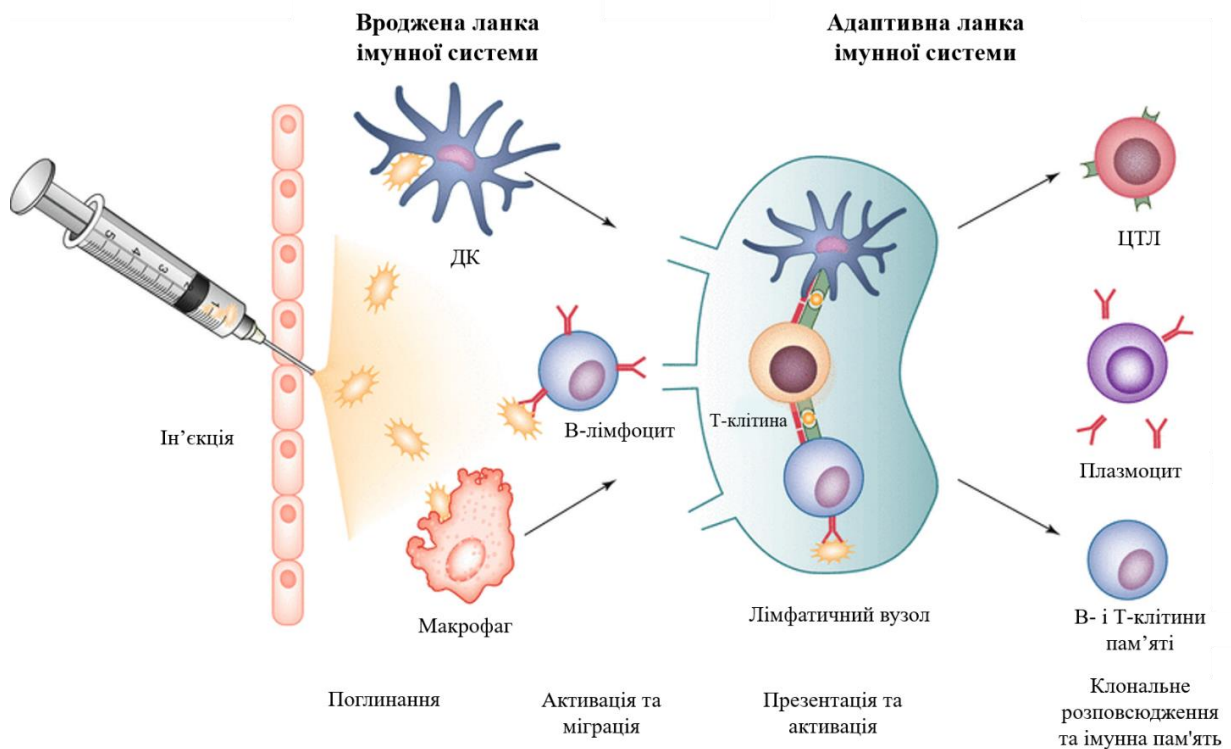
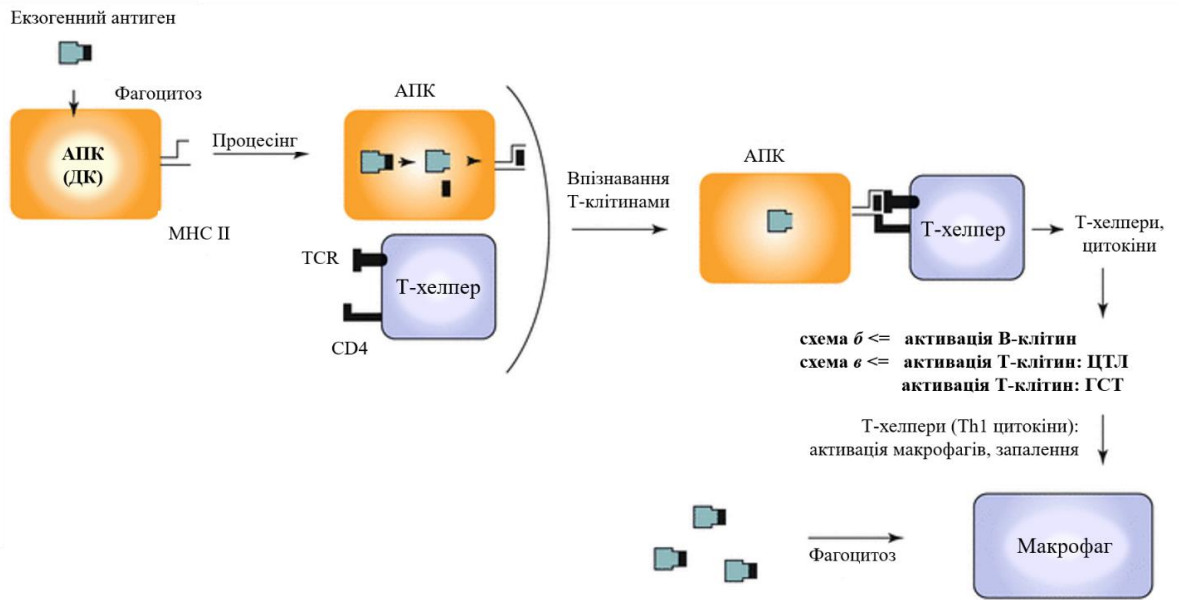
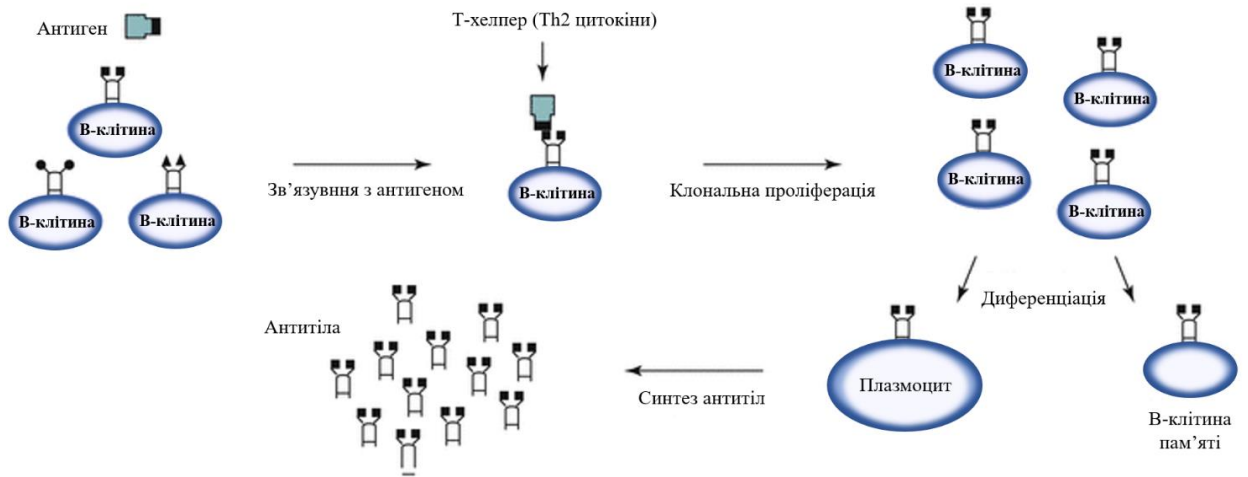


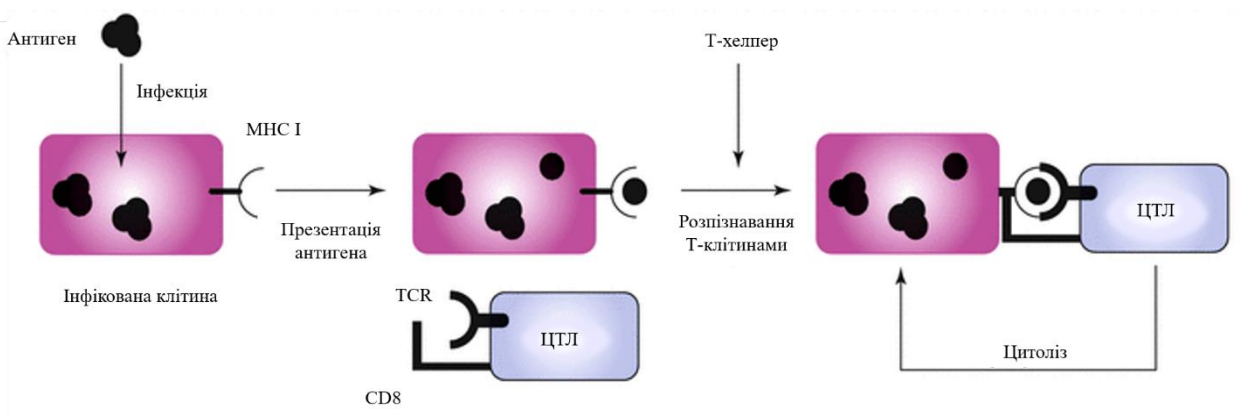
Рис. 2.2 Загальна схема формування імунної відповіді при введенні вакцини [77]



a)



б)



в)

Рис. 2.3 Схеми антиген-залежних імунних реакцій [77]

Позначення:

а) Активація Т-хелперів (Th-клітин): Антигенпрезентуюча клітина (АПК), наприклад дендритна клітина (ДК), фагоцитуює екзогенні антигени і частково їх розщеплює. Фрагменти антигена презентуються із МНС II CD4⁺ клітині; комплекс МНС-антиген на АПК розпізнається молекулами Т-клітинного рецептора (TCR) та CD4. Взаємодія між АПК- Th-клітина призводить до активації Th-клітини. Активована Th-клітина продукує цитокіни, що веде до активації макрофагів, В-клітин Т-лімфоцитів: цитотоксичних чи задіяних в реакцію гіперчутливості сповільненого типу.

б) Синтез антитіл: Наявність антигена і цитокінів Th2-типу викликає проліферацію і диференціювання В-клітин. Активуються тільки специфічні до антигена В-клітини. Частина В-клітин диференціюється у плазмоцити і продукує антитіла, а частина у клітини пам'яті.

в) Активація цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ). ЦТЛ розпізнають антигени, експресовані молекулами МНС I на поверхні інфікованих клітин. Цитолітичні білки продукуються ЦТЛ при взаємодії з клітиною-мішенню [77].

2.5.2 Вроджена імунна відповідь на вакцинацію БЦЖ

Макрофаги Після внутрішньошкірного введення БЦЖ, резидентні епідермальні макрофаги взаємодіють з БЦЖ через певні рецептори, включаючи рецептор комплементу 3 (CR3) [78] та Toll-подібні рецептори 2 та 4 (TLR2 / 4) [79]. Рецептори сімейства лектинів типу С, такі як манозний рецептор та макрофаг-індукований Ca²⁺-залежний рецептор лектину, експресуються на макрофагах, але чіткого розуміння напрямку їх взаємодії з БЦЖ нема [80]. Оскільки периферична ліпідна частина клітинної стінки БЦЖ та *M.tuberculosis* (*M.tb*) дуже схожа [81], ймовірно, що їх механізм і здатність специфічно впливати на макрофаги будуть подібними. Однак перший контакт БЦЖ відбувається з резидентними епідермальними макрофагами, тоді як контакт *M.tb* в більшості випадків відбувається з резидентними альвеолярними макрофагами. Саме можливі розбіжності в механізмах розпізнавання, процесінгу та презентації антигену (АГ) між двома типами макрофагів, як припускають, є причиною того, що БЦЖ не дає 100% захист від туберкульозу.

									Арк.
									32
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ				

Вирішальним при ініціації імунної відповіді на вакцину БЦЖ вважається процес опсонізації. Так, наприклад, опсоніновий фактор хазяїна Н (регуляторний білок системи комплементу, який пригнічує альтернативний каскад комплементу), може зв'язуватися з поверхнею клітин BCG і частково інгібувати їх поглинання епідермальними макрофагами. Макрофаги, інфіковані опсонізованою фактором Н БЦЖ, можуть виділяти підвищену кількість протизапальних цитокінів, потенційно викликаючи гостру відповідь (високий рівень IL-6 чи фактору некрозу пухлин – TNF) [82].

Таким чином, фактор Н може перешкоджати формуванню Т-клітинної пам'яті. Це може бути пов'язано із тим, що опсонізована БЦЖ гине занадто швидко, скорочуючи час, упродовж якого АГ доступний для презентації, що негативно впливає на проліферацію і залучення Т-клітин до місця зараження. Окрім фактору Н, в епідермальній тканині існують й інші опсоніни, які потребують дослідження.

Загальноприйнято вважати, що компоненти клітинної стінки BCG будуть взаємодіяти аналогічно з рецепторами макрофагів, як це роблять компоненти клітинної стінки *M.tb*. Однак існують відмінності, як, наприклад, у випадку з ліпоарабіномананом кепованим манозою (ManLAM) *M.tb* у порівнянні з БЦЖ. Ступінь та схема кепування манозою, а також вміст жирних кислот у ManLAM *M.tb* та BCG відрізняються [83], що може пояснити відмінність розпізнавання даної молекули макрофагальними рецепторами, такими як манозний рецептор, TLR2 (димеровані з TLR1 або TLR6) або TLR4, генеруючи різні імунні відповіді, які згодом можуть впливати на презентування АГ.

Стимуляція макрофагів або через TLR2, або TLR4 призводить до ряду відмінностей, зокрема: у протизапальних реакціях; проліферації Т-клітин та секреції IFN γ *in vitro*; у навантаженні бактерій у легенях *in vivo* [79]. Так, наприклад, тривала стимуляція TLR2 в макрофагах знижує регуляцію експресії основного комплексу гістосумісності (МНС) класу II і впливає на

										ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							33

перехресний процесінг антигену МНС I, таким чином, зменшуючи його презентацію Т-клітинам [84].

Також, на формування імунної відповіді впливає поліморфізм рецепторів легеневих та епідермальних макрофагів: з одної сторони – відмінності між даними групами макрофагів; з другої – поліморфізм для кожної конкретної людини [85, 86]. Також важливим фактором є природа компонентів клітинної стінки мікобактерій, що будуть взаємодіяти із рецепторами макрофагів. Наприклад, залучення ManLAM або фосфатидил-міо-інозитолових манозидів (PIM) до манозних рецепторів призводить до протизапальної відповіді; однак, залучення трегалози 6,6'-диміколату до макрофаг-індукованого Ca^{2+} -залежного рецептору лектину або залучення PIM нижчого порядку до CR3 та / або TLR призводить до прозапалення [83]. Таким чином, баланс між про- та протизапальними ліпідами, наявними на клітинній стінці БЦЖ та *M.tb*, є фактором, який слід враховувати у захисній здатності БЦЖ. Зменшення прозапального процесу на місці вакцинації може бути корисним, оскільки макрофаги будуть піддаватися впливу АГ протягом більш тривалого періоду часу і, таким чином, забезпечиться додатковий час для генерування Т-клітинної пам'яті.

Крім того, варто зважати на ще один факт при розробці нових вакцин чи аналізу ефективності вже наявних: БЦЖ, як і *M. tb*, може блокувати дозрівання фагосоми [87], залучаючи специфічні рецептори [88], що може призвести до неоптимального ефекту від вакцинування.

Дендритні клітини (ДК). Дендритні клітини є одними із найпотужніших антигенпрезентуючих клітин [89] і класично описуються як модулятори перехресних взаємодій між вродженим та адаптивним імунітетом [90]. Між ДК і макрофагами існують фенотипічні та функціональні відмінності, однак головна відмінність полягає в тому, що ДК, на відміну від макрофагів, мігрують з тканин через лімфатичну систему і потрапляють у дренажні лімфатичні вузли, де вони представляють антигени для наївних Т-клітин [91], що призводить до індукції ефektorних Т-

										Арк.
										34
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						

ДП 6104.00.000 ПЗ

клітинних реакцій [92]. Під час міграції, ДК дозрівають, активуючи МНС II та CD80, CD86, CD40 та CD54 костимуляційні молекули, які беруть участь в активації адаптивних імунних клітин [91, 92]. Деякі фагоцитарні рецептори ДК розпізнають БЦЖ, включаючи CR3, CR4, специфічні для дендритних клітин DC-SIGN та DEC-205 [93]. З усіх цих рецепторів DC-SIGN, ймовірно, є одним із найбільш важливих, оскільки нейтралізація DC-SIGN антитілами пригнічує взаємодію БЦЖ з ДК на 80% [92].

Показано, що сигнальні рецептори, такі як TLR2 і TLR4, беруть участь у активації та дозріванні ДК завдяки їх взаємодії з компонентами клітинної стінки БЦЖ [92]. Після вакцинації БЦЖ епідермальні ДК ініціюють адаптивну імунну відповідь *in vivo* шляхом переміщення з місця щеплення до дренажних лімфатичних вузлів, де вони представляють АГ адаптивним імунним клітинам.

Стимуляція ДК БЦЖ-вакциною *in vitro* індукує гомотипічну агрегацію, активацію поверхневих АГ-презентуючих молекул, пригнічення ендоцитарної активності і вивільнення TNF (фактору некрозу пухлин) [94]. Стимуляція ДК людини БЦЖ-вакциною може посилити поверхневу експресію МНС-II, CD40, CD44, CD54, CD80 та CD86, усіх маркерів, що беруть участь у активації ДК, дозріванні, міграції та презентуванні АГ до Т-клітин [95].

ДК, заражені БЦЖ, також секретують TNF, IL-1 β , IL-6, IL-4 та IL-10, але не IL-12 [96]. Важливу роль у формуванні імунітету при введенні БЦЖ грає TNF. Показано, що його нейтралізація інгібує дозрівання ДК, а отже для оптимальної ефективності презентування АГ необхідна його достатня концентрація [95]. Ще одним важливим фактором є IL-10. Він може пригнічувати міграцію інфікованих ДК у дренажні лімфатичні вузли, а також регулювати синтез IL-12 із наступною здатністю ДК до дозрівання, зменшуючи активацію і проліферацію Т-клітин і пригнічуючи таким чином адаптивну імунну відповідь [97].

										Арк.
										35
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ					

Нейтрофіли. Циркуючі нейтрофіли людини складають близько 60% клітин крові, мають короткий період перебування в кровотоці (6–10 год) і є одними з перших клітин, що реагують на сторонні молекули [98]. Нейтрофіли секретують велику кількість хемокінів і цитокінів, праймуючи довгоживучі фагоцити [99]. Взаємодія нейтрофілів з БЦЖ збільшує експресію їх маркерів адгезії CD11b і CD18, FcγRs II і III і стимулює регуляцію їх цитокінів (наприклад, IL-1α, IL-1β і TGFβ) і хемокінів (наприклад, IL-8, CCL2, та CCL3) [100]. Як зміни фенотипу нейтрофілів при контакті з БЦЖ можуть впливати на формування захисного імунітету проти *M.tb* поки що незрозуміло.

Нейтрофіли здатні переносити живу БЦЖ через лімфатичну систему в дренажні лімфатичні вузли в околиці ДК та Т-клітин. Перехресні взаємодії між інфікованими БЦЖ нейтрофілами та ДК в цьому місці подають сигнал дозрівання незрілим ДК, а також допомагають ДК в презентації АГ [101]. Затримка апоптозу, що спостерігається у нейтрофілів, які інфіковані БЦЖ, підтримує концепцію того, що БЦЖ може використовувати їх як засіб для поширення з місця щеплення до дренажних лімфатичних вузлів [102]. Однак, чи отримує користь господар від взаємодії нейтрофіл-БЦЖ, залишається без відповіді. Крім того, чим довше БЦЖ залишається в межах нейтрофілу, тим більша ймовірність того, що бактерії будуть вбиті нейтрофільними внутрішньоклітинними механізмами, можливо, посилюючи шляхи, що беруть участь в активації імунітету за допомогою презентації АГ [103]. Дослідження показують, що нейтрофіли, з одного боку, полегшують представлення АГ шляхом перенесення живих бацил до околиць ДК, але з іншого – вони можуть бути відповідальними за запобігання розвитку тривалого імунітету. Баланс між внутрішньоклітинною виживаністю БЦЖ та / або внутрішньоклітинним нейтрофільним її перетравлюванням може впливати на дозрівання ДК, подальшу адаптаційну імунну відповідь та довгострокове встановлення стану захисного імунітету. І навпаки, нейтрофіли також можуть спрямовувати активацію Т-клітин у лімфатичних

									Арк.
									36
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата					

ДП 6104.00.000. ПЗ

вузлах і, таким чином, брати участь у генерації адаптивних імунних відповідей [104]. Оскільки нейтрофіли потрапляють у тканини набагато швидше відносно інших клітин-господарів, вони можуть бути критичним посередником у кліренсі або персистенції мікобактерій.

Таким чином нейтрофіли можуть мати широкий спектр дії в контексті вакцинації БЦЖ і їх вплив може бути спрямований як на посилення так і на послаблення ефективності БЦЖ-вакцинування.

2.5.3 Адаптивна імунна реакція на вакцинацію БЦЖ

2.5.3.1 Т-лімфоцити

Т-клітинні відповіді виникають в ході взаємодії Т-рецептора з антигенами, представленим антигенпрезетуючими клітинами [105]. За невеликими винятками, всі вакцини стимулюють проліферацію CD4+ хелперних (Th) та CD8+ цитотоксичних Т-клітин [106]. В контексті імунітету БЦЖ, хелперні Т-клітини в ході імунної відповіді на вакцинацію здебільшого диференціюються в два різних класи ефекторних клітин: клітини Th1, що продукують IFN γ , та Th17, що продукують IL-17A, хоча IL-4-синтезуючі Th2-клітини також можуть генеруватися [107]. Інші типи клітин, такі як Т-регуляторні клітини (Treg) та CD1 Т-клітини, також утворюються після вакцинації БЦЖ, хоча і в меншій мірі. БЦЖ також індукує цитотоксичні Т-клітини, основна функція яких полягає в лізисі інфікованих клітин [108].

CD4+ та CD8+ Т-лімфоцити. Дослідження показують, що клітини CD4+ необхідні для зменшення навантаження бактерій у легенях та селезінці, а клітини CD8+ контролюють навантаження бактерій лише в селезінці. Ці результати вказують на те, що CD4+ клітини є основними ефекторними клітинами, що утворюються в результаті вакцинування в легенях, а також підкреслюють важливість клітин CD8+ у запобіганні дисемінації, таким чином група клітин CD4+ та CD8+ є головною ефекторною ланкою для запобігання туберкульозу. Однак, незважаючи на те, що клітини CD4+

										ДП 6104.00.000. ПЗ	Арк.
											37
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							

зменшують навантаження БЦЖ в легенях, БЦЖ не усувається, що свідчить про те, що їх ефекторні функції в легенях можуть бути обмеженими. Вакцинація БЦЖ з подальшим введенням *M.tb* підтверджує, що за відсутності CD4+, CD8+клітини здатні знизити бактеріальне навантаження *M.tb* в легенях у більш пізній фазі інфекції [109]. Ці дані демонструють, що БЦЖ може стимулювати захисні CD4+ і CD8+ клітини, а також припускають, що клітини CD4+ не настільки ефективні, як CD8+, якщо мова йде про вилучення мікобактеріальної інфекції в тканинно-специфічному контексті або, можливо, в специфічному середовищі легень CD4+ клітини не можуть в повній мірі реалізувати свої функції. Причина також може полягати і в самому збуднику, оскільки *M.tb* володіє багатьма факторами вірулентності, яких немає у БЦЖ, і які можуть бути використані для інгібування CD4+, але не CD8+ Т-клітинних реакцій.

CD4+ Т-клітини опосередковують свою функцію, в основному активуючи клітини вродженої імунної системи за рахунок залучення коstimуляторних молекул. Реакції клітин CD8+, хоча і подібні, не здатні до цієї функції [109]. Хоча існує широко поширена думка, що БЦЖ викликає погану реакцію клітин CD8+ *in vivo*, дослідження на людях співпадають із дослідженнями *in vitro*, що показують, що вакцинація БЦЖ індукує стійкі антиген-специфічні CD8+ реакції, що характеризуються підвищеною продукцією IFN γ , дегрануляцією, проліферацією та підвищенням рівня цитотоксичних білків [110]. Одним із механізмів, за допомогою якого клітини CD8+ сприяють ефективності БЦЖ, є їх здатність індукувати апоптоз клітин за використання FasL-Fas шляху, за допомогою якого CD8+ лізують клітини, які експресують Fas [111].

Таким чином, ще одне пояснення високої здатності клітини CD8+ контролювати десимінацію *M. tb* може полягати в їх здатності індукувати шлях FasL-Fas в селезінці або печінці, тоді як апоптоз клітин легень сильно обмежений, щоб запобігти надмірному пошкодженню тканин, які можуть призвести до легеневої недостатності.

									ДП 6104.00.000. ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						38

CD4+ Th17 T-клітини. Th17 клітинні відповіді в легенях можуть бути пов'язані як із підвищеним захистом від інфекції *M.tb* [112], так і з загостреною патологією [113]. З одного боку, повторна вакцинація БЦЖ посилює приплив гранулоцитів / нейтрофілів у легені залежним від ІЛ-17А способом, що призводить до розширеної імунопатології. З іншого боку, ІЛ-17А необхідний для підтримки відповідей IFN γ CD4+ клітинами в легенях. Присутність ІЛ-17А в легенях може бути важливим для генерації ефективної імунної відповіді, яка або приносить користь хазяїну (бактеріальний контроль із обмеженим запаленням), або шкодить (першопочатковий бактеріальний контроль із надмірним запаленням, яке в результаті приводить до неконтрольованого росту бактерій). Дослідження вказують на роль ІЛ-17А в імунній відповіді на *M.tb* [114], особливо під час початкового утворення гранульоми [115]. Цікаво, що високі концентрації ІЛ-17А, що обмежують патологію легень, корелюють із наявністю ІЛ-10 [116]. Хоча зв'язок між ІЛ-17А та ІЛ-10 залишається незрозумілим, припускають, що ІЛ-10 має імуносупресивну роль під час формування імунітету до БЦЖ [117]. Як і ІЛ-17А [112], ІЛ-10 відіграє важливу роль під час початкових стадій інфекції *M.tb in vivo* [117].

T-регуляторні клітини. T-регуляторні клітини (Treg) також є важливим елементом при імунізації БЦЖ. Так, результати випробування вакцинації БЦЖ часто пов'язують із географічним розташуванням, у якому була проведена вакцинація. Повідомляється про низьку ефективність БЦЖ в регіонах світу, що знаходяться ближче до екватора, де поширена велика кількість ефективних мікроорганізмів (ЕМ). Таким чином захисна ефективність БЦЖ може залежати від передуючого розвитку клітин Treg через попередній контакт організму з ЕМ [118]. Дослідження показують, що зменшення кількості Treg-клітин призводить до зменшення навантаження *M.tb* у легенях мишей [119], що свідчить про те, що ці клітини можуть в значній мірі послаблювати БЦЖ.

										Арк.
										39
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ					

CD1-обмежені T-клітини. Оскільки мікобактеріальна клітинна стінка в основному представлена ліпідами, дослідження також були зосереджені на з'ясуванні ролі CD1 обмежених CD8⁺ T-клітин [120]. Люди, імунізовані БЦЖ, містять пул обмежених CD1 CD8⁺ T-клітин, які розпізнають БЦЖ-інфіковані ДК [121]. Дослідження морських свинок підтверджують цей висновок, показуючи, що вакцинація БЦЖ індукує гуморальні та CD1-обмежені цитотоксичні T-клітинні імунні відповіді, стимульовані мікобактеріальними ліпідами та ліпогліканами [122]. Можливо, ці ліпід-обмежені CD8⁺ T-клітини опосередковують імунну реакцію в периферичних органах, таких як селезінка та печінка, і, таким чином, відповідають за підтримку хронічної стадії захворювання та/або допомагають встановити приховану інфекцію. Ця CD1-обмежена популяція CD8⁺ T-клітин може також бути медіатором, який запобігає розповсюдженню туберкульозу та туберкульозного менінгіту.

Зв'язані із слизистою оболонкою інваріантні T-клітини (MAIT-клітини). MAIT-клітини потенційно діють як «сторожі» інфекції *M.tb*. Не дивлячись на те, що у людей з ТБ низький рівень циркулюючих клітин MAIT [123], ці клітини реагують на стимуляцію БЦЖ, виробляючи більш високі рівні TNF и IFN γ [124].

Мультифункціональні T-клітини. Мультифункціональні клітин CD4⁺ отримали свою назву внаслідок того, що одночасно продукують велику кількість різних цитокінів. Як правило це: TNF, IFN γ , IL-17A та IL-2. Важливо підкреслити, що багатофункціональні T-клітини не завжди співвідносяться із захисним імунітетом [125]. Вони, як це характерно для CD4⁺, не реалізують в повній мірі своїх функцій у легеневого середовищі.

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

2.5.3.2 В-лімфоцити

Формування тривалого імунітету до більшості патогенів за допомогою сучасних ефективних вакцин ґрунтується на довгоіснуючих гуморальних імунних реакціях, які забезпечують захист через антитіла (АТ) [106]. Вакцина БЦЖ є сильним індуктором гуморального імунітету; однак, внаслідок внутрішньоклітинної природи інфекції *M.tb*, потенціал АТ в значній мірі в літературі ігнорується. Однак зараз дослідники почали розкривати більш значну роль В-клітин, ніж виключно продукування АТ, в контексті мікобактеріальних інфекцій [126].

Гуморальна відповідь Хоча внутрішньоклітинне існування *M.tb* в клітинах хазяїна обмежує функцію антитіл (АТ), швидка та ефективна АТ-опсонізація *M.tb* перед проникненням у фагоцити може бути механізмом, що призведе до кліренсу за допомогою вродженого імунітету. Дослідження продемонстрували, що вакцинація БЦЖ індукує довгоіснуючі специфічні до мікобактерій В-клітини пам'яті у здорових людей [127]. Ранні дослідження, присвячені вивченню АТ після вакцинації БЦЖ, показують аглютинацію в сироватці крові пацієнтів, вакцинованих БЦЖ, при інкубації з антигенами *M.tb* [128]. Слідуючи даному відкриттю, гуморальна імунна відповідь після вакцинації БЦЖ пов'язана з високим рівнем вироблення АТ [129], зокрема, із прогресуючим збільшенням рівнів імуноглобуліна (Ig) М та ізотипів IgG: IgG1, IgG2 і IgG3 – при чому останні індукуються цитокінами Th1 [130]. Таким чином БЦЖ індукує стійку гуморальну відповідь, що може запобігти інфекції при контакті із збудником.

IgA – найпоширеніше АТ на слизовій оболонці легень, складаючи приблизно 30% від загальної кількості. Дослідження IgA під час вакцинації БЦЖ показали, що миші з дефіцитом IgA мали підвищену сприйнятливість до інфекції та понижену продукцію як IFN γ , та TNF у легенях [131]. Показано, що IgA має подвійну роль: посилює фагоцитоз мікобактерій; а також, взаємодіючи з IgG, посилює клітинну цитотоксичність, і блокуючи

										ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							41

опсонізацію збудника IgG [132], потенційно запобігає взаємодії з рецепторами Fcγ.

Таким чином, враховуючи те, що ми не знаємо, як довго *M.tb* залишається в ацелюлярному стані, антитіла можуть опосередкувати найпершу взаємодію між клітинами-господарями та *M.tb*. Роль антитіл, могла б бути спрямована на запобігання зараженню *M.tb*: генеруючи пул специфічного для *M.tb* антитіл на слизовій оболонці легень, *M.tb* можна було б нейтралізувати, перш ніж збудник матиме можливість зустріти клітини альвеолярних відділів, де він уже буде захищений від опсонінів [76].

Клітинно-опосередкована відповідь на БЦЖ. Роль В-клітин, не опосередкована синтезом антитіл, була виявлена при дослідженні фолікулярних антиген-комітованих CD4⁺ Т-клітин (TFH-клітин), виявлених в органах вторинних лімфатичних вузлів в безпосередній близькості до фолікул В-клітин [133]. Ці клітини мають важливе значення для забезпечення селекції та виживання В-клітин і стимулюють їх перехід у плазмоцити та В-клітини пам'яті [134]. Під час дослідження BCG ΔureC::hly було виявлено, що найвищі показники її ефективності корелюють з більш високим рівнем Т-клітин центральної пам'яті та клітин TFH [135]. Таким чином, подальше дослідження TFH-клітин є досить перспективним.

Таким чином в результаті проведення БЦЖ вакцинування в імунній системі запускається велика кількість взаємопов'язаних механізмів, розуміння біохімічних особливостей яких, з одної сторони, дозволить створювати вакцину із максимальними показниками ефективності, а з іншої – створювати оптимальні умови для її проведення, що виключають чи мінімізують фактори, що можуть її послабити.

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

Штам *Mycobacterium bovis* BCG 1921 року був отриманий у результаті послідовного 230-кратного пасажування вихідної культури *M. bovis* на середовищі, що містило екстракт картоплі, гліцерин та жовч [13-15]. Жовч виступала фактором, що призвів в кінцевому результаті до аттенування *M.bovis*, яке фенотипово проявилось у послабленні його вірулентності. Дана ознака була набута і проявляла стабільність вже після 39-го пасажу [16]. Відсутність реверсії при подальших пасажах свідчила про те, що набута мутація є або делецією, або складає множину мутацій, реверсія яких є низькоймовірною подією. Однак дослідження 1996 року [17] показали, що геноми *M.bovis* BCG та вірулентних *M.bovis* і *M.tuberculosis* різняться за наявністю саме делецій [14, 17, 18, 136], яких було ідентифіковано у вакцинного штаму три й названо RD1, RD2 та RD3 (*англ. Region of Difference*), які продемонстровано на рис 3.1 [17].

Region 1

```

BCG      AGAAGCGGTT GCCGCCGACC GACCTGACGA CGGCGCAGCT ACGCTCGCGT TCGTGGTGGA GCGGATTTGA
bovis    AGAAGCGGTT GCCGCCGACC GACCTGACGA CGGCGCAGCT ACGCTCGCGT TCGTGGTGGA GCGGATTTGA

BCG      CGTCGTGCTT CTGGTCGACG ATTGGCACAT
bovis    CGTCGTGCTT CTGGTCGACG ATTGGCACAT GATCGTGGGT GCCGCCGGGG GGATGCCGCC GATGGCACCG
(2,328)

BCG
bovis    CTGGCCCCGT TATTGCCGGC GCGGCGAGAT .../ \... CATCGGTGAC CCTTTGCAAA ACCTGGCTAT

BCG
bovis    ATTCCTGGGC CCGGTCATAG AAAGTGTCTT CATCGGCTTC CACCCAGCCG CCCGGATCCA GCATCTGTCT
(11,832)

BCG      GGCATAGCTG CCCGTCGGCC TGGTAATACT CATCCCCTAC TGCCTCCCC AAACCGCCAG ATCGCCTCGC
bovis    GGCATAGCTG CCCGTCGGCC TGGTAATACT CATCCCCTAC TGCCTCCCC AAACCGCCAG ATCGCCTCGC
    
```

					ДП 6104.00.000 ПЗ			
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробив		Байко Т.Ю.			РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.						Д	43	142
Керівник		Орядінська Л.Б.			КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ			
Затвер.								

Таблиця 3.1

Характеристика делецій в різних штамів БЦЖ [136]

Штам БЦЖ	RD	Кількість RD	Кількість ORF*	Кількість втрачених пар основ
Russia	RD1, RDRussia	2	11	11 061
Moreau	RD1, RD16	2	15	17 066
Japan	RD1	1	9	9 458
Sweden	RD1	1	9	9 458
Birkhaug	RD1	1	9	9 458
Prague	RD1, RD2	2	20	20 246
Glaxo	RD1, RD2, RDDenmark/Glaxo	3	22	20 972
Denmark	RD1, RD2, RDDenmark/Glaxo	3	22	20 972
Tice	RD1, RD2, nRD18	3	23	21 793
Connaught	RD1, RD2, nRD18, RD8	4	27	25 221
Frappier	RD1, RD2, nRD18, RD8, RDFrappier	5	30	27 192
Phipps	RD1, RD2, nRD18	3	23	21 793
Pastuer	RD1, RD2, nRD18, RD14	4	31	30 866

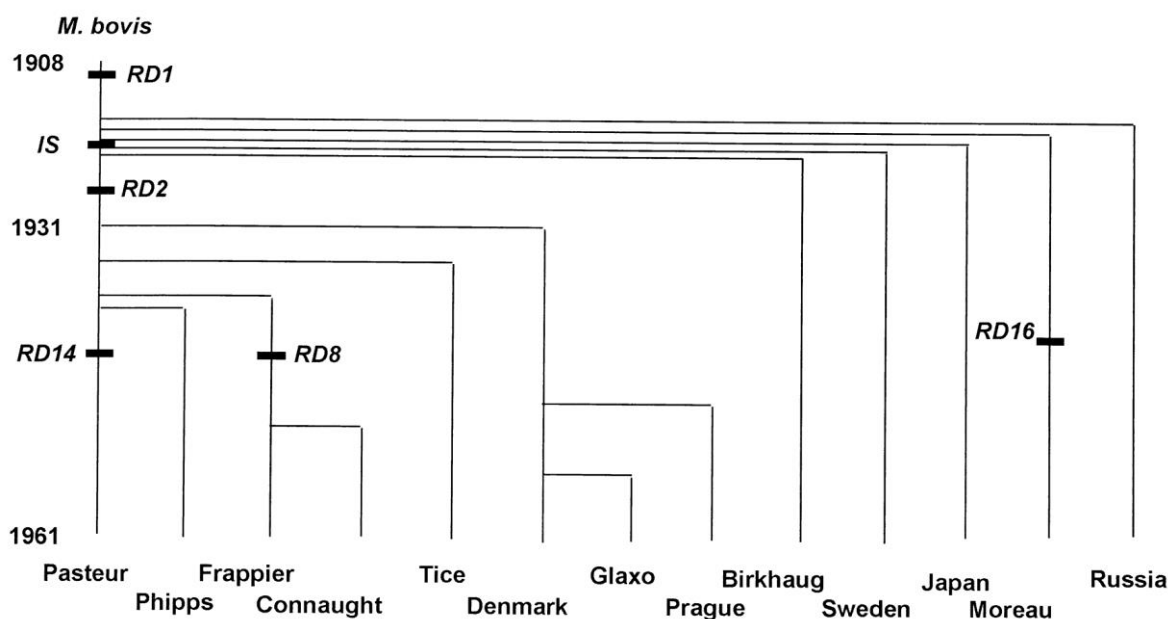


Рис. 3.2 Історична генеологія БЦЖ [14]

Позначення: Вертикальна вісь – час. Горизонтальна вісь – БЦЖ штами, розташовані у відповідності з хронологією їх виникнення (з права на ліво) та делеціями, яких вони набували.

Відповідно до рис. 3.2, штам *M. bovis*, який використовувався для розробки БЦЖ, не має ділянок RD3, RD4, RD5, RD6, RD7, RD9, RD10, RD11, RD12,

RD13 та RD15. В ході подальшого розмноження цього штаму ділянки RD1, RD2, RD8, RD14, RD16 та елемент IS6110 (IS) також були втрачені [14]. Але, як видно з таблиці 3.1 та рисунку 3.2, для всіх штамів характерна делеція RD1, яка очевидно стала первинним фактором ослаблення вірулентності мікобактерій дикого типу і виникла ще до 1921 року. Опероном *esx-lhp* RD1-області кодуються ESAT-6 і CFP-10 – високоімуногенні специфічні білки, що розпізнаються Th1-клітинами й індукують синтез інтерферону- γ [20, 21, 28]. Було показано, що делеція RD1 області у *M. tuberculosis* H37Rv приводить до ослаблення штаму [137], однак комплементация BCG Pastuer із RD1 не повністю відновлює його вірулентність до рівня дикого типу [32]. Таким чином RD1-область в значній мірі, але не повністю відповідає за вірулентність мікобактерій, а отже є і інші вагомні для даної ознаки ділянки геному.

Однак, попри наявність делецій, *M. bovis* BCG залишається генетично високоспорідненим як із *M. bovis*, так і з *M. tuberculosis*, що в значній мірі обумовлено тим, що вихідні штами *M. bovis* та *M. tuberculosis* між собою є практично ідентичними. Так, першим штамом *M. bovis*, який було секвеновано, є *M. bovis* AF2122 / 97. Зараз саме геном цього штаму вважається еталонним [138]. Так, при його секвенуванні (4 345 492 пар основ) та порівнянні із геномом людського штаму *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (4 411 532 пар основ) було виявлено, що геноми співпадають на 99,95%, а відмінності обумовлені делеціями [139].

Генетичну спорідненість між *M. bovis* BCG, *M. bovis* та *M. tuberculosis* візуально також демонструє діаграма Вена на рис. 3.3., на якій зображені групи ортологічних генів *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* BCG та *M. tuberculosis* [140].

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		46

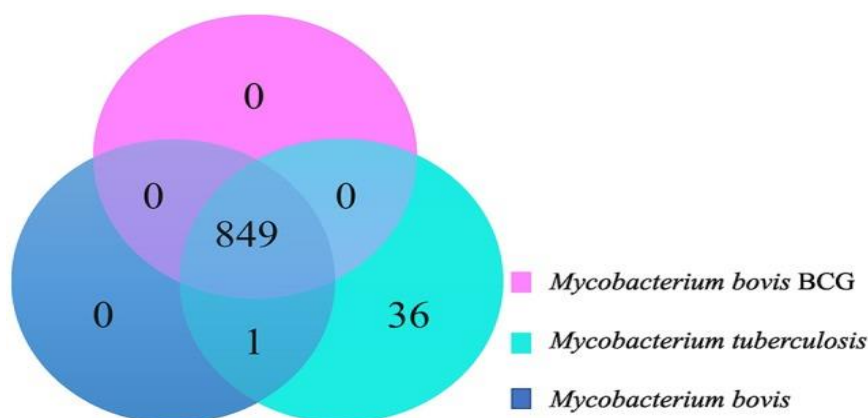


Рисунок 3.3 Групи ортологічних генів
M. bovis, *M. bovis BCG* та *M. tuberculosis* [140]

Отже, підсумовуючи:

1. Геноми мікобактерій бичачого та людського типу мають високий ступінь ідентичності (99,95%). Відмінності ж пов'язані головним чином делеціями, які зменшують, але не змінюють (у глобальному розумінні) геном бактерій, що робить *M. bovis* ідеальним варіантом для розробки вакцини.
2. Послаблення вірулентності у вакцинних штамів обумовлено стійкими мутаціями в геномі – делеціями, в областях яких у штаму дикого типу кодуються фактори вірулентності.

3.2 Метод створення високопродуктивного промислового продуценту

Вакцинні штами БЦЖ мають обмежену здатність використовувати амінокислоти в якості джерела азоту для росту. Більше того, природні амінокислоти, зокрема L-аланін та L-серин, пригнічують ріст бактерій в організмі людини, інгібуючи глутамін-синтазу. При цьому збудник туберкульозу *M. tuberculosis* не має подібних перешкод для свого існування. Така відмінність пов'язана із делеціями у геномі вакцинних штамів, які призвели, у випадку із геном аланіндегідрогенази *ald*, до зсуву рамки

зчитування і, як наслідок, вакцинний штам не може синтезувати повнорозмірний білок L-аланіндегідрогенази і, відповідно, не може катаболізувати аланін. Аналогічно й відсутність можливості утилізувати L-серин ймовірно пов'язана із мутаціями чи змінами в експресії гену L-сериндегідрогенази *sdaA*. Таким чином, введення додаткових геномних послідовностей у вакцинні штами дозволить їм подолати дану проблему і персистувати в організмі людини набагато довше, формуючи стійку й тривалу імунну відповідь [55].

M.bovis BCG Tice, який пропонується використовувати у даній роботі, також не має аланіндегідрогеназної активності, а отже його характеристики як вакцинного субштаму, можна покращити, ввівши ген аланіндегідрогенази. Клонування гену аланіндегідрогенази відбувається наступним чином [55]:

1. **Отримання pUC-ALD.** *ScaI*-фрагмент геномної ДНК *M. tuberculosis* розміром 4,5 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.), що містить ген *ald* лігується в лінеаризовану рестриктазою *Ecl136II* плазмиду pUC19.
2. **Отримання pALD.** *KpnI*-фрагмент розміром 1,9 т.п.н., що містить ген *ald* лігується у лінеаризовану рестриктазою *KpnI* човникову плазмиду pMD31.
3. **Трансформація.** Введення pALD у *M. bovis* BCG за допомогою електропорації.
4. **Відбір рекомбінантів.** Селекція на агарі Middlebrook 7H9 (Difco), що на 1 л містить: 0,5 г сульфату амонія; 0,5 г L-глутамату; 0,1 г цитрату натрію; 1 мг піридоксину; 0,5 мг біотину; 2,5 г динатрій фосфату; 1 г монокалій фосфату; 40 мг солі лимоннокислого заліза і лимоннокислого амонію; 50 мг сульфату магнію; 0,5 мг хлориду кальцію; 1 мг сульфату цинку; 1 мг сульфату міді; 2 мл гліцерину; 5 г альбуміну (V-фракція, бичачий), 2 г декстрази та 0,05% Твін 80, що додається після стерилізації. Додатково вносять 10% суміші олеїнова кислота/альбумін/декстроза/каталаза (OADC) та 25 мкг/мл канаміцину.

										ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
											48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата							

Схема отримання рекомбінантного штаму БЦЖ із аланіндегідрогеназною активністю зображена на рис. 3.4 [55].

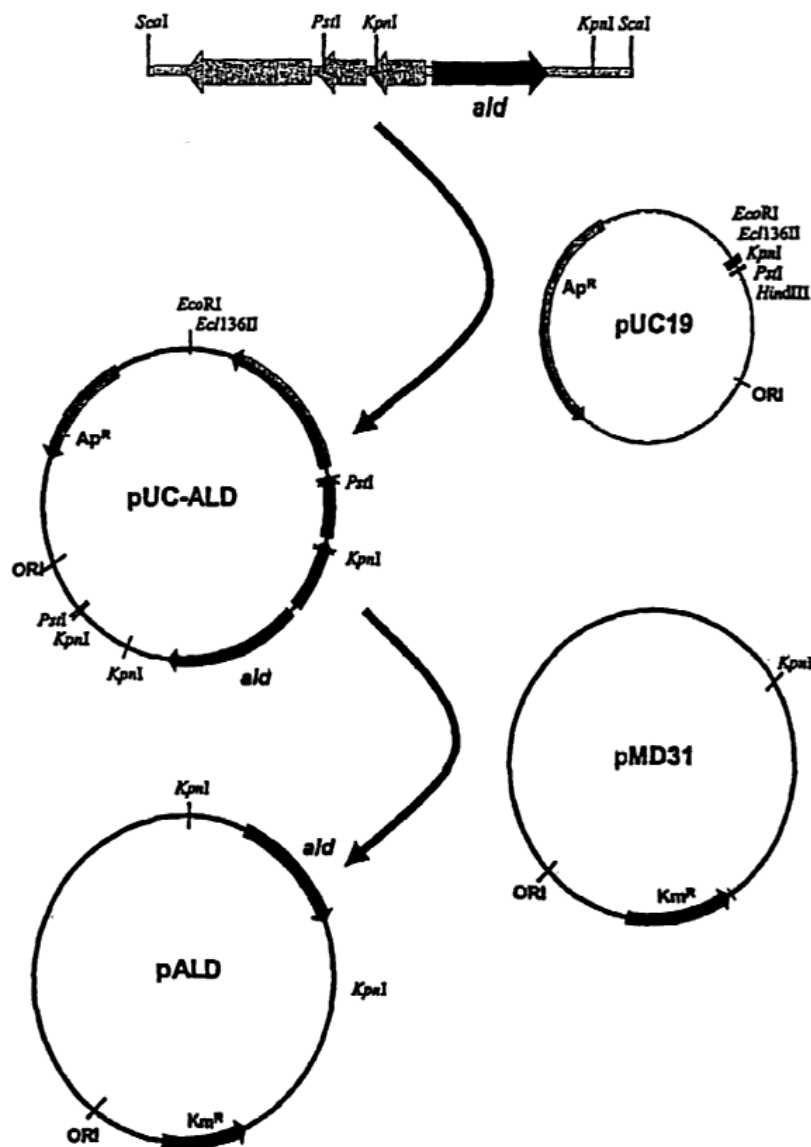


Рисунок 3.4 Отримання рекомбінантного штаму БЦЖ [55]

ald – ген аланіндегідрогенази; *pUC19* – плазмід; *Ap^R* – маркер стійкості до ампіциліну; *ORI* – оріджин реплікації; *ScaI*, *EcoRI*, *Ecl136II*, *KpnI*, *PstI*, *HindIII* – сайти рестрикції для відповідних рестриктаз; *pMD31* – плазмід (човниковий вектор); *Km^R* – маркер стійкості до канаміцину.

Перевагою даного рекомбінантного штаму є те, що в ході генно-інженерної діяльності не відбувається цілеспрямованого впливу на його антигенні чи імуногенні характеристики, що, ймовірно, повинно нести

значно менші ризики прояву небажаних побічних ефектів при застосуванні вакцини на його основі.

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Отримання продуценту, що використовується у даній роботі, включає застосування методів як традиційної селекції (культивування на несприятливих середовищах, що веде до аттенування вірулентного штаму дикого типу), так і методик генної інженерії (клонування гену *ald* *M. tuberculosis* в човниковому векторі та трансформування його у *M. bovis* BCG Tice). Принципові блок-схеми, що демонструють основні кроки його отримання, наведено на рис. 3.5 та 3.6.

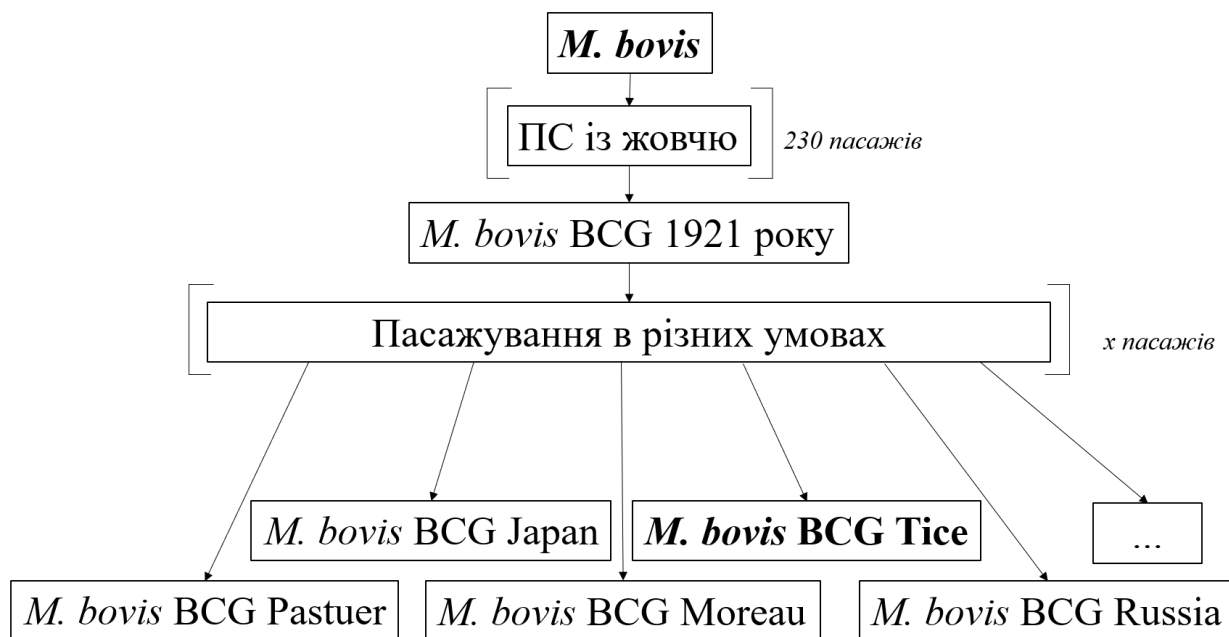


Рисунок 3.5 Принципова блок-схема отримання промислових вакцинних субштамів БЦЖ

На даній блок-схемі зображено історичний етап отримання штаму *M. bovis* BCG, а також етап отримання субштамів на його основі. Субштами були виділені в результаті багаторазового пасажування вихідного *M. bovis* BCG на середовищах різного складу у різних науково-дослідних центрах світу.

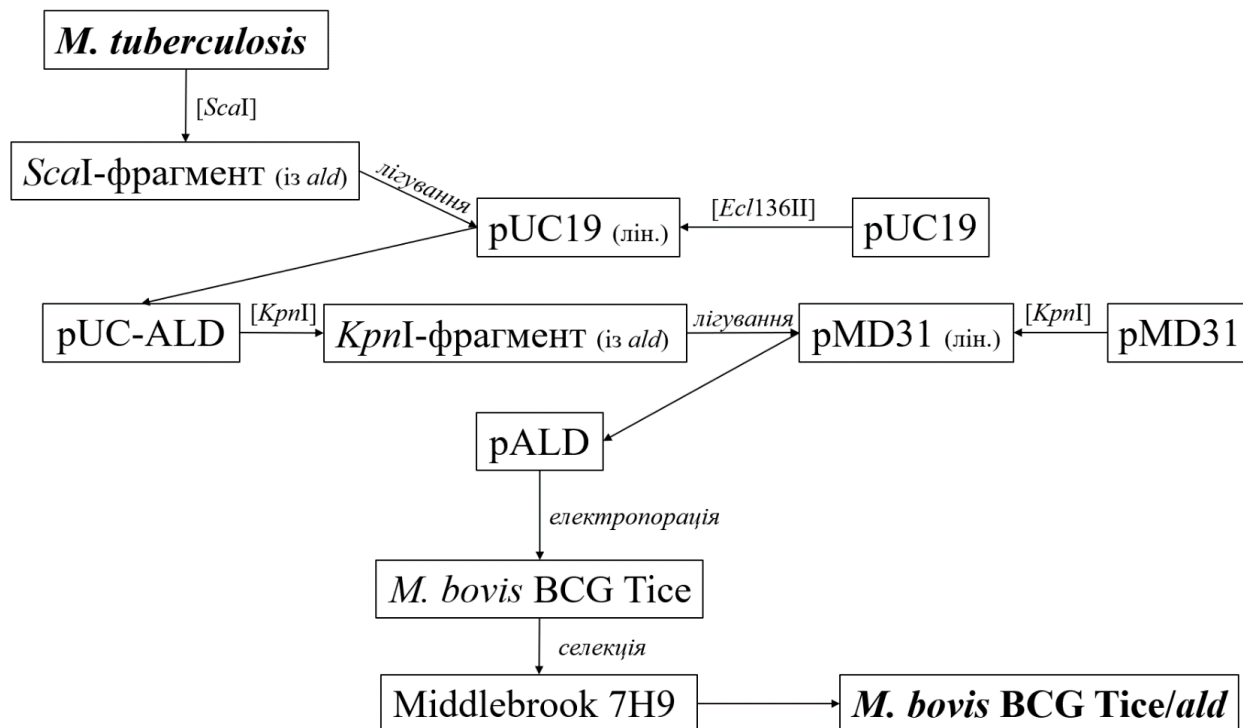


Рисунок 3.6 Принципова блок-схема отримання рекомбінантного промислового штаму *M. bovis* BCG Tice/ald

3.4 Особливості технології або апаратурного оформлення у зв'язку з використанням обраного продуцента

На виробництво БЦЖ-вакцини розповсюджуються вимоги належної виробничої практики (GMP) із виробництва стерильних ін'єкційних лікарських засобів, однак також є певні особливості, пов'язані із особливостями вакцинного продуцента, зокрема:

1. Відповідно до GMP, у виробництві БЦЖ-вакцини можуть бути задіяні тільки ті співробітники, яких ретельно контролюють шляхом регулярних перевірок імунологічного статусу або рентгенографії грудної клітини [141].

2. Зважаючи на світлочутливість мікобактерій [63], виробництво БЦЖ-вакцини повинно виключати потрапляння прямих сонячних променів, а також УФ-випромінювання упродовж усіх виробничих стадій, випробувань і зберігання [71].
3. Виробництво повинно мінімізувати ймовірність контамінування культури продуцента сторонніми культурами бактерій чи інфікування бактеріофагами, шляхом забезпечення асептики виробництва на всіх стадіях технологічного процесу та оснащення приміщеннями й робочими зонами із відповідними класами чистоти [141].

Проблема інфікування бактеріофагами стоїть досить гостро при виробництві, пов'язаному із культивуванням бактерій. Існує досить велика кількість бактеріофагів, специфічних до мікобактерій – мікобактеріофагів – що складають групу дволанцюгових ДНК-вірусів. При цьому багато з них цілеспрямовано використовуються для терапії мікобактеріозів, в тому числі й туберкульозу. Серед відомих мікобактеріофагів наступні [142]:

1. D29-фаг – перший активний до *M. tuberculosis* фаг, виділений 1954 року [143]. На даний момент він використовується для лікування мікобактеріозу, викликаного *M. ulcerans*, проти якого нема ефективної антибактеріальної терапії [144].
2. L5-фаг – виділений 1960 року. Це помірний фаг, що інфікує значну кількість мікобактерій в тому числі й *M. leprae* та *M. bovis* [145].
3. TM4-фаг – відкритий 1984 року. Самостійно його використовували для лікування інфекції *M. avium*, що як і *M. tuberculosis* може жити й розмножуватися всередині фагоцитів [146, 147].
4. Vo4 – літичний фаг, у якого виявлена вірулентність до мікобактерій *in vitro* (*M. tuberculosis*, *M. smegmatis*), що робить його потенційним кандидатом на застосування *in vivo* [148].
5. DS6A-фаг – найбільш специфічний літичний фаг, який інфікує *M.* практично весь *tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) [149].

6. Vxb1 – помірний фаг особливістю якого є те, що в лізогена Vxb1 є attB-сайт в бактеріальному гені GroEL1, який пов'язаний із синтезом міколатів, особливо в ході дозрівання біоплівки мікобактерій [150] з якою, як припускають, пов'язана висока виживаність та резистентність до антибіотиків. Дана особливість робить можливим використання лізогену Vxb1 разом із комплексом протитуберкульозних препаратів.

Таким чином, зважаючи на велику кількість й високу активність мікобактеріофагів, очевидною є небезпека, яка з ними пов'язана, при виробництві вакцини у разі інфікування.

Більшість бактеріофагів інактивуються при температурі понад 65-70°C, добре переносять заморожування і довго зберігаються при низьких температурах і висушуванні. Сулема (0,5% розчин) й фенол (1,0% розчин) не проявляють інактивуючого ефекту, а 1,0% розчин формаліну інактивує фагочастинки упродовж декількох хвилин. Виявлено резистентність бактеріофагів до впливів іонізуючої радіації та УФ-випромінювання [151]. Така висока стійкість до різних фізичних та хімічних факторів обумовлює те, що для боротьби із фагами застосовують досить жорсткі методи.

Так, наприклад, при культивуванні молочнокислих бактерій, фаги інактивують при гомогенізації в умовах високого тиску, спеціальних температурних режимів в присутності надоцтової кислоти чи хімічних біоцидів груп А (хлорид четвертинного амонію), С (лужна хлоридна піна) та Е (етоксильований ноніфенол й фосфорна кислота) [152, 153]. Також інактивація досягається за рахунок варіювання внесеного в середовище культивування вуглецю (зниження лізису лактококів при заміні глюкози на галактозу) [154]. Однак при виробництві ін'єкційного препарату, до якого ставляться високі вимоги якості, а особливо – щодо безпечності, стерильності та апірогенності – вносити додаткові хімічні реагенти чи втручатися в процес культивування, порушуючи асептику, не можна. Тому єдиним можливим шляхом запобігання інфікування культури мікобактерій

бактеріофагами є забезпечення високої якості проведення та контролю технологічних стадій та операцій, особливо –стерилізаційних операцій.

Із викладеного вище матеріалу можна зробити висновок, що недотримання вимог асептики може призвести з одної сторони до великих економічних збитків підприємства, а з другої – нести небезпеку для здоров'я споживачі, а тому, її дотримання є першочерговим завданням виробника для створення якісного готового продукту.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	<i>Арк.</i>
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		54

РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

1. Назва продукції

Вакцина туберкульозна БЦЖ – жива.

Міжнародна назва – freeze-dried BCG vaccine [155].

Кінцева продукція виробництва являє собою живу, ліофілізовану вакцину, виведену зі штамів *Mycobacterium bovis* (паличка Кальметта-Герена).

2. Форма випуску.

Ліофілізований порошок для приготування суспензії для ін'єкцій у флаконі (для вакцини) та розчинник (ізотонічний ін'єкційний розчин хлориду натрію як, наприклад у БЦЖ-1, чи середовище Сотона на основі води для ін'єкцій для БЦЖ SSI) по 1 мл у флаконі.

3. Нормативно-технічний документ на продукцію та реєстраційний номер

Нормативні документи:

- ФС.3.3.1.0018.15 «Вакцина туберкулезная БЦЖ живая» (Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII издания) [71].
- «Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines». (Рекомендації ВООЗ) [155].

Реєстрація:

В Україні вакцина не виготовляється. Відповідно до анатомо-терапевтичної класифікації (АТС) БЦЖ-вакцина має кодування J07AN01 [67]:

J - Протимікробні засоби для системного застосування

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Разрабидь</i>		<i>Байко Т.Ю.</i>				<i>Д</i>	<i>55</i>	<i>142</i>
<i>Консульт.</i>						<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Орядінська Л.Б.</i>						
<i>Затвер.</i>								

J07 - Вакцини

J07A - Бактеріальні вакцини

J07AN - Протитуберкульозні вакцини

J07AN01 - Туберкульозна жива ослаблена вакцина

4. Призначення продукції та можливі галузі використання

Вакцина для профілактики туберкульозу.

5. Стислий опис зовнішнього вигляду та фізико-хімічних характеристик продукції

Ліофільно висушена маса бактерій *Mycobacterium bovis* BCG, порошкоподібна чи у вигляді тонкої ажурної таблетки білого чи світло-жовтого кольору, яка легко відділяється від дна ампули (флакона), гігроскопічна [71].

6. Нормативні вимоги [156]:

Упаковка. Первинна упаковка імунобіологічного препарату повинна забезпечувати збереження заявлених властивостей препарату упродовж регламентованого строку його придатності і бути дозволеною для упаковки лікарських засобів при відповідних методах їх введення. Об'єм упаковки ліофілізатів повинен бути достатнім для внесення регламенованої кількості розчинника і наступного повноцінного перемішування вмісту. Для упаковки ін'єкційних форм препаратів в багатодозовій розфасовці не рекомендується використовувати ампули.

Маркування. На первинній упаковці вказують найменування лікарського, найменування чи логотип виробника, номер серії, дату виробництва, дату кінця строку придатності («придатний до»), дозування. На зовнішній упаковці вказують найменування лікарського препарату, найменування и адрес виробника, лікарську форму, номер серії, дату виробництва, дату кінця строку придатності («придатний до»), спосіб застосування, дозування, інформацію про склад, кількість лікарського препарату в упаковці, умови зберігання, умови відпуску, номер реєстраційного посвідчення, штрихкод, попереджувальні надписи. При

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

вкладенні у споживчу (зовнішню) упаковку додаткових компонентів (у випадку із БЦЖ це може бути розчинник ліофілізату), вказують найменування додаткового компонента, концентрацію, інформацію про склад, об'єм, номер серії.

На етикетці зазначають мінімальну і максимальну кількість життєздатних одиниць на одиницю розчиненої вакцини; вакцина має бути захищена від дії прямих сонячних променів [155].

Транспортування та зберігання. При температурі від 2 до 8°C [71].

Термін придатності. Більшість ліофілізованих вакцин БЦЖ придатними при температурі 2 – 8°C упродовж принаймні двох років від дати виготовлення. Зберігання кінцевого продукту при –20°C для продовження терміну зберігання повинно бути підтверджено [155]

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		57

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Таблиця 4.1

Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина:			
1.1 Вода очищена	Специфікація Сп 5.14-01 "Вода очищена "in bulk" ДФУ, 1 вид., доп. 1, 2004, ст.308.	Опис, рН, жорсткість, відновлюючі речовини, важкі метали, кальцій і магній	Розчинник для компонентів поживного середовища
1.2 Гліцерин	ГОСТ 6259-75	Зовнішній вигляд, масова частка сульфатів (не більше 0,001%), хлоридів (не більше 0,0002%), заліза (не більше 0,0001%), густина (1,256–1,261 г/см ³)	Компонент ПС
1.3 Заліза амонійного цитрат ч	ТУ 6-09-01-720-87	Реактив повинен відповідати встановленим у даному документі вимогам.	Компонент ПС
1.4 Калію гідрофосфат двозаміщений	ГОСТ 2493-75	Реактив повинен мати фізико-хімічні властивості в межах, що регламентуються даним стандартом	Компонент ПС
1.5 Кислота лимонна	ДСТУ ГОСТ 908:2006	Перевіряються органолептичні показники, фізико-хімічні (масова частка домішок, води, токсичних елементів). Повинні відповідати показникам, встановленим даним стандартом.	Компонент ПС

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
1.6 Магнію сульфат 7-водний	ГОСТ 4523-77	Вміст основної речовини та домішок повинні бути в межах, регламентованих даним стандартом.	Компонент ПС
1.7 Натрію гідроксид	ГОСТ 4328-77	Масові частки домішок. Повинні бути в межах, що регламентуються даним стандартом.	Для доведення рН середовища до необхідного значення
1.8 Натрію Глутамат	ТР ТС 029/2012 (Технический регламент Таможенного союза)	Вміст не менше 99,0 % і не більше 101,0 % на безводній основі. Не більше 2 мг/кг свинцю. Не має містити ртуті, кадмію та арсену (миш'яку).	Для використання в технологічному процесі готується 1,5% розчин, шляхом дозування необхідної кількості реактиву та дистильованої води.
1.9 Твін-80	PANREAC-146075 (каталоговий номер)	Темно-жовта рідина; контролюються фізико-хімічні показники (густина, в'язкість, вміст домішок, вміст жирних кислот). Повинні відповідати даному документу виробника.	Компонент ПС
1.10 L-Аспарагін	Специфікація на продукт від виробника APPLICHEM-A1668	Документ встановлює вимоги до фізико-хімічних властивостей продукту, вмісту основного продукту та домішок. Має відповідати.	Компонент ПС
2. Допоміжна сировина:			
2.1 Аміак водний 25%	ГОСТ 3760-79 ДФУ 1 вид., ст. 314	Розчин має відповідати показникам даного стандарту. Масова частка аміаку – не менше 25%.	Готується 0,5% розчин, шляхом змішування вихідного розчину із водою питною.
2.2 Вода для ін'єкцій	ДФУ, 1 вид., доп.1, 2004, ст.307. Специфікація Сп 5.14-02 "Вода для ін'єкцій "in bulk" ДФУ, 1 вид., 2001, с.2.6.12, с.2.6.13	Опис, рН, електропровідність, випробування на чистоту: нітрати, алюміній, важкі метали, кальцій і магній, пірогенність або бактеріальні ендотоксини. Мікробіологічна чистота.	Для фінішного миття ампул

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6104.00.000 ПЗ

Арк.

59

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
2.3 Вода питна	ДСанПіН 2.2.4-171-10 ГОСТ 2874-82	Повинна бути безпечною в епідемічному та радіаційному відношенні, мати сприятливі органолептичні властивості та нешкідливий хімічний склад. Повинна мати менше 100 КУО/см ³ , не містити коліформ, кишкової палички, ентерококів, патогенних ентеробактерій, коліфагів, аденовірусів, ентеровірусів, антигенів ротавірусів, реовірусів, гепатиту В тощо. Не містити гельмінтів та кишкових паразитів. Також встановлені вимоги до вмісту різних елементів, яким повинна відповідати вода питна.	Для приготування робочих дезінфікуючих та миючих розчинів.
2.4 Гембар	ТУ У 24.2-21643506.002-01	Має відповідати даному документу. Концентрація 25%	Дезінфікуючий розчин Готують розведення відповідно до рецептури
2.5 Мило господарське	ГОСТ 790-89	Зовнішній вигляд, маркування, пакування	Для санітарної обробки рук.
2.6 Пероксиду водню розчин 35%	ГОСТ 177-88 ДФУ 1 вид, доп. 1, ст. 309	Розчин повинен відповідати фізико-хімічним характеристикам, встановленим даним стандартом. Концентрація 35%.	Антисептик Готують розведення відповідно до рецептури
2.7 Спирт етиловий 96%	ДФУ доп. 1, ст. 339	Об'ємна концентрація повинна становити 96%. Опис, ідентифікація, прозорість, розчинність, кольоровість, кислотність або лужність, домішки	Антисептик, для обробки рук, поверхонь та обладнання. Готують розведення відповідно до рецептури

4.3 Опис технологічного процесу

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва включає підготовку персоналу, приміщень, обладнання та комунікацій. Вона повинна здійснюватися таким чином, щоб в кінцевому рахунку задовольняти вимоги GMP та забезпечувати необхідну якість кінцевого продукту. Описані далі операції складені відповідно до вимог GMP та на основі описаних операцій в різних літературних джерелах професійного спрямування [141, 157-159] та методичних вказівок МУ 42-51-1-93 «Организация и контроль производства лекарственных средств» [160].

ДР 1.1 Підготовка персоналу

При влаштуванні на роботу (особи, що досягли 18 років) та щорічно персонал, який безпосередньо зайнятий у виробництві препарату, повинен пройти *медичний огляд*, пройти систематичне *навчання* щодо кваліфікованого виконання своїх обов'язків та заходів з охорони праці, а також дотримуватися правил особистої гігієни. Кожен працівник на підприємстві несе відповідальність за виконання правил особистої гігієни, стан робочого місця та виконання технологічних і санітарних вимог на своїй ділянці.

Працівники в процесі виробництва використовують *спецодяг*, засоби індивідуального захисту (халати, захисні окуляри, гумові рукавички, респіратори). Без спецодягу, а також в забрудненому чи некондиційному спецодязі працівники до роботи не допускаються. Забороняється у виробничі приміщення вносити верхній одяг, а також продукти харчування та інші сторонні предмети.

Одяг перуть в окремому чистому приміщенні, сушать і прасують гарячою праскою з двох сторін і стерилізують в автоклаві насиченою парою при температурі 120°C упродовж 45 хвилин. Для визначення придатності технологічного одягу до подальшого використання 1 раз на 2 тижня після прання його перевіряють на ворсовідділення тканини. Із 10 см² під дією

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

поток повітря в об'ємі 1л повинно виділятися не більше 40 частинок розміром ≥ 5 мкм. В приміщеннях класу А (а також В) персонал повинен працювати в рукавичках. 2 рази на тиждень контролюється стерильність технологічного одягу, рукавичок і мікробне обсеменіння рук персоналу.

Перед роботою *руки ретельно миють* упродовж 6 хвилин під проточною водою із гексахлорановим або 70% господарським милом, двократно намилюючи, а далі обробляють 0,5% аміачною водою. Обсушують феном і протирають 80% етиловим спиртом як дезінфікуючим розчином. В процесі роботи допускається наявність не більше 2 колоній неспоруютьоруючих мікроорганізмів в змивах із рук одного працівника.

Контроль: Кт (справність допоміжного обладнання: праски, пральні машини, сушки тощо); Кмб (змиви); Кх (концентрації дезрозчинів).

ДР 1.2 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів

Приготування дезінфікуючих розчинів здійснюють дотримуючись правил техніки безпеки. Дезрозчини після приготування повинні зберігатися обмежений час у спеціальних попередньо вимитих ємностях, конструктивні особливості яких передбачають можливість відбору проб. Забороняється доливати свіжоприготовлений розчин в частково порожні ємності.

При виборі дезінфікуючої речовини необхідно враховувати не тільки її бактерицидні властивості і спектр дії, але й можливу токсичність для людини. Рекомендується під час прибирання застосовувати 2-6% розчин перексиду водню, 1% розчин дегміну, 0,5% розчин хлорогексидину біглюконату, розчини рецептури «С4» і «Стериліум» або інші спеціальні дезінфектанти і детергенти. Однак варто пам'ятати, що тривале використання якогось дезінфікуючого засобу призводить до утворення стійких штамів мікроорганізмів. Тому рекомендують дезінфікуючий засіб змінювати кожні 10-14 днів або застосовувати декілька типів засобів.

Робочі розчини перекису водню готують в скляному посуді шляхом розведення перекису водню водою очищеною. Використовують 30% розчин перекису водню. Для приготування розчину заданої концентрації в збірник

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

подають воду очищену і через дозатор додають необхідну кількість перекису водню.

Розчин етилового спирту готують в чистій ємності, розводячи 96% спирт очищеною водою. Для приготування 1 л розчину етилового спирту з об'ємною часткою спирту 76% потрібно відміряти 792 мл 96% спирту та 208 мл очищеної води, перемішати.

Мийні та дезінфікуючі засоби, які використовуються в зонах А і В, мають бути стерильними, а для зниження мікробіологічної контамінації в недоступних місцях може бути використана фумігація «чистих» зон.

Контроль: Кт, Кх, Кмб

ДР 1.3 Підготовка приміщень

ДР 1.3.1 Підготовка приміщень класу А

Локальні зони для технологічних операцій, що потребують найменшого ризику контамінації. Умови класу А передбачають робоче місце з ламінарним потоком повітря ($0,45 \pm 20\%$) м/с.

Для унеможливлення контамінації процесу біосинтезу у приміщеннях необхідно проводити щоденне та генеральне (раз на тиждень) прибирання.

При *щоденному* прибиранні виробничих приміщень (миття підлоги та поверхонь обладнання) обробку проводять розчином перекису водню (масова частка 3%) з 0,5% миючого засобу. Стіни, двері, скляні перегородки й обладнання протирають стерильною безворсою тканиною або губкою, гарно змоченою дезрозчином із розрахунку 100-150 мл/м². Далі цим же розчином миють підлогу. При виявленні у повітрі плясняви, концентрацію перекису водню збільшують до 4%, а при висіві спороутворюючої мікрофлори – до 6%. Внутрішні стінки обладнання після обробки дезрозчином повинні бути стерильними.

Кожен тиждень проводять *генеральне* прибирання виробничих приміщень з використанням дезінфікуючих (наприклад H₂O₂ 6%) і миючих засобів. З'ємні деталі – знімають і стерилізують. Також проводять зрошення

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

всього приміщення з гідропульта за використання 6% H_2O_2 з 0,5% миючого розчину з розрахунку 150-300 мл на 1 м² поверхні. Після зрошення – залишити на 45 хв, а далі – видалити надлишок рідини стерильною безворсою тканиною. Забруднені місця додатково миють цим же розчином. Зовнішні частини апаратів протирають безворсою тканиною, змоченою 3% H_2O_2 з 0,5% миючого дезрозчину із розрахунку 100 мл/м² або 70° спиртом (якщо поверхні руйнуються при взаємодії із H_2O_2). Після прибирання вмикають бактерицидні лампи. Не менше, ніж за 30 хв до роботи вмикають приточну, а потім витяжну вентиляцію.

Мікробіологічний контроль поверхонь здійснюють методом змивів з поверхні стерильними тампонами не рідше 1 разу на тиждень під час виробничого процесу. Контроль обмінення повітря – застосовуючи імпактор Кротова не рідше 2 разів на тиждень

Кількість колоній повинна бути в межах, регламентованих для даного класу приміщення (GMP), а саме: <1 КУО/м³.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ДР1.3.2 Підготовка приміщень класу В

Навколишнє середовище для зони А. Підготовка аналогічна як в класі А (щоденне та генеральне прибирання). Кмб: <10 КУО/м³.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ДР 1.3.3 Підготовка приміщень класу С

Щоденне прибирання слід проводити аналогічно з обробкою приміщень розчином 3% перекису водню з миючим засобом.

Генеральне прибирання проводять застосовуючи 0,2% миючий дезрозчин Гембар (або інший) з розрахунку 150-200 мл/л шляхом зрошення приміщення із наступною витримкою 30-40 хвилин, після цього вилучають надлишок розчину за допомогою губки. Особливо забруднені місця додатково миють цим же розчином. Кмб: <100 КУО/м³. Змиви з поверхонь – не більше 5 колоній.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

ДР 1.3.4 Підготовка приміщень класу D

Підготовка аналогічна як приміщення класу C. Кмб: <200 КУО/м³.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ДР 1.4 Підготовка обладнання та комунікацій

ДР 1.4.1 Миття обладнання

Після закінчення технологічного циклу, здійснюють миття обладнання. Для цього в усе обладнанні ретельно промивають розчином миючого засобу та водою питною. Частина обладнання, що безпосередньо торкаються поживного середовища та культуральної рідини, необхідно мити в розчині миючого засобу 0,05% разом з дезінфікуючими розчинами (етиловий спирт, H₂O₂), при температурі 50-60°C. З'ємні частини обладнання, які взаємодіють з препаратом, знімають, розбирають, ретельно миють в розчині миючого засобу з дезінфікуючими засобами (етиловий спирт, H₂O₂), при температурі 50-60°C. Внутрішні частини обладнання можна протерти губкою, змоченою 76% розчином етанолу. Проводять технологічний контроль, регулюючи концентрації необхідних розчинів. Після використання всі матеріали, що використовувалися для обробки обладнання, знезаражують упродовж 2-3 годин шляхом замочування у 6% розчині перекису водню. Відпрацьовані розчини поступають в збірник нейтралізації.

Контроль: Кт, Кх.

ДР 1.4.2 Ополіскування

Після миття проводять ополіскування декілька разів водою очищеною (дистильованою/демінералізованою) 80°C упродовж години. Використовувати воду питну також можна, але у ній велика кількість солей, які при нагріванні будуть відкладатися на трубопроводах, а потім під напором нових порцій води захвачуватися і потряпляти у ферментер, порушуючи теплообмінні процеси та руйнуючи матеріал. Таким чином, використання води питної приведе до більш швидкого зносу трубопроводів та необхідності їх постійно відчищати. Тому,

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

використання води очищеної є більш доцільним. Відпрацьовану воду направляють в збірник нейтралізації.

Контроль: Кт.

ДР 1.4.3 Перевірка на герметичність

Перевірку обладнання на герметичність проводять після проведення всіх ремонтних та перевірочних робіт. Ємкісне обладнання на герметичність перевіряють при повітряному тиску 0,5 – 0,6 МПа. Якщо упродовж 30 хв тиск (за манометром) не знижується, обладнання вважають герметичним. Фланцеві з'єднання та зварні шви перевіряють на герметичність за допомогою мильної води при повітряному тиску від 0,5 до 0,6 МПа. Під паровим тиском перевіряють всі матеріальні, посівні і конденсатні вентиля та трубопроводи. Після перевірки герметичності обладнання, утворюється конденсат, який відправляється на знешкодження відходів.

Контроль: Кт.

1.4.4 Промивання гарячою водою

Перед стерилізацією обладнання (в тому числі ферментер) промивається гарячою водою очищеною температури 100°C, що поступає з магістрального трубопроводу, а далі по місцевому, які оснащені відповідними КВП: датчик температури, тиску та витратомір. Відпрацьована вода подається в збірник нейтралізації по місцевому трубопроводі.

Контроль: Кт.

ДР 1.4.5 Стерилізація обладнання

Головний фільтр стерилізують гострою парою, яка подається під тиском 0,2 МПа, при температурі 130°C упродовж 2 год. Після стерилізації знижують тиск до 0,04 МПа і продувають фільтр повітрям до повного видалення вологи. Повітря після головного фільтра підлягає мікробіологічному контролю (Кмб).

Стерилізацію *індивідуального фільтру* та приєднаних до фільтру арматури й трубопроводів здійснюють разом, за допомогою гострої пари, при температурі 126-132°C упродовж години. Стерилізацію індивідуальних

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

фільтрів проводять перед кожною ферментацією. Повітря після індивідуального фільтру контролюють на стерильність.

Стерилізацію *ємнісного обладнання* та комунікацій проводять гострою парою під тиском 0,2 МПа при температурі 125-130°C упродовж 1,5 год. В процесі стерилізації водяна пара утворює вторинну водяну пару та конденсат, які відводяться із апарату через місцеві трубопроводи. Вхід/вихід пари і вихід конденсату регулюються і контролюються витратомірами, що встановлені на відповідних трубопроводах. Контролюється температура вхідної/вихідної вторинної пари, а також тиск у трубопроводах, який вони створюють. Трубопроводи, що сполучені із конденсатовідвідником також контролюються, що дозволяє робити висновки про ефективність стерилізаційних процедур (надмірна кількість конденсату може свідчити про застійні зони).

Сублимаційну сушарку можна стерилізувати різними способами: парами формальдегіду чи окису етилену, розпилюванням пероцтової кислоти чи перекису водню, за допомогою парів перекису водню за умов сублимації, чи традиційно – насиченою парою. У даній роботі пропонується використовувати насичену пару.

Також не рідше одного разу на рік необхідно проводити валідацію методу стерилізації. Для цього використовують біологічні індикатори (наприклад, 3М™Attest™Rapid Readout) та хімічні (наприклад, 3М™Comply™).

Контроль: Кт (параметри процесу стерилізації), Кмб (змиви).

ДР 1.4.6 Охолодження обладнання

Все обладнання після стерилізації гострою парою повинно охолотитися упродовж 3,5 годин. Контролюється його температура за допомогою термодатчика. Кінцева температура повинна бути оптимальною для відповідної технологічної операції. У випадку ферментера – 37-38°C.

Контроль: Кт, Кмб.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		68

ДР 2 Підготовка стерильного технологічного повітря

Повітря, яке використовується для аерації поживного середовища, повинно бути стерильним та мати температуру 37-38°C.

ДР 2.1 Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через забірну шахту на висоті 30 м.

Контроль: Кт

ДР 2.2 Попередня очистка повітря

Механічні частки розміром більше 5 мкм з повітря вилучають за допомогою фільтра періодичної дії сухого типу, у якому в якості фільтруючого матеріалу використовують пінополіуретан. Цей фільтр запобігає забрудненню вентилятора та знижує кількість контамінантів, що адсорбовані на механічних частках. Ефективність очистки складає не менш ніж 70%. Далі повітря надходить у компресор.

Контроль: Кт

ДР 2.3 Стиснення повітря у компресорі

При потраплянні повітря в поршневий компресор його температура внаслідок стискання підвищується з 15-25 °С на вході до 100-120°C на виході.

Контроль: Кт

ДР 2.4 Стабілізація термодинамічних показників

При виході з компресора встановлюють теплообмінник трубчастого типу, куди повітря поступає для охолодження . В якості холодоносія використовується вода. Далі повітря надходить до ресивера для згладжування пульсацій у тиску при роботі компресійного обладнання та видалення крапельної вологи. Повітря з ресиверу виходить під тиском близько 0,3 МПа. Перед подачею в головний фільтр повітря охолоджують в теплообміннику (наприклад, в кожухотрубному). Кінцева температура повітря повинна задовольняти температурні вимоги процесу культивування – 37 - 38°C.

Контроль: Кт.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		69

ДР 2.5 Очищення повітря у головному фільтрі

Очищення від пилу та мікроорганізмів повітря відбувається в головному фільтрі. Використовують глибинні набивні фільтри періодичної дії. Заміна фільтруючого матеріалу проводиться 2 рази на рік. Як правило в якості фільтруючого матеріалу використовують скловолокно з діаметром 7 – 21 мкм. Ефективність очистки 90 – 99%.

Контроль: Кт, Кмб.

ДР 2.6 Очищення повітря в індивідуальному фільтрі

Заключна стадія стерилізації повітря здійснюється в індивідуальних фільтрах, розташованих безпосередньо перед ферментером. Використовують фільтри тонкої очистки (ФТО), як фільтрувальний елемент використовують фторопластові втулки, товщиною 4 мм. Фільтр являє собою металевий циліндр з кришкою та конічним дном. Ступінь очищення становить (ефективність) $E = 99,99\%$ (і вище).

Контроль: Кт, Кмб.

ДР 3 Підготовка води

Підготовка води на фармацевтичних підприємствах реалізується в окремих водопідготовчих цехах і складає цілу окрему технологічну лінію. При цьому питання водопідготовки жорстко контролюється рядом нормативних документів і до кожного типу води (питна, дистильована чи ін'єкційна) висувається ряд чітких вимог. Дотримання цих вимог є обов'язковим для виробника фармпродукції і безпосередньо впливає на якість та безпечність готового продукту.

ДР 3.1 Підготовка води очищеної (дистильованої)

Отримують із води питної з місцевого водопроводу. Процес отримання води очищеної включає наступні операції: підігрів й термостатування - груба фільтрація - пом'якшення - фільтрація через вугільний фільтр - фільтрація через фільтр з діаметром отворів 3 мкм - зворотній осмос.

Контроль: Кт, Кх, Кмб

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
						70
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		

ДР 3.2 Підготовка води для ін'єкцій

Отримують із води очищеної, шляхом дистиляції останньої у дистиляційних апаратах. Використовується для фінішного миття первинної упаковки стерильних лікарських засобів (ампул, флаконів тощо).

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ДР 4 Підготовка ампул

Підготовка ампул як і водопідготовка реалізується в окремих цехах, первинні операції якої повинні відбуватися у чистих приміщеннях не нижче класу Д.

ДР 4.1 Відкриття ампул

У камерах нагрівання і видержки (відпалу) тунельної печі (наприклад, Маріупольського ЗТО) ампули нагріваються до температури 560 – 580°C з витримкою при цій температурі близько 10 хв і відпалюються. Зона охолодження розділена на дві частини: у першу частину (за напрямом руху) подається протитечією повітря, що пройшло другу частину і має температуру близько 200°C. У першій зоні цієї камери відбувається поступове охолодження ампул упродовж 30 хв. У другій зоні ампули швидко охолоджуються повітрям до 60°C за 5 хв, потім до кімнатної температури (20-25°C) і надходять до столу вивантаження.

Контроль: Кт

ДР 4.2 Миття ампул

ДР 4.2.1 Миття водою очищеною

Ампули набираються у касети й надходять в апарат миття.

Для зовнішнього миття ампул застосовується напівавтомат типу АП-2М2 Маріупольського ЗТО. Напівавтомат являє собою апарат із кришкою, в який на підставку, що вільно обертається, установлюється касета з ампулами. Над касетою розташований душувальний пристрій, через який на ампули подається 50-60°C вода очищена. Під дією струменів води касета

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

обертається, завдяки чому досягається рівномірне миття ампул. Продуктивність автомата з обробки ампул місткістю 1 – 2 мл досягає 30 тис. ампул за годину

Внутрішнє миття здійснюється вакуумним методом. Ампули в касетах поміщають капілярами вниз, занурюючи у воду очищену, після чого створюється вакуум. При цьому повітря видаляється із ампул. При поверненні нормального атмосферного тиску, вода стрімко виприскуються із ампули. В результаті турбулентного руху рідини відбувається промивання. Знову створюється вакуум, внаслідок чого вода видаляється із ампул. Операція повторюється 5 разів дистильованою водою.

Контроль: Кт.

ДР 4.2.2 Миття водою для ін'єкцій

Проводиться аналогічно як і водою дистильованою у двократному повторі.

Контроль: Кт.

ДР 4.3 Сушка й стерилізація ампул

Для висушування і стерилізації використовують тунельні сушарки, в яких касети з ампулами переміщуються по транспортеру при нагріванні інфрачервоними променями в сушильній частині до 170°C, а в стерилізаційній — до 300 °C.

Із кожної партії ампул, що не перевищує 10 000 штук варто відбирати 10 штук для перевірки стерильності. При більших партіях – із кожних наступних 10 000 додатково відбирати по одній ампулі для перевірки. Контроль стерильності ампул рекомендується проводити шляхом їх занурення у рідкі поживні середовища (у конічну колбу на 250 мл вносять 100 мл рідкого ПС і занурюють 2-3 ампули).

По ходу лінії з підготовки ампул вимоги до класу чистого приміщення підвищуються, таким чином, щоб на кінцевому етапі вони надходили на

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		72

наповнення в чисте приміщення класу А із середовищем класу В та подальшим транспортуванням всередині класу А аж до їх запаювання.

Контроль: Кт, Кмб.

ДР 5 Підготовка поживного середовища

Необхідно взяти необхідну кількість компонентів, дотримуючись рецептури, розвести їх у дистильованій воді, що містить гліцерол, підігріти до розчинення й автоклавувати при 121 °С упродовж 20-30 хвилин за тиску 0,1МПа. Автоклавувати поживне середовище для виробничого культивування, зважаючи на невеликий об'єм, можна в самому ферментері, а для посівного матеріалу – в колбах, поміщених в лабораторний автоклав за решти рівних умов.

Склад ПС у г/л, який відповідно до досліджень дає найбільший вихід бактеріальної біомаси (сухої маси клітин) наступний [68, 161]:

1. Заліза амонійного цитрат – 0,05;
2. L-Аспарагін ($C_4H_3NO_3 \cdot H_2O$) – 2,27;
3. Лимонна кислота ($C_6H_5O \cdot 7H_2O$) – 2;
4. Магнію сульфат ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) – 1;
5. Калію гідрофосфат (K_2HPO_4) – 0,5;
6. Твін-80 – 0,1;
7. 25 мл гліцерину;
8. Дистильована вода (до доведення до 1 л).

Кінцеве значення рН ПС при 25°C – 7,2±0,2 (доводиться шляхом додавання 4 N NaOH).

Також варто зауважити, що використання Твін-80 є спірним питанням, так як він інгібує на початкових стадіях ріст мікобактерій [68], тому необхідним є дослідження можливості використання інших детергентів або підбору оптимальної концентрації Твін-80. Спираючись на результати досліджень, щодо накопичення сухої біомаси [161], найкращі результати

										Арк.
										73
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						

ДП 6104.00.000 ПЗ

показані при концентрації Твін-80 0,1 г/л, тому в даній дипломній роботі пропонується використовувати саме таку концентрацію.

Простерилізоване поживне середовище перевіряється на мікробіологічну чистоту.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ДР 6 Підготовка 1,5% розчину глютамату натрію

Для приготування водного розчину глютамату натрію із концентрацією 1,5% – необхідно наважку кристалічного натрій глютамату моногідрату й розчинити у дистильованій (очищеній) воді й далі проавтоклаувати при 121°C упродовж 30 хвилин за тиску 0,1МПа. Автоклаується розчин одразу у відповідному реакторі-змішувачі у необхідній кількості заздалегідь, щоб він встигнув охолонути до температури культивування 37-38°C (щоб зменшити стрес для біомаси). Так як розчин використовується для двох операцій, а саме: відмивання і перед заморожуванням, як захисне середовище, то для одного циклу треба (з врахуванням втрат):

для відмивання: 189 г глютамату натрію і 12,41 л дистильованої води.

для криопротекції: 1690 г глютамату натрію і 111,3 л дистильованої води.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ТП 7 Отримання посівного матеріалу

ТП 7.1 Отримання посівного матеріалу в колбі на 300 мл

Отримання інокуляту відбувається шляхом вирощування культури мікобактерій у колбі Ерленмейера на 300 мл із 100 мл ПС Сотона та вмістом однієї ампули ліофільно висушеної культури (близько 10 млн КУО). Колбу поміщають у роторний шейкер із частотою обертання 198 об/хв, культивують упродовж 13-14 діб за температури $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, рН 7 – 7,2. Аерація відбувається за рахунок обертання шейкера і, відповідно, перемішування ПС. Повітря, що надходить, повинно бути стерильним, тому колби варто поміщати в чисте приміщення класу А.

Контроль: Кт, Кмб.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		74

ТП 7.2 Отримання посівного матеріалу в колбах на 500 мл

Отриманий інокулят переноситься в 10 колб Ерленмейера із об'ємом 500 мл, заповнених 200 мл свіжого поживного середовища Сотона. Культивують за аналогічних умов упродовж 8 діб. Посівного матеріалу в одну колбу вноситься 10 мл, що становить 5%.

Контроль: Кт, Кмб.

ТП 8 Виробниче культивування

Отриманий інокулят переноситься в 20-літровий із напівсферичним днищем біореактор у якому знаходиться свіже ПС Сотона. Об'єм інокульованого ПС становить 12 літрів. Таким чином, коефіцієнт заповнення становитиме 0,6 а відсоток внесеного посівного матеріалу 16,5%.

Біореактор має пропелерну мішалку верхнього приводу із 6 лопатями, розташованими під кутом 45°, яка обертається із частотою 840 об/хв (більша частота буде травмувати клітини і ріст буде значно нижчим). Особливістю біореактора є те, що аерація проводиться шляхом подачі стерильного повітря у вортексну воронку, яка утворюється при перемішуванні і не розбивається жодними перегородками (так як їх нема), як це характерно для класичних біотехнологічних ферментерів. Такої аерації достатньо для забезпечення киснем продуценту. Аерація йде зі швидкістю 15 л/год. Температура культивування становить $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$; рН 7 – 7,2; тривалість – 6-7 діб. Також при культивуванні створюється надлишковий тиск, який є додатковим фактором уникнення контамінування ззовні – манометричний тиск, що створюється на головку біореактора становить близько 5,3 кПа (5333 Па). Крім того, накопичення біомаси являє собою сукупність анаболічних процесів, що є прикладом ендотермічних реакцій. Тому ферментер треба підігрівати, подаючи у його сорочку теплоносії (вода очищена, підігріта до необхідної температури).

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		75

Культивування супроводжується проведенням контролю:

- підрахунок колоній на середовищі Лавенштейна-Йенсена;
- вміст кисню у середовищі;
- вміст азотистих речовин;
- вміст гліцерину;
- мікроскопія культури по Цілю-Нільсону.

Мікроскопія дозволяє контролювати щільність культури у середовищі, а також ідентифікувати чи нема зараження культури патогенними туберкульозними паличками чи мікобактеріями зі зміненим фенотипом.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ТП 9 Відділення біомаси

ТП 9.1 Фільтрування біомаси

Відділення біомаси проводиться шляхом фільтрування у тангенційному потоці за використання cross-flow фільтра. Фільтрація відбувається в умовах асептики за тиску 0,4 МПа; розмір пор фільтруючого матеріалу – 0,2 мкм. Фільтр оснащений системою самоочищення та стерилізації CIP/SIP і відповідним чином готується до роботи, після чого обов'язково перевіряється на мікробіологічну чистоту. Результатом фільтрування є отримання концентрату біомаси із залишками ПС. Отримана біомаса передається у фармацевтичний реактор-змішувач.

Контроль: Кт, Кмб.

ТП 9.2 Відмивання біомаси

Біомаса, відділена на попередній стадії, поступає у фармацевтичний реактор-змішувач, де змішується із стерильним 1,5% розчином глютамату натрію при обертанні мішалки з частотою 840 об/хв.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		76

ТП 9.3 Фільтрування біомаси

Отриману суспензію подають на фільтр аналогічної конструкції і знову відфільтровують (4 МПа; розмір пор – 0,2 мкм), отримуючи відмитий концентрат біомаси, який далі подається в наступний реактор-змішувач.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ТП 10 Гомогенізація культури БЦЖ із кріопротектором

Концентрат біомаси, отриманий на попередній стадії, змішується із кріопротектором – 1,5% розчином глутамату натрію у такій кількості, щоб довести концентрацію суспензії до 1 мг мікробної маси на 1 мл. Змішування проводиться у фармацевтичному реакторі-змішувачі оснащеному мішалкою до повної гомогенізації при 840 об/хв.

Контролюється мікробіологічна чистота та концентрація суспензії шляхом визначення оптичної густини фотометрично, де проти контролю використовують 0,9% розчину хлориду натрію.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ТП 11 Розлив вакцини у первинну упаковку

Після доведення суміші мікробної маси та глутамату натрію до гомогенного стану, не зупиняючи перемішування, в асептичних умовах (зона А із фоновим оточенням В) наповнюються скляні ампули (шприцевий метод наповнення) із місткістю 5 мл суспензією по 1 мл. Ампули повинні бути попередньо підготовлені (вмиті й простерилізовані) та виготовлені із сонцезахисного скла.

Контроль: Кт.

ТП 12 Ліофілізація вакцини

ТП 12.1 Заморожування вакцини

Заморожування проходить при температурі близько -60°C упродовж 24 годин. Робоча зона – клас А, оточення – В. Заморожування проводиться в сублімаційній сушарці, шляхом подачі охолодженого до необхідної температури теплоносія у порожнину полицок субліматора. Охолоджувальний агент – фреон. Теплоносій – силіконове масло. Для

										Арк.
										77
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						

ДП 6104.00.000 ПЗ

максимальної оптимізації процесу необхідно експериментальним шляхом підібрати таку швидкість заморожування, при якій травматизація культури буде мінімальною.

При заморожуванні (його проводять при незначному пониженому тиску, 0,98 атм (100кПа), так щоб тиск парів води був нижчим потрійної точки) також видаляється частина вологи: 10-15% від загальної кількості.

Контроль: Кт.

ТП 12.2 Первинне висушування

Відбувається видалення вільної води у формі льоду і температура препарату поступово підіймається до позначки 0°C. У камері сублимаційної установки створюються вакуум (близько 4,0 Па), що забезпечує вільну дифузію парів рідини від маси продукту. Тривалість процесу залежить від ряду параметрів. Але найбільш прийнятні параметри процесу визначають експериментально. Для даного проекту приймаємо тривалість 18 годин.

Контроль: Кт.

ТП 12.3 Вторинне висушування

Етап при якому відбувається видалення зв'язаної води при підігріві (приблизно 2°C на годину). Вкінці температура препарату доходить до 25-40°C. Залишкова волога не повинна перевищувати 3-5%. Тривалість – 2 години.

Контроль: Кт.

ТП 12.4 Герметизація

Закупорювання ампул відбувається під вакуумом.

Контроль: Кт.

ТП 13 Контроль БЦЖ-вакцини

Контроль якості готового препарату БЦЖ-вакцини передбачає перевірку відповідності продукту вимогам відносно:

1. Опису
2. Справжності
3. Стерильності

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		78

4. Аномальної токсичності
5. Прозорості
6. Однорідності
7. Пірогенності
8. рН
9. Загального вміст бактерій
10. Специфічної активності
11. Термостабільності
12. Втрати в масі при висушуванні
13. Специфічної нешкідливості

Дані показники повинні відповідати нормі, яка затверджується в нормативній документації на даний препарат, і в залежності від центру, що видає цей документ можуть в незначній мірі відрізнятися.

Так, беручи за основу ФС.3.3.1.0018.15 [71]:

- 1. Опис.** Пориста маса, порошкоподібна або у вигляді тонкої ажурної таблетки біолого або світло-жовтого кольору, яка легко відділяється від дна ампули (флакона), гігроскопічна.
- 2. Справжність.** При мікроскопії мазків, забарвлених по Цилію-Нільсону, повинні ідентифікуватися забарвлені в червоний колір (кислотостійкі) тонкі, прямі або злегка зігнуті палички довжиною 1 – 4 мкм і шириною 0,3 – 0,5 мкм, часто із невеликими вздуттями на кінцях, які не утворюють спор та капсул. При посіві вакцини на щільне ПС Левенштейна-Йєнсена – через 28-30 діб інкубації за температури (37±1)°С на поверхні ПС повинні вирости характерні шорсткуваті щільні колонії від 0,5 до 8,0 мм в діаметрі жовтуватого кольору із нерівними краями. Справжність може бути підтверджена валідованим молекулярно-біологічним методом.
- 3. Час відновлення препарату.** Не більше 1 хв після додавання в ампулу розчинника, що додається (0,9% розчин натрію хлориду) з утворенням грубодисперсної гомогенної суспензії. Допускається наявність

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		79

пластівців, які повинні розбиватися при 2-4-кратному перемішуванні за допомогою шприца або піпетки.

4. **Прозорість і кольоровість розчину.** Розчинена вакцина повинна мати вигляд грубодисперсної суспензії білого з сіруватим або жовтуватим відтінком кольору, без сторонніх включень. Визначення проводять візуально.
5. **Загальний вміст бактерії.** 1 мг/мл, що відповідає 20-м дозам, де 1 доза становить 0,05 мг/0,1 мл або від 500 000 до 1 500 000 клітин мікобактерій.
6. **Дисперсність.** Показник дисперсності повинен бути не нижче 1,5.
7. **Втрата в масі при висушуванні або Вода.** Не більше 5,0%. Випробування проводять гравіметричним методом відповідно до ОФС «Потеря в массе при высушивании» або методом титрування з реактивом К. Фішера відповідно до ОФС «Определение воды».
8. **Герметичність.** Ампули повинні бути герметичні (газове середовище в ампулах із препаратом повинна давати блідо-блакитне або рожево-блакитне світіння (10 Па – 1000 Па) при дії на газове середовище високочастотним електричним полем (20 – 50 кГц при напрузі 15 – 20 кВ).
9. **Відсутність сторонніх бактерій і грибів.** Стороння мікрофлора (бактерії, гриби) має бути відсутня за винятком мікобактерій БЦЖ. Визначення проводять методом прямого посіву відповідно до ОФС «Стерильность».
10. **Аномальна токсичність.** Вакцина повинна бути нетоксична. Визначення проводять відповідно до ОФС «Аномальная токсичность» на двох морських свинках, яким вводять максимальну разову дозу препарату для людини. Період спостереження – 7 діб. Препарат проходить випробування якщо обидві лабораторні тварини вижили і не захворіли, а також у них не відбулося зниження у масі, не з'явилися некроз чи абсцес у місці ін'єкції. Якщо у одної тварини виявлені

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		80

перелічені ознаки чи вона загинула, то випробування повторюють, подвоюючи кількість піддослідних тварин.

11. Специфічна безпека. Вакцина не повинна містити вірулентних мікобактерій. Випробування проводять на морських свинках однієї статі масою від 250 до 350г, які не отримують будь-яке лікування або дієту з антибіотиками, здатну вплинути на результати тесту (вводиться 5 мг вакцини в 1 мл розчинника):

11.1 Двом морським свинкам вводять вакцину під шкіру внутрішньої поверхні стегна (спостерігають за тваринами не менше 12 тижнів). Тварини повинні залишатися здоровими. Після закінчення терміну спостереження тварин усипляють. При макроскопічному і, при необхідності, мікроскопічному дослідженні внутрішніх органів не повинно бути ознак туберкульозної інфекції. При виявленні ознак туберкульозу серію бракують, випуск наступних серій вакцини припиняють, а всі наявні запаси вакцини зберігають до виявлення причин того, що сталося. При загибелі до закінчення терміну спостереження однієї морської свинки, якщо у неї немає ознак туберкульозної інфекції, випробування повторюють.

11.2 Шести морським свинкам вводять вакцину підшкірно чи внутрішньом'язово (спостерігають упродовж 6 тижнів), до кінця спостереження не менше 5 тварин мають залишитися живими. Після закінчення терміну спостереження тварин усипляють. При макроскопічному і, при необхідності, мікроскопічному дослідженні внутрішніх органів не повинно бути ознак туберкульозної інфекції. При виявленні ознак туберкульозу серію бракують, випуск наступних серій вакцини припиняють, а всі наявні запаси вакцини зберігають до виявлення причин того, що сталося. Тваринам, що загинули до кінця експерименту, проводять розтин і досліджують. При загибелі однієї морської свинки без ознак туберкульозу тест

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		81

вважається завершеним, а препарат специфічно безпечним. Якщо гине дві тварини – тест повторюють

12. Специфічна активність. Оцінюють за показником життєздатності - числу життєздатних клітин БЦЖ в 1 мг вакцини. Показник життєздатності вакцини БЦЖ знаходиться в межах 10-30 млн/мг.

13. Термостабільність. При зберіганні вакцини протягом 4 тижнів при температурі $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ число життєздатних мікробних клітин в 1,0 мг вакцини повинно складати не менше 25% від їх вихідного числа, яке визначають в зразках, що зберігалися при температурі від 2 до 8°C . Випробуванню підлягає кожна 5 серія препарату.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

ПМВ 14 Пакування, маркування та відвантаження готового продукту

Закупорені ампули пакують у картонні коробки по 5 штук із вкладенням інструкції, ножа ампульного та розчинника (ампула із 2 мл 0,9% ін'єкційного розчину хлориду натрію). Зберігання та транспортування повинно проходити виключно із дотриманням умов холодового ланцюга ($2 - 8^\circ\text{C}$). В одній ампулі, таким чином, міститься 1 мг ліофільно висушеної біомаси мікобактерій БЦЖ, що відповідає 20 дозам.

Контроль: Кт.

ЗВ 15 Знешкодження відходів

Всі рідкі, повітряні відходи та відпрацьовані матеріали з некондиційною продукцією повинні бути знешкоджені й доведені до нормативних показників перед скидом задля уникнення екологічної шкоди. Знешкодження відходів повинно проводитися в окремих приміщеннях, що не контактують із виробничою зоною з метою уникнення перехресної контамінації.

Контроль: Кт, Кх, Кмб.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		82

4.4 Матеріальний баланс

Для розрахунку необхідної кількості вакцини приймемо потребу на 2019 рік, яка складалася з:

- Новонароджених 2019 року – 310 605 осіб;
- Народжених 2012 року (семирічні) – 520 700 осіб;
- Народжених 2007 року (14-річні) – 472 567 осіб.

Враховуючи, що новонародженим вводять половину дози, то на рік необхідно виготовити доз:

$$(310\ 605:2) + 520\ 700 + 472\ 567 = 1\ 148\ 569,5$$

При цьому одна ампула препарату містить 1 мг ліофілізованої біомаси БЦЖ, що відповідає 20 дозам, кожна з яких по 0,05 мг в 0,1 мл розчинника. Показник життєздатності вакцини БЦЖ знаходиться в межах 10-30 млн/мг.

При розрахунку потреби у вакцині варто зважати на те, що, як показує практика, одна ампула із 20-ма дозами йде на вакцинування приблизно 10-ти дітей, тому потребу потрібно подвоїти:

$$1\ 148\ 569,5 \cdot 2 = 2\ 297\ 139 \approx 2\ 300\ 000$$

Отже, на рік треба виготовити 115 000 ампул із 20-ма дозами кожна, що відповідає 115 г ліофілізованої біомаси мікобактерій БЦЖ.

Розрахунок продуктивності одного циклу культивування здійснювався на основі даних, отриманих у дослідженнях, присвячених кінетиці росту мікобактерій БЦЖ [68, 161]. Виходячи з кінетики росту мікобактерій, теоретично за 7 днів культивування, можна отримати до 126,6 г біомаси (вміст біомаси вкінці культивування прийнято – 10,55 г/л.), що відповідає 126600 ампулам по 20 доз кожна.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		83

Отже, для задоволення річної потреби у вакцині достатньо одного чи двох (за врахування технологічних втрат продукту) виробничих циклів. В разі ж підвищення народжуваності чи наявності замовлень на експорт можна провести додаткові цикли, у відповідності із потребою.

Розрахунок маси ліофілізату здійснюється відповідно до формули (4.1):

$$G_2 = G_1 \cdot (100 - w_1)/(100 - w_2) \quad (4.1)$$

де G_1 – маса вологої речовини (г);

G_2 – маса сухої речовини (г);

w_1 – початкова вологість (%);

w_2 – кінцева вологість (%).

Маса води, що випарувалася визначається відповідно до формули (4.2):

$$W = G_1 - G_2 \quad (4.2)$$

де G_1 – маса вологої речовини (г);

G_2 – маса сухої речовини (г);

W – маса води, що випарувалася при сушці (г/г)

Матеріальний баланс виробництва вакцини БЦЖ розраховують на один цикл, що передбачає отримання серії з 21 040 упаковок (всього 105 200 ампул вакцини). В одній упаковці 5 комплектів вакцинного препарату. Один комплект складається із 1 ампули з ліофілізованою вакциною БЦЖ по 1 мг клітин мікобактерій у кожній (20 доз по 0,05 мг), а також 1 ампули з 2 мл розчину натрію хлориду 0,9%. Матеріальний баланс процесу по стадіях наведено в таблиці 4.2.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		84

Таблиця 4.2

Матеріальний баланс

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та витрат	Кількість		
	г	шт	л		г	шт	л
1	2	3	4	5	6	7	8
Стадія ДР 5							
Заліза амонійного цитрат	0,67			Поживне середовище Сотона для отримання посівного матеріалу			2,1
L-Аспарагін	30,24			Поживне середовище Сотона для виробничого культивування			10,01
Лимонна кислота	26,64			Розчинені компоненти ПС	71,69		
Магнію сульфат	13,3			Втрати:			
Калію гідрофосфат	6,7			Заліза амонійного цитрат	0,061		
Твін-80	1,33			L-Аспарагін	2,75		
Гліцерол			0,33	Лимонна кислота	2,42		
Дистильована вода			12,99	Магнію сульфат	1,21		
				Калію гідрофосфат	0,61		
				Твін-80	0,12		
				Гліцерол			0,03
				Дистильована вода			1,18
Всього:		92,2		Всього:		92,2	
Стадія ДР 6							
Глутамат натрію на відмивання	189			Розчин глутамат натрію 1,5% для відмивання			12
Глутамат натрію на кріопротекцію	1 690			Розчин глутамат натрію 1,5% для кріопротекції			107,6
				Розчинений глутамат натрію	1794		
Дистильована вода на відмивання			12,4	Втрати:			

Арк.

ДП 6104.00.000 ПЗ

85

Зм. Арк. № докум. Підпис Дата

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4	5	6	7	8
Дистильована вода на приготування розчину для кріопротекції			111,3	Розчину			4,1
				Глутамату натрію	85		
Всього:	2 002,7			Всього:	2 002,7		
Стадія ТП 7.1							
Поживне середовище Сотона для отримання посівного матеріалу в колбі на 300 мл			0,1	Інокулят			0,095
Колба Ерленмейєра на 300 мл		1		Забруднена колба Ерленмейєра на 300 мл		1	
Посівний матеріал із вакцинної ампули		1		Використана вакцинна ампула		1	
				Втрати			0,005
Всього:	2,1			Всього:	2,1		
Стадія ТП 7.2							
Поживне середовище Сотона для отримання посівного матеріалу в колбі на 500 мл			2	Інокулят			1,99
Посівний матеріал із колби на 300 мл			0,095	Колба Ерленмейєра на 500 мл		10	
Колба Ерленмейєра на 500 мл		10		Втрати			0,105
Всього:	12,095			Всього:	12,095		

Стадія ТП 8							
Поживне середовище Сотона для виробничого культиву-вання			10,01	Інокульоване поживне середовище Сотона			12
Інокулят із колб на 500 мл			1,99				
Всього:	12			Всього:	12		
Стадія ТП 9.1							
Культуральна рідина			12	Фільтрат			11,8
Біомаса	126,6			Сконцентрована біомаса	119,1		
				Залишки ПС			0,2
				Втрати по біомасі	7,5		
Всього:	138,6			Всього:	138,6		
Стадія ТП 9.2							
Сконцентрована біомаса із залишками ПС	119,1		0,2	Суспензія біомаси			12
Глутамат натрію 1,5%			12	Біомаса із залишками ПС, що перебуває у суспензії	112,6		0,2
				Втрати по біомасі	6,5		
Всього:	131,3			Всього:	131,3		
Стадія ТП 9.3							
Суспензія біомаси			12	Відмита сконцентрована біомаса	107,6		
Біомаса із залишками ПС, що перебуває у суспензії	112,6		0,2	Фільтрат			12,2
				Втрати біомаси	5		
Всього:	124,8			Всього:	124,8		
Стадія ТП 10							
Сконцентрована відмита біомаса	107,6			Гомогенізована суспензія			107,6
Натрію глутамату 1,5% розчин			107,6	Біомаса в суспензії	107,6		
Всього:	215,2			Всього:	215,2		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ		Арк.
							87

Стадія ТП 11							
Гомогенізована суспензія біомаси й кріо-протектора	107,6		107,6	Заповнені суспензією ампули		105 450	
Ампули 20-дозові		107 600		Розлита вакцина	105,45		105,45
				Невикористані ампули		2150	
				Втрати суспензії	2,15		2,15
Всього:		107 815,2		Всього:		107 815,2	
Стадія ТП 12							
Заповнені суспензією ампули		105 450		Заповнені ліофілізатом герметизовані ампули		105 450	
Волога біомаса	105,45			Суха біомаса	16,14		
				Вода, що випарувалася з клітин	89,31		
Всього:		105 555,45		Всього:		105 555,45	
Стадія ТП 13							
Заповнені ліофілізатом герметизовані ампули		105 450		Заповнені ліофілізатом герметизовані ампули		105 200	
				Втрати від руйнівного контролю та некондиційної продукції		250	
Всього:		105450		Всього:		105450	
Стадія ПМВ 14							
Заповнені ліофілізатом герметизовані ампули		105 200		Упаковані ампули		210 400	
Ампули із 2 мл розчинника 0,9% хлориду натрію		105 200		Упаковані інструкції		21 040	
Картонна упаковка		21 040		Упаковані ножі		21 040	
Інструкція		21 040		Готові упаковки		21 040	
Ніж ампульний		21 040					
Всього:		273 520		Всього:		273 520	

4.5. Контроль виробництва

Таблиця 4.3

Перелік контрольних точок

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Нормативна характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 1.1 Підготовка персоналу				
Кт1.1.1	Допоміжне електричне обладнання (праски, сушки тощо)	Технічний огляд, візуально.	Заміри опору ізоляції проводів та кабелів проводять не рідше 1 разу на 3 роки. Візуальний огляд між захисним провідником і електричним обладнанням проводять не рідше 1 разу на 6 місяців. Більша частота перевірок встановлюється виробником.	Має відповідати техпаспортним характеристикам
Кт 1.1.2		Шляхом проведення відповідного аналізу. Необхідні: патрон для відбору проб; фільтр АФА-ВП-10; гумовий шланг.		Із 10 см ² під дією потоку повітря в об'ємі 1 л виділяється не більше 40 частинок розміром ≥ 5 мкм
Кмб1.1	одяг, рукавички, руки персоналу.	Висів змивів на диференціально-селективні середовища	2 рази на тиждень	Має відповідати критерію «стерильність» (не більше 2 колоній із змиву).
Кх1.1.1	Концентрація аміачної води	Титрування 0,1 н розчином соляної кислоти або ареометрично за густиною і відомими довідковими даними	Щооперації	25% вихідний розчин, 0,5% - робочий.

<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>

ДП 6104.00.000 ПЗ

Арк.

89

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
Кх 1.1.2	Концентрація етанолу	Ареометрично або пікнометрично	Щооперації	96% вихідний розчин, 80% – робочий.
ДР 1.2 Підготовка миючих та дезінфікуючих розчинів			Щооперації	
Кх 1.2.1	Концентрація пероксиду водню	Титрування відібраної проби перманганатом калію із попереднім додаванням сірчаної кислоти	Щооперації	30% вихідний розчин, 3%, 4%, 6% – робочі
Кх 1.2.2	Концентрація етанолу	Ареометрично або пікнометрично	Щооперації	96% вихідний розчин 70%, 76%, 80% – робочі.
Кх 1.2.3	Концентрація розчину дезінфікуючого Гембар	Використання спеціалізованої системи для визначення концентрації полігексаметиленгуанідину «АКВАТОН-ТЕСТ»	Щооперації	25% вихідний розчин 0,2% , 0,5% 0,05% – робочі.
Кх 1.2.4	Концентрація аміачної води	Титрування 0,1 н розчином соляної кислоти або ареометрично за густиною і відомими довідковими даними	Щооперації	25% вихідний розчин, 0,5% - робочий.
Кмб 1.2	Мікробіологічна чистота розчинів, призначений для приміщень класу А і В.	Висів на диференціально-селективні середовища.	Щооперації	Мають бути стерильними
Кт 1.2.	Відмір компонентів для приготування розчинів	Мірний посуд, ваги, циліндри тощо.	Щооперації	Мають відповідати рецептурі. Приготування – за умови дотримання техніки безпеки.

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 1.3 Підготовка приміщень				
Кх1.3.1	Концентрація розчину пероксиду водню	Титрування відібраної проби перманганатом калію із попереднім додаванням сірчаної кислоти	Щооперації	3%, 4% або 6% (відповідно до потреби) робочий розчин
Кх1.3.2	Концентрація розчину дезінфікуючого Гембар	Використання спеціалізованої системи для визначення концентрації полігексаметиленгу анідину «АКВАТОН-ТЕСТ»	Щооперації	0,2% та 0,5% робочі розчини
Кх1.3.3	Концентрація етанолу	Ареометрично або пікнометрично	Щооперації	70% робочий розчин
Кмб 1.3.1	Мікробіологічна чистота поверхонь	Висів змивів із стерильного тампону	Не рідше 1 разу на тиждень	Відповідає критерію «стерильність» (не більше 2 колоній із змиву для приміщень класу А, В; не більше 5 колоній для приміщень класу С, Д)
Кмб 1.3.2	Мікробіологічна чистота повітря	За допомогою імпактора Кротова	Не рідше 2 разів на тиждень	А: <1 КУО/м ³ . В: <10 КУО/м ³ . С: <100 КУО/м ³ . Д: <200 КУО/м ³ .
Кт 1.3	Час витримки оброблених приміщень	Годинник	Щооперації	30-40хв та 45хв
ДР 1.4.1 Миття обладнання				
Кх 1.4.1.1	Концентрація розчину пероксиду водню	Титрування відібраної проби перманганатом калію із попереднім додаванням сірчаної кислоти	Щооперації	3% та 6% робочі розчини

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6104.00.000 ПЗ

Арк.

91

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
Кх 1.4.1.2	Концентрація розчину дезінфікуючого Гембар	Використання спеціалізованої системи для визначення концентрації полігексаметилену анідину «АКВАТОН-ТЕСТ»	Щооперації	0,05% робочий розчини
Кх 1.4.1.3	Концентрація етанолу	Ареометрично або пікнометрично	Щооперації	76% робочий розчин
Кт 1.4.1.1	Температура дезінфікуючих розчинів	Термометром, візуально	Щооперації	50-60°C
ДР 1.4.2 Ополіскування				
Кт 1.4.2	Справність і герметичність трубопроводу	Візуальний контроль, що проводиться шляхо зняття показів витратомірата тиску в трубопроводі.	Щооперації, безперервно.	Нема витоків у трубопроводі.
ДР 1.4.3 Перевірка на герметичність				
Кт 1.4.3.1	Тиск	Візуально, шляхом зняття показів манометра.	Щооперації	0,5-0,6 МПа
Кт 1.4.3.2	Час	За допомогою одинника.	Щооперації	30 хв
1.4.4 Промивання гарячою водою				
Кт 1.4.4.1	Температура води	Візуально, шляхом зняття показів термометра.	Щооперації	100°C,
Кт 1.4.4.2	Справність і герметичність трубопроводу	Спостережний контроль, що проводиться шляхо зняття показів витратомірата тиску в трубопроводі.	Щооперації, безперервно.	Нема витоків у трубопроводі.

<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>

ДП 6104.00.000 ПЗ

Арк.

92

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 1.4.5 Стерилізація обладнання				
Кт 1.4.5.1	Тиск	Візуально, шляхом зняття показів манометра	Щооперації	0,2 МПа
Кт 1.4.5.2	Температура	За використання термометру опору	Щооперації	125-130°C
Кт 1.4.5.3	Час	За допомогою годинника	Щооперації	1,5 год
Кмб 1.4.5	Мікробіологічна чистота, що характеризує ефективність стерилізації	За допомогою висіву змиву (наприклад конденсату, що утворюється в процесі) на диференціально-селективні середовища	Щооперації	Стерильно
ДР 1.4.6 Охолодження обладнання				
Кт 1.4.6.1	Час	За допомогою годинника	Щооперації	3,5 годин
Кт 1.4.6.2	Температура	За допомогою термометра	Щооперації	37-38°C
Кмб 1.4.6	Мікробіологічна чистота	За допомогою висіву змиву (наприклад конденсату, що утворюється в процесі) на диференціально-селективні середовища	Щооперації	Стерильно
ДР 2 Підготовка стерильного технологічного повітря				
Кт 2	Ефективність фільтру	Фотоелектричний принцип детекції частинок	Не рідше 2 разів на тиждень	70%, 90-99% та ≤99,99% відповідно
Кмб 2	Мікробіологічна чистота повітря	Седиментаційно		A: <1 КУО/м ³ . B: <10 КУО/м ³ . C: <100 КУО/м ³ . D: <200 КУО/м ³ .

<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>

ДП 6104.00.000 ПЗ

Арк.

93

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 3 Підготовка води				
Кт 3	Опис, рН, електропровідність	Візуально, рН- метр, кондуктометр	Щооперації	Відповідає: Специфікації Сп 5.14-01“Вода очищена “in bulk” ДФУ, ст.308 та Специфікації Сп 5.14-02 “Вода для ін’єкцій “in bulk ДФУ, 1 вид., доп.1, 2004, ст.307.
Кх 3	Випробування на чистоту: нітрати, алюміній, важкі метали, кальцій і магній	Хімічні методи аналізу	Щооперації	Відповідає: Специфікації Сп 5.14-01“Вода очищена “in bulk” ДФУ, ст.308 та Специфікації Сп 5.14-02 “Вода для ін’єкцій “in bulk ДФУ, 1 вид., доп.1, 2004, ст.307.
Кмб 3	Пірогенність або бактеріальні ендотоксини, мікробіологічна чистота.	Прямі висіви, LAL-тест.	Щооперації	Має витримувати
ДР 4.1 Відкриття ампул				
Кт 4.1	Температура	Термометром опору, візуально	Щооперації	Початкова температура: 560- 580°C; кінцева: 20- 25°C.
ДР 4.2 Миття ампул				
Кт 4.2	Температура	Термометром опору, візуально	Щооперації	60°C.

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
ДР 4.3 Сушка й стерилізація ампул				
Кт4.3	Температура	Термометром опору, візуально	Щооперації	Температура сушіння: 170°C; стерилізації: 300°C.
Кмб 4.3	Мікробіологічна чистота ампул після всіх підготовчих операцій	Занурення ампул у колбу із ПС	При підготовці кожної нової партії	Стерильні
ДР 5 Підготовка поживного середовища				
Кх 5	Концентрація компонентів ПС	Зважування необхідної кількості компонентів	Щооперації	Відповідно до рецептури
Кт 5.1	Температура автоклавування	Візуально, шляхом зняття показів із термометру опору	Щооперації	121 °С
Кт 5.2	Час автоклавування	Годинник	Щооперації	20-30 хвилин
Кт 5.3	Тиск	Манометр	Щооперації	0,1МПа.
Кт 5.4	Кінцеве значення рН ПС при 25°	Перевірка рН-метром при відборі проби.	Щооперації	7,2±0,2
Кмб 5	Мікробіологічна чистота	Висів відібраної проби на диференціально-селективне середовище	Щооперації	Стерильно
ДР 6 Підготовка захисного середовища				
Кх 6	Концентрація розчину	Зважування необхідної кількості	Щооперації	1,5%
Кт 6.1	Температура автоклавування	Візуально, шляхом зняття показів із термометру опору	Щооперації	121 °С
Кт 6.2	Час автоклавування	Годинник	Щооперації	30 хвилин
Кт 6.3	Тиск	Манометр	Щооперації	0,1МПа.

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
Кмб 6	Мікробіологічна чистота	Висів відібраної проби на диференціально-селективне середовище	Щооперації	Стерильно
ТП 7 Отримання посівного матеріалу				
Кт 7.1	Об'єм ПС в колбі	Візуально	Щооперації	100 мл ПС та 200 мл
Кт 7.2	Частота обертання шейкера	Перевірка візуально, встановлюють необхідний режим	Щооперації	198 об/хв
Кт 7.3	Час культивування	Годинник, календар	Щооперації	13-14 діб для колб на 300 мл та 8 діб для колб на 500 мл.
Кт 7.4	Температура культивування	Термометр	Щооперації	37±0,5°C
Кт 7.5	Кислотність	pH-метром	Щооперації	pH 7 – 7,2
Кмб 7.1	Мікробіологічна чистота	Висів проб на диференціально-селективні середовища, підрахунок колоній на середовищі Лавенштейна-Йенсена мікроскопія культури по Цілю-Нільсону.	Щооперації	Нема сторонньої мікрофлори, мікобактерії мають типову форму при мікрокопіюванні.
ТП 8 Виробниче культивування				
Кт 8.1	Об'єм свіжого ПС	Візуально по рівнеміру	Щооперації	12 л
Кт 8.2	Частота обертання мішалки	Встановлюють необхідний режим	Щооперації	840 об/хв
Кт 8.3	Час культивування	Годинник, календар	Щооперації	6 діб
Кт 8.4	Температура культивування	Термометр	Щооперації	37±0,5°C
Кт 8.5	Кислотність	pH-метром	Щооперації	pH 7 – 7,2

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
Кмб 8	Мікробіологічна чистота	Висів проб на диференціальн о-селективні середовища, підрахунок колоній на середовищі Лавенштейна-Йенсена мікроскопія культури по Цілю-Нільсону.	Щооперації	Нема сторонньої мікрофлори, мікобактерії мають типову форму при мікрокопіюванні.
Кх 8.1	вміст кисню у середовищі	DO-метр;	Щоденно	Від 70% розчиненого в середовищі кисню на початку до 10-15% вкінці.
Кх 8.2	вміст гліцерину;	Хроматографіч но	Щоденно	Спостеріга-ється динаміка споживання
Кх 8.3	Визначення загального вмісту азоту по К'ельдалю відібраної проби.	вміст азотистих речовин;	Щоденно	Спостеріга-ється динаміка споживання
ТП 9.1 Фільтрування біомаси				
Кт 9.1	Тиск	Манометром, візуально	Щооперації	0,4 МПа
Кмб 9.1	Мікробіологічна чистота	Відбір проби із наступним її висівом	Щооперації	Нема сторонньої мікрофлори, мікобактерії мають типову форму при мікрокопіюванні.
ТП 9.2 Відмивання біомаси				
Кт 9.2	Частота обертання мішалки	Встановлення необхідного режиму	Щооперації	840 об/хв

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
Кх 9.2	Концентрація розчину глутамату натрію	Шляхом точного дозування глутамату натрію моногідрату	Щооперації	1,5%
Кмб 9.2	Мікробіологічна чистота	Відбір проби із наступним її висівом	Щооперації	Нема сторонньої мікрофлори, мікобактерії мають типову форму при мікрокопіюванні .
ТП 9.3 Фільтрування біомаси				
Кт 9.3	Тиск	Манометром, візуально	Щооперації	0,4 МПа
Кх 9.3	Контроль наявності залишків ПС, зокрема гліцерину.	Проведення якісного, та за необхідності – кількісного аналізу.	Щооперації	Відсутність залишків ПС.
Кмб 9.3	Мікробіологічна чистота	Відбір проби із наступним її висівом	Щооперації	Нема сторонньої мікрофлори, мікобактерії мають типову форму при мікрокопіюванні .
ТП 10 Гомогенізація культури БЦЖ із кріо-протектором				
Кт 10.1	Частота обертання мішалки	Встановлення необхідного режиму	Щооперації	840 об/хв
Кт 10.2	Концентрація суспензії	Фотометрично	Щооперації	1 мг біомаси на 1 мл
Кх 10	Концентрація розчину глутамату натрію	Шляхом точного дозування глутамату натрію моногідрату	Щооперації	1,5%

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
Кмб 10	Мікробіологічна чистота	Відбір проби із наступним її висівом	Щооперації	Нема сторонньої мікрофлори, мікобактерії мають типову форму при мікрокопіюванні
ТП 11 Розлив вакцини у первинну упаковку				
Кт 11	Об'єм вакцини, що розливається	Налаштування дозувальних пристроїв	Щооперації	1 мл
ТП 12.1 Заморожування вакцини				
Кт 12.1.1	Час	Годинник	Щооперації	24 години
Кт 12.1.2	Температура	Термометр	Щооперації	-60 до -70°C
ТП 12.2 Первинне висушування				
Кт 12.2.2.1	Температура	Термометр	Щооперації	0°C
Кт 12.2.2	Тиск	Вакуумметр	Щооперації	4 Па
ТП 12.3 Вторинне висушування				
Кт 12.3	Температура препарату	Термометр	Щооперації	25-40°C
ТП 13 Контроль БЦЖ-вакцини				
Кт 13	Опис, справжність, час відновлення препарату, прозорість і кольоровість розчину, дисперсність, втрата в масі при висушуванні або Вода, герметичність.	Візуально та за допомогою фізико-хімічних методів аналізу.	При отриманні готової партії, щооперації	Відповідно до ФС.3.3.1.0018.15 «Вакцина туберкулезная БЦЖ живая»

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6104.00.000 ПЗ

Арк.

99

Продовження таблиці 4.3

1	2	3	4	5
Кх 13	Аномальна токсичність	Дослідження над лабораторним и тваринами (морські свинки)	При отриманні готової партії, щооперації	Відповідно до ФС.3.3.1.0018.15 «Вакцина туберкулезная БЦЖ живая», має витримувати випробування
Кмб13	Загальний вміст бактерій, відсутність сторонніх бактерій і грибів, специфічна безпека, специфічна активність, термостабільність	Прямі висіви, дослідження над лабораторним и тваринами (морські свинки)	При отриманні готової партії, щооперації	Відповідно до ФС.3.3.1.0018.15 «Вакцина туберкулезная БЦЖ живая», має витримувати випробування
ПМВ 14 Пакування, маркування та відвантаження готового продукту				
Кт 14	Цілісність упаковок та комплектуючих матеріалів	Візуально	Щооперації	Мають бути без пошкоджень

РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ
ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Сушіння – це процес видалення вологи із матеріалу за використання теплової енергії та відводу парів, що при цьому утворюються. Сушіння є дифузійним процесом, так як перехід вологи з матеріалу в навколишнє середовище здійснюється при поверхневому випаровуванні вологи і її дифузії із внутрішніх шарів до поверхневих [162].

Конструкції сушарок різноманітні і класифікуються за рядом ознак [163]:

1. За способом організації процесу:
 - 1.1 Періодичні;
 - 1.2 Безперервні;
2. За напрямком руху теплоносія щодо матеріалу:
 - 2.1 Прямоточні;
 - 2.2 Протиточні;
 - 2.3 З перехресним потоком.
3. За величиною тиску в робочому просторі:
 - 3.1 Атмосферні;
 - 3.2 Вакуумні;
 - 3.3 Під надлишковим тиском.
4. За видом теплоносія, що використовується:
 - 4.1 Повітряні;
 - 4.2 На димових або інертних газах;
 - 4.3 На насиченій або перегрітій парі;

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Разрабидв</i>		<i>Байко Т.Ю.</i>			<i>РОЗДІЛ 5 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ</i>	<i>Стадія</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Д</i>	<i>101</i>	<i>142</i>
<i>Керівник</i>		<i>Орядінська Л.Б.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ</i>		
<i>Затвер.</i>								

4.4 На рідких теплоносіях.

5. За способом підводу тепла до матеріалу, що висушується, розрізняють наступні види сушіння [164]:

5.1 Конвективне – шляхом безпосереднього контакту матеріалу й сушильного агенту.

5.2 Контактне – за рахунок передачі тепла від теплоносія до матеріалу через стінку, що їх розділяє.

5.3 Спеціальне

5.3.1 Радіаційне – шляхом передачі тепла інфрачервоними променями.

5.3.2 Діелектричне – шляхом нагрівання у полі токів високої частоти.

5.3.3 Сублімаційне – сушіння в замороженому стані при глибокому вакуумі.

Висушування біоматеріалу повинно здійснюватися за умов, що мінімізують його руйнування, втрату біологічної цінності та забруднення. Так, наприклад, при виробництві БЦЖ вакцини важливим є збереження максимальної кількості живих бактерій (колонієутворюючих одиниць) та забезпечення стерильності препарату (відсутність будь-якої мікрофлори, окрім мікобактерій вакцинного штаму). Задовольняє ці вимоги тільки сублімаційне (ліофільне) сушіння, яке і використовується традиційно для виготовлення даної вакцини.

Процес проходить при температурі й тиску нижчих криогідратної (евтектичної) точки, при якій відбувається заморожування вологи, що знаходиться у матеріалі. При цьому молекули води переходять з твердого стану безпосередньо в пару, минаючи рідку фазу, що і являє собою процес сублімації. Парціальний тиск пари в камері повинен бути меншим, ніж тиск насиченої пари у потрібній точці, інакше ж – сублімація не проходитиме. В процесі ліофільної сушки виділяють 3 періоди: заморожування, сублімацію та період видалення залишкової вологи [165].

Заморожування (самозаморожування) вологи: продукт в результаті інтенсивного випаровування вологи охолоджується до стану заморожування

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		102

рідини в матеріалі. Процес іде в камері сублиматора із якої відводиться парогазова суміш із пониженням тиску від атмосферного до тиску, що забезпечує задану температуру матеріалу (температуру сублимації). Для більшості матеріалів температура замерзання, при якій відбувається сублимація, становить від -5 до -18°C . Тривалість періоду залежить від теплофізичних і хімічних властивостей продукту, його розмірів та форми, початкової температури і вологості, швидкості відводу парів та величини створюваного вакууму. В процесі постійно відбувається пониження тиску і температури. Тому і коефіцієнти тепло- і масообміну безперервно змінюються. Єдиної думки відносно тривалості заморожування нема. Оптимальні параметри як самозаморожування, так і решти періодів сушки визначають експериментально для кожного конкретного об'єкту [165].

Сублимація: характеризується незначною зміною температури замороженого матеріалу. Швидкість сушіння при цьому є практично сталою величиною. На даній стадії важливо підтримувати сталу температуру сублимації (близьку до температури криогідратної точки). Сталість температури досягається за рахунок зміни інтенсивності теплопідводу (температури теплоносія) при заданих значеннях вакууму і температурі конденсації. Процес триває до тих пір, поки температура всередині матеріалу не досягне значення, близького до нуля. В період сублимації видаляється основна частка вологи (40 - 60% і більше). Інтенсивність випаровування здебільшого залежить від інтенсивності теплопідводу до матеріалу, швидкості відводу вологи, що випаровується, загального тиску в сублиматорі, парціального тиску парів в суміші та фізико-хімічних властивостей матеріалу [165].

Період випаровування залишкової незамороженої (адсорбційно зв'язаної) вологи: характеризується падінням швидкості сушіння і підвищенням температури матеріалу від приблизно нульової до температури навколишнього середовища. Тривалість головним чином залежить від глибини вакууму, швидкості відводу вологи й інтенсивності підводу теплової

						ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			103

енергії. В даний період перенесення вологи всередині матеріалу відбувається здебільшого у вигляді молекулярного потоку пари (ефузія пари). В такому випадку середня довжина вільного пробігу молекул значно більша діаметру капілярів. На відміну від дифузійного перенесення потенціалом переносу пари є не парціальний тиск, а його відношення до кореню квадратного з абсолютної температури. Процес ліофільної сушки вважається практично завершеним, коли температура матеріалу наближається до температури навколишнього середовища [165].

Варто зауважити, що важливим фактором перед заморожуванням мікробіологічних препаратів є їх попереднє змішування із кріопротектором для захисту біологічних агентів від руйнування кристаликами льоду, що утворюються при заморожуванні. При виробництві БЦЖ кріопротектором є розчин глутамату натрію моногідрату 1,5%. Результатом сушіння вакцинного препарату БЦЖ є суха біомаса мікобактерій БЦЖ із вмістом вологи 1 – 4% [13]. Після ліофілізації ампули в асептичних умовах запаюють під вакуумом.

Таким чином, в основі процесу ліофілізації лежить зниження температури фазового переходу води за рахунок створення вакууму.

До основних переваг сушарок даного типу належать [13]:

1. Максимальне збереження біологічного матеріалу (живих клітин);
2. Проведення процесу в умовах асептики (герметичність);
3. Висушування відбувається одразу в первинній упаковці (в ампулах) із точним дозуванням.

Недоліками даної конструкції є: 1) висока вартість (як самої сушарки так і загалом процесу, внаслідок його енергоємності); 2) технологічна складність процесу (три окремих стадії в межах одного процесу, кожна з яких характеризується своїми параметрами); 3) необхідність науково-дослідного підходу щодо підбирання оптимальних параметрів проведення процесу, а це у свою чергу у свою чергу потребує часу та додаткового капіталу.

										Арк.
										104
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ					

Не зважаючи на значну капітало- та наукоємність, застосування ліофільних сушарок є єдиним науково-обґрунтованим способом сушіння вакцинних препаратів, що забезпечує необхідну якість готового продукту.

Також варто зауважити, що існують моделі ліофілізаторів як для харчової промисловості, так і моделі призначені для використання у фармацевтичному виробництві. Основною відмінністю є те, що апарати фармпризначення оптимізовані для асептичного виробництва: мають системи миття та стерилізації на місці CIP/SIP; мають додаткові функції для укупорювання флаконів (безпосередньо в камері сублиматора) та ампул (колектор з відведеннями для запаювання ампул у вакуумі), їх автоматичного завантаження/вивантаження; мають високу точність регулювання температури (похибка $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$). Матеріал основних структурних елементів таких сушарок – неіржавіюча сталь (AISI 316, AISI 304).

При виборі сушарки для препарату розлитого в ампули (флакони) необхідно звертати увагу на місткість конденсатора (скільки він може втримати льоду за цикл роботи), а також площу поверхні, що обігривається (з однієї сторони необхідно враховувати кількість теплової енергії для забезпечення процесу сушіння, з іншої – простір для розміщення ампул), що визначається площею та загальною кількістю полиць, розташованих у сублиматорі.

В якості теплоносія у ліофільних сушарках здебільшого використовують силіконове масло (поліметилсилоксанова рідина), так як воно характеризується рядом переваг [166]: великий діапазон робочих температур – від -50°C (деякі -120°C) до $200-250^{\circ}\text{C}$; температура загорання не нижче $+275^{\circ}\text{C}$; малий коефіцієнт в'язкості у всьому діапазоні температур; відсутність запаху; прозорість; стабільність; низький тиск насиченої пари (в тому числі і при підвищених температурах); пожегобезпечність (горить лише при дії зовнішнього джерела тепла, при цьому кількість тепла, що виділяється при горінні, в десятки разів нижча, аніж при горінні мінеральних

										Арк.
										105
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ					

чи синтетичних теплоносіїв); не є токсичним, не входить до групи небезпечних речовин і є повністю безпечним для екології.

5.2. Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

5.2.1 Принцип роботи ліофільної сушарки

Ліофільні сушарки бувають періодичної та безперервної дії. Принципова схема ліофільної сушарки періодичної дії наведена на рисунку 5.1 [167].

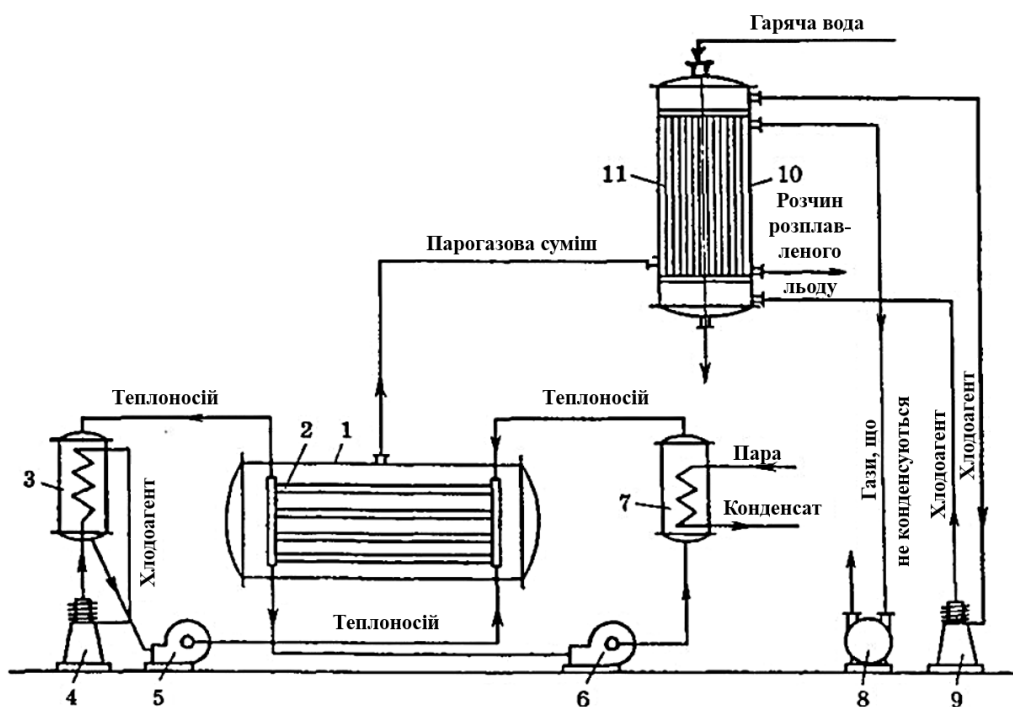


Рис. 5.1 Принципова схема сублімаційної установки періодичної дії [167]

1 – субліматор; 2 – полицки; 3 – теплообмінник для охолодження теплоносія; 4 – холодильна установка; 5, 6 – насоси; 7 – теплообмінник для підігріву теплоносія; 8 – вакуум-насос; 9 – холодильна установка; 10 – конденсатор-десубліматор; 11 – теплообмінні труби десубліматора.

Ця установка складається із циліндричної закритої сушильної камери (субліматора) 1 із розміщеною у ній етажеркою порожнистих полицок 2, на які завантажуються матеріал, який необхідно висушити. Субліматор працює періодично спочатку як охолоджувальна камера (щоб заморозити матеріал,

						ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			106

який поступив на сушку), а потім – як сушильна. При режимі охолодження в середину полицок 2 насосом 5 подають охолоджувальний агент. Охолодження теплоносія відбувається у теплообмінному апараті 3, який оснащений змішувачем, по якому проходить холодоагент, що поступає із холодильної установки 4. Коли сублиматор працює в режимі сушарки, теплоносії, який підігрівається у теплообміннику 7, подається у полицки за допомогою насоса 6.

Конденсація парів, які утворюються при сушінні в сублиматорі, відбувається у конденсаторів-десублиматорі 10. Він собою являє теплообмінник у міжтрубний простір якого поступає парогазова суміш із сублиматора. По трубах 11 десублиматора проходить холодоагент (аміак, фреон), який подається із холодильної установки 9.

Гази, які не конденсуються видаляються із сублиматора вакуум-насосом 8. Сконденсовані пари осаджуються у вигляді шару льоду на поверхні охолоджувальних труб десублиматора. Так як у процесі роботи десублиматора труби 11 покриваються значним шаром льоду, то його періодично розморозжують, розплавляючи лід шляхом подачі в труби 11 гарячої води. Сушарка безперервної дії має два сублиматора і два десублиматора, які працюють позмінно [166].

5.2.2 Вибір технологічних параметрів процесу та розрахунок

Для розрахунку сублимаційної установки, приймемо наступні вихідні дані (спираючись на літературні дані та матеріальний баланс):

1. Задана продуктивність по вологому продукту: $G_1 = 105,2842 \text{ кг/цикл}$;
2. Вологість продукту (%):
 - Початкова: $W_1 = 10,080\%$
 - Кінцева $W_2 = 2,5\%$
3. Загальна тривалість сушки: $\tau_{заг} = 44 \text{ год}$;
4. Тривалість окремих періодів сушки та волога, що видаляється

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		107

- Самозаморожування: $\tau_c = 24 \text{ год}$; $\hat{W}_c = 15 \%$
 - Сублімація: $\tau_{\text{субл}} = 18 \text{ год}$; $\hat{W}_{\text{субл}} = 75\%$
 - Видалення залишкової вологи: $\tau_{\text{зал}} = 2 \text{ год}$; $\hat{W}_{\text{зал}} = 10\%$
5. Температура сублімації $\theta_{\text{субл}} = -10 - (-12)^\circ\text{C}$.
6. Температура поверхні плит, що обігріваються $t_l = 40^\circ\text{C}$.

5.2.2.1 Розрахунок субліматора

Кількість вологи, що випаровується в субліматор за один цикл роботи буде дорівнювати різниці між початковою масою вологого продукту і кількістю залишкової вологи, що залишається в клітинах після ліофілізації. Отже за один цикл сушки випарується загалом вологи:

$$W = G_1 - G_{\text{бм}} \cdot 0,025 = 105284,16 - 105,2 \cdot 0,025 = 105281,53 \text{ г} \approx 105,282 \text{ кг}$$

З а 1 годину:

$$W' = \frac{W}{\tau_{\text{заг}}} = \frac{105,282}{44} = 2,3927 \text{ кг/год};$$

Продуктивність установки по вологому продукту за годину:

$$G_1' = \frac{G_1}{\tau_{\text{заг}}} = \frac{105,2842}{44} = 2,393 \text{ кг/год};$$

По сухому продукту:

$$G_2' = \frac{G_1 - W}{\tau_{\text{заг}}} = \frac{105,2842 - 105,28153}{44} = 0,0000598 \text{ кг/год} \approx 0,06 \text{ г/год};$$

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
						108
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Кількість вологи, що видаляється в період самозаморожування:

$$W_c = \frac{W \cdot \hat{W}_c}{100\%} = \frac{105,28156 \cdot 15}{100} = 15,8 \text{ кг/цикл}$$

За 1 годину:

$$W'_c = \frac{W_c}{\tau_c} = \frac{15,8}{24} = 0,66 \text{ кг/год};$$

В період сублімації:

$$W_{\text{субл}} = \frac{W \cdot \hat{W}_{\text{субл}}}{100\%} = \frac{105,282 \cdot 75}{100} = 78,96 \approx 79 \text{ кг/цикл}$$

За 1 годину:

$$W'_{\text{субл}} = \frac{W_{\text{субл}}}{\tau_{\text{субл}}} = \frac{79}{18} = 4,4 \text{ кг/год};$$

В період випаровування залишкової вологи:

$$W_{\text{зал}} = \frac{W \cdot \hat{W}_{\text{зал}}}{100\%} = \frac{105,282 \cdot 10}{100} = 10,53 \text{ кг/цикл}$$

За 1 годину:

$$W'_{\text{зал}} = \frac{W_{\text{зал}}}{\tau_{\text{зал}}} = \frac{10,53}{2} = 5,27 \text{ кг/год};$$

Витрата теплової енергії в період сублімації:

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		109

$$Q_2 = W_{\text{субл}} r_2 = 79 \cdot 2880 = 227520 \text{ кДж / цикл}$$

де r_2 – питома теплота випаровування при сублімації, яка становить при -10°C близько 2880 кДж/кг [165].

За одиницю часу (за секунду):

$$Q'_2 = \frac{W'_{\text{субл}} r_2}{3600} = \frac{4,4 \cdot 2880}{3600} = 3,52 \text{ кВт}$$

Витрата теплової енергії в період видалення залишкової вологи:

$$Q_3 = W_{\text{зал}} r_3 + c_{\text{бм}} (G_1 - W)(\theta_2 - \theta) = 10,53 \cdot 2476 + 1,74(105,284 - 105,282) \cdot (35 - (-10)) = 26072,44 \text{ кДж / цикл}$$

де r_3 – питома теплота випаровування при видаленні залишкової вологи, що становить 2476 кДж/кг [165].

θ_2 – температура висушеного продукту, $\approx 35^\circ\text{C}$

$c_{\text{бм}}$ – теплоємність висушеної біомаси, яка наближено розраховується [165]:

$$c_{\text{бм}} = 1675 + 25,1W_2 = 1675 + 25,2 \cdot 2,5 = 1738 \text{ Дж / кг} \cdot \text{K} = 1,74 \text{ кДж / (кг} \cdot \text{K)}$$

Витрата теплової енергії в період видалення залишкової вологи за одиницю часу (за секунду) тоді дорівнює:

$$Q'_3 = \frac{Q_3}{3600 \cdot \tau_{\text{зал}}} = \frac{26072,44}{3600 \cdot 2} = 3,62 \text{ кВт}$$

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
						110
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Загальна кількість тепла, необхідного для проведення циклу сушки, є сумою теплової енергії необхідної для проведення сублімації та теплової енергії, необхідної для періоду видалення залишкової вологи і становить:

$$Q = Q_2 + Q_3 = 227520 + 26072,44 = 253592,44 \text{ кДж/цикл}$$

Тоді для отримання 1 кг вологи, необхідно теплової енергії :

$$q = \frac{Q}{G_1} = \frac{253592,44}{105,284} = 2350,61 \text{ кДж/кг вологи}$$

Так як $Q_2 > Q_3$, розрахунок поверхні нагріву субліматора доцільно проводити за Q_2 .

Теплова потужність нагрівачів субліматора:

$$Q_n = kQ'_2 = 1,2 \cdot 3,52 = 4,224 \text{ кВт}$$

де k – коефіцієнт, що враховує передачу тепла до матеріалу конвективним способом (приймають 1,2 – 1,25) [164, 165].

Приймаємо, що площа поверхні, що обігривається (загальна площа полицок) дорівнює площі, на яку кладемо продукт. Тоді приведена ступінь чорноти буде дорівнювати:

$$\varepsilon_{\text{прив}} = \frac{1}{\frac{1}{\varepsilon_1} + \frac{1}{\varepsilon_2} - 1} = \frac{1}{\frac{1}{0,95} + \frac{1}{0,9} - 1} = 0,86$$

де ε_1 – ступінь чорноти поверхонь полиць (0,95) [164, 165];

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		111

ε_2 – наближена ступінь чорноти продукту (0,9) [164, 165].

Тоді необхідна площа, що обігрівається буде становити:

$$S_1 = \frac{Q_n}{k\varepsilon_{прив} C_0 \left[\left(\frac{T_1}{100} \right)^4 - \left(\frac{T_2}{100} \right)^4 \right]} =$$
$$= \frac{4,224}{1,2 \cdot 0,86 \cdot 4,9 \cdot 10^{-3} \left[\left(\frac{273+40}{100} \right)^4 - \left(\frac{273-10}{100} \right)^4 \right]} = 17,35 \text{ м}^2$$

де, C_0 – коефіцієнт випромінювання абсолютно чорного тіла – $4,9 \cdot 10^{-3} \text{ кДж}/(\text{м}^2 \cdot \text{с} \cdot \text{K}^4)$ [165];

T_1 – температура гріючої поверхні у Кельвінах;

T_2 – температура матеріалу у Кельвінах.

k – коефіцієнт, що враховує передачу тепла до матеріалу конвективним способом (приймають 1,2 – 1,25) [164, 165].

Маса вологого продукту, що завантажується на 1 м^2 площі:

$$m = \frac{G_1}{S_1} = \frac{105,284}{17,35} = 6,1 \text{ кг}$$

Тобто шар продукту становитиме близько 6,1 мм. Однак варто враховувати не лише препарат (продукт), але й площу і масу ампул, що використовуються. Спираючись на реальні габаритні розміри та конструкції, що пропонують виробники, для ефективного процесу сушіння площа, яка потрібна, наприклад для 105000 флаконів із діаметром 16 мм становить $24,59 \text{ м}^2$ (на прикладі апарату *Lyopharma 25*). Ампули, що використовуються у даній дипломній роботі, мають діаметр $14,75 \pm 0,15 \text{ мм}$, а їх загальна кількість

										Арк.
										112
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата						

ДП 6104.00.000 ПЗ

становить 105200 штук. Мінімальна необхідна площа, щоб їх завантажити становить 23,67 м². Тому площі 24,59 м² повинно повністю вистачити для проведення циклу сушки.

Для обігріву плит використовують силіконове масло. Тому необхідно розрахувати його витрату, яка становитиме:

$$G_{\text{мелл}} = \frac{Q_n}{c_{\text{мелл}} \cdot \Delta t} = \frac{4,224}{2,07 \cdot 1,32} = 1,55 \text{ кг/с}$$

де Δt – різниця між температурою теплоносія на вході та на виході (для води прийнято брати 5, але теплопровідність у води приблизно у 3,8 раза більша, ніж теплопровідність силіконового масла, тому температурний перепад буде менший).

5.2.2.2 Розрахунок конденсатора

Так як основна кількість вологи випаровується при сублімації (як в сумарному об'ємі, так і за одиницю часу), то розрахунок буде іти за період саме сублімації. Таким чином, кількість тепла, що забирається конденсатором, буде визначатися наступним чином::

$$\begin{aligned} Q_{\text{конд}} &= \frac{W'_{\text{субл}}}{3600} (r + r_l) + \frac{W'_{\text{субл}} c_n}{3600} (t_n - t_l) = \\ &= \frac{4,4}{3600} (2500 + 334) + \frac{4,4 \cdot 1,7}{3600} (15 - (-20)) = 3,54 \text{ кВт} \end{aligned}$$

де, r_l – питома теплота плавлення льоду (334 кДж/кг) [168];

r – питома теплота конденсації вологи (2500 кДж/кг) [169];

t_n – температура парогазового середовища, що поступає у конденсатор (15°C);

t_l – температура льоду, що утворюється на стінках трубок (-20°C)

										Арк.
										113
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	ДП 6104.00.000 ПЗ					

c'' – теплоємність пари при 1,5 мм рт. ст. (1,7 кДж/(кг·К))

В конденсатор поступає вологи:

$$W''_{\text{субл}} = \frac{W'_{\text{субл}}}{n} = \frac{4,4}{1} = 4,4 \text{ кг/год}$$

де, n – кількість конденсаторів-десубліматорів у сублимаційній установці.

Теплове навантаження на конденсатор:

$$Q'_{\text{конд}} = \frac{3,54}{1} = 3,54 \text{ кВт}$$

Коефіцієнт теплообміну від стінок до хлороагенту, що випаровується (фреону-22) визначається за формулою:

$$\alpha_1 = 1,16 A q^{0,6} = 1,16 \cdot 6 \cdot 104,4^{0,6} = 113,2 \text{ Вт/(м}^2 \cdot \text{К)}$$

де Коефіцієнт A – для фреону-22 становить 6.

q – питомий тепловий потік, що визначається як тепла енергія, що припадає на одиницю площі за одиницю часу:

$$q = \frac{Q'_{\text{конд}}}{S_{\text{конд}}} = \frac{3,54}{30} = 0,12 \text{ кДж/м}^2 \cdot \text{с} = 104,4 \text{ ккал/(м}^2 \cdot \text{год)}$$

Коефіцієнт тепловіддачі від пари, що конденсується, до льодової поверхні:

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		114

$$\alpha_2 = \frac{3,2\lambda q' \left(\frac{T_n - T_n}{T_n} \right)^{-1,1}}{\mu} =$$

$$= \frac{3,2 \cdot 0,023 \cdot 0,41 \cdot 10^{-4} \left(\frac{260 - 253}{260} \right)^{-1,1}}{1,18 \cdot 10^{-5}} = 13,64 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К})$$

де T_n – температура насиченої пари, що конденсується, при тиску 1,5 мм рт. ст. у Кельвінах ($273 - 13 = 260 \text{ К}$).

λ – коефіцієнт теплопровідності парогазової суміші, $0,023 \text{ Вт}/\text{м}\cdot\text{К}$ [165]

μ – коефіцієнт динамічної в'язкості пари, $1,18 \cdot 10^{-5} \text{ Па}\cdot\text{с}$ [165];

T_n – температура льоду у Кельвінах ($273 - 20 = 253 \text{ К}$)

q' – становить відповідно до формули:

$$q' = \frac{W'_{\text{субл}}}{3600 n S_{\text{конд}}} = \frac{4,4}{3600 \cdot 1 \cdot 30} = 0,41 \cdot 10^{-4} \text{ кг}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$$

де $S_{\text{конд}}$ – прийнята приблизна площа конденсатора (30 м^2).

Тоді коефіцієнт теплопередачі становитиме:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_1} + \frac{\delta_{\text{ст}}}{\lambda_{\text{ст}}} + \frac{\delta_n}{\lambda_n} + \frac{1}{\alpha_2}} =$$

$$= \frac{1}{\frac{1}{113,2} + \frac{0,003}{45,4} + \frac{0,006}{2,3} + \frac{1}{13,64}} = 11,789 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К})$$

де $\delta_{\text{ст}}$ – товщина стінки ($0,003 \text{ м}$) [165];

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		115

λ_{cm} – коефіцієнт теплопровідності матеріалу трубок (стінки) конденсатора (45,4 Вт/(м·К)) [165];

λ_l – коефіцієнт теплопровідності льоду (2,3 Вт/(м·К)) [170];

δ_l – максимальна товщина намороженого льоду (0,006 м).

Площа поверхні конденсатора тоді становитиме:

$$S_{\text{конд}} = \frac{1000(Q'_{\text{конд}} + Q_{\text{ном}})}{K\Delta t} = \frac{1000(3,54 + 0,05 \cdot 3,54)}{11,789 \cdot 12} = 26,28 \text{ м}^2$$

де $Q_{\text{ном}}$ – тепловий потік із навколишнього середовища (приймаємо 5% від теплового навантаження);

Δt – різниця між температурою насиченої пари, що конденсується та температурою хладагенту (фреону), що випаровується:

$$\Delta t = t_n - t_{xl} = -13 - (-25) = 12^\circ\text{C}$$

де t_n – температура насиченої пари, що конденсується (-13°C при 1,5 мм рт. ст.)

t_{xl} – температура хладагенту, що випаровується;

Таким чином, площа у 30 м², прийнята для розрахунків, забезпечить необхідний відвід тепла та вологи.

Максимальна маса намороженого льоду, яку можна наморозити за період в одному конденсаторі тоді буде дорівнювати:

$$M_l = S_m \delta_l \rho_l = 30 \cdot 0,006 \cdot 920 = 165,6 \text{ кг}$$

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		116

де S_m – поверхня трубок конденсатора покритих льодом (приймали 30 м², розрахункове значення 26,28. Тому, приймаємо із запасом – 30 м²);
 ρ_l – густина льоду (920 кг/м³) [170];
 δ_l – максимальна товщина намороженого льоду (0,006 м).

Отримане значення більше, ніж маса води (а відповідно, з урахуванням густини, і маси льоду), яка повинна випаруватися за цикл роботи установки. Отже продуктивності конденсатора повністю вистачить для забезпечення ефективного перебігу процесу.

Кількість теплової енергії, яка необхідна для відтаювання льоду в конденсаторі становитиме:

$$Q_{\text{від}} = M_l r_l + M_l c_l (t_p - t_l) + M_m c_m (\theta'' - \theta') =$$

$$= 165,6 \cdot 334 + 165,6 \cdot 2,14(5 - (-20)) + 1500 \cdot 0,46(10 - (-20)) = 84870 \text{ кДж}$$

де M_l – маса намороженого льоду, кг;
 M_m – маса трубчатої частини конденсатора, кг;
 r_l – теплота плавлення льоду, 334 кДж/кг [165, 170];
 c_l – теплоємність льоду, 2,14 кДж/(кг·К) [165, 170];
 t_p – кінцева температура конденсату, °С;
 t_l – температура танення льоду, °С;
 c_m – теплоємність метала трубок конденсатора, кДж/(кг·К);
 θ'', θ' – температура нагрітих і охолоджених труб конденсатора, °С.

Для відтаювання льоду використовується гаряча вода. Щоб розплавити лід, що наморозився на теплообмінних трубах конденсатора-десубліматора. Необхідна кількість гарячої води становитиме:

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		117

$$G_{\epsilon} = \frac{Q_{\text{від}}}{c_{\epsilon} \cdot \Delta t} = \frac{84870}{4,19 \cdot 5} = 4051,1 \text{ кг}$$

Δt – різниця між температурою теплоносія на вході та на виході (для води приймаємо 5).

Час відтаювання:

$$\tau_{\text{від}} = \frac{G_{\epsilon}}{W_{\epsilon}} = \frac{4051,1}{600} = 6,75 = 6 \text{ год } 45 \text{ хв}$$

де W_{ϵ} – витрата води (приймаємо 600 кг/год).

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Необхідна швидкість відкачування (л/с) розраховується за формулою:

$$B_n = \frac{1000V}{3600} = \frac{1000 \cdot 62,1}{3600} = 17,25 \text{ л/с}$$

де, V – об'єм парів, що утворюються в сублиматорі, які необхідно відкачати ($\text{м}^3/\text{год}$), який можна розрахувати як відношення:

$$V = \frac{W'_{\text{субл}} p}{\rho_n p_{\text{ср}}} = \frac{4,4 \cdot 760}{0,598 \cdot 90} = 62,1 \text{ м}^3 / \text{год}$$

де, p – атмосферний тиск (760 мм рт. ст.);

ρ_n – густина пари при атмосферному тиску, $\text{кг}/\text{м}^3$ (0,598 $\text{кг}/\text{м}^3$) [171];

$p_{\text{ср}}$ – середній тиск пари в системі (за відсутності даних, приймаємо середній тиск насиченої пари 90 мм рт. ст.)

					ДП 6104.00.000 ПЗ	Арк.
						118
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Тоді, як видно з розрахунку, продуктивність вакуумного насосу повинна бути не нижчою, ніж 17,25 л/с. Таку продуктивність задовольнить. Пластинчасто-роторний вакуумний насос 2XZ-25C із продуктивністю до 25 л/с. Потужність електродвигуна 3,0 кВт, робоча напруга – 380 В. Граничний залишковий тиск – 1 Па. Маса насосу 105 кг. Кількість масла для заправки – 4л. Виробник – EVP Vacuum (Китай) [172].

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

5.4.1 Вимоги до охорони праці

Обслуговування сублімаційних установок відноситься до робіт з підвищеною небезпекою відповідно до п. п. №№ 33, 113, 118 Переліку робіт з підвищеною небезпекою, затв. Держнаглядохоронпраці 30.11.1993, № 123 [173].

Машиніст сублімаційної установки повинен виконувати роботу на постійному робочому місці. Він повинен виконувати такі види робіт як: ведення технологічного процесу сублімаційного сушіння; прийом продукту, завантаження в апарати для заморожування і сублімаційного сушіння (контроль цього процесу); дотримання заданого режиму при заморожуванні та висушуванні; забезпечення умов стерильності на всіх етапах сублімаційного сушіння; контроль за дотриманням технологічного регламенту за показаннями контрольно-вимірювальних приладів і результатами аналізів; витримування заданих параметрів температурного режиму; виконання інших робіт згідно з Єдиним тарифно-кваліфікаційним довідником і розрядом.

До самостійної роботи з обслуговування сублімаційних установок допускаються особи, які: досягли 18-років; пройшли медичний огляд відповідно до наказу № 45 Міністерства охорони здоров'я України від 30 березня 1994 р. та не мають медичних протипоказань; пройшли навчання, інструктаж з питань охорони праці, в тому числі при виконанні робіт з

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		119

підвищеною небезпекою, надання першої допомоги потерпілим від нещасних випадків, про правила поведінки при виникненні аварій [173].

Машиніст зобов'язаний знати: технологічну схему дільниці, що обслуговується; будову, принцип роботи і правила експлуатації основного і допоміжного обладнання, контрольно-вимірювальних приладів, арматури і комунікацій; технологічний режим і правила регулювання процесів; фізико-хімічні та біологічні властивості препаратів і процесів сублимаційного сушіння; вимоги, що ставляться до сировини, напівпродуктів і готової продукції.

Також машиніст зобов'язаний: вміти користуватися засобами колективного та індивідуального захисту; дотримуватися зобов'язань з охорони праці, передбачених колективним договором (угодою, трудовим договором) і правилами внутрішнього трудового розпорядку підприємства, в тому числі: вчасно починати і закінчувати роботу, дотримуватися часу технологічної і обідньої перерв; не виконувати роботи, непередбачені змінним завданням; не знаходитися на роботі у позаробочий час без відповідного дозволу і керівника.

В процесі роботи на машиніста сублимаційних установок можливий вплив небезпечних і шкідливих виробничих чинників [173]:

1. **Фізичних:** підвищене значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якого може відбутися крізь тіло людини; рухомі частини виробничого обладнання, виробів, заготівель, матеріалів, що пересуваються; недостатня освітленість робочої зони; підвищена температура поверхні обладнання і матеріалів; підвищена або знижена температура повітря робочої зони; підвищений рівень шуму.
2. **Хімічних:** токсична і дратуюча дія на організм людини: шкіряні покрови, слизові оболонки, органи дихання.
3. **Психофізіологічних:** нервово-психічні перевантаження (перенапруга аналізаторів, монотонність праці).

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		120

При виконанні своїх обов'язків машиніст сублимаційних установок зобов'язаний дотримуватися вимог санітарних норм і особистої гігієни: приступати до роботи лише у засобах індивідуального захисту; прийняти і утримувати упродовж зміни робоче місце у чистоті й порядку; зберігати і приймати їжу у відведених місцях; після роботи вимити забруднені частини тіла.

Перед початком роботи необхідно: перевірити наявність, цілісність і комплектність спецодягу і засобів індивідуального захисту, одягнути їх; провести візуальний огляд установки, перевірити наявність і цілісність захисного заземлення, наявність захисних кожухів установки. При установленні порушення заземлення повідомити механіка цеху про несправність; переконатися у відповідності запису в апаратному листі фактичному стану технологічного процесу; переконатися в наявності вакууму по приладах; увімкнути припливно-витяжну вентиляцію за 15-20 хвилин (або й раніше) до початку роботи; при виявленні будь-яких несправностей сповістити керівника робіт та не приступати до роботи до їх усунення [173].

Під час роботи необхідно: вести технологічний процес згідно з нормами технологічного режиму; стежити за справністю обладнання, запірної арматури, комунікацій, засобів контрольно-вимірювальних приладів та автоматики, огорожень, заземлення, припливно-витяжної вентиляції; не допускати забруднення установки горючими матеріалами, захаращення проходів, аварійних виходів, підходів до обладнання і пожежного інвентарю; стежити за герметичністю обладнання і комунікацій, при виявленні джерел загазованості приймати заходи щодо організації їх негайного усунення; не допускати роботу обладнання із зламаними або вимкненими блокуваннями, сигналізацією і запобіжними приладами; записувати в добовий журнал основні параметри роботи сублимаційної установки. При виявленні під час роботи будь-яких несправностей зупинити роботу, вимкнути обладнання,

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		121

(винести) на свіже повітря, викликати лікаря. Якщо постраждалий дихає судорожно, рідко або зовсім не дихає, потрібно до приходу лікаря робити йому штучне дихання і викликати швидку допомогу (при великій концентрації пари фреону може настати ядуха). Рекомендується в усіх випадках отруєння давати постраждалому упродовж 30-45 хвилин вдихати кисень, зігріти його грілками. Незалежно від тяжкості стану постраждалий повинен бути направлений до лікаря [173].

Також як і на будь-яких інших технологічних стадіях виробництва, персонал повинен бути клінічно здоровим, не бути пов'язаним із роботою з іншими інфекційними агентами, крім мікобактерій вакцинного штаму, не повинен мати ризику туберкульозного інфікування та проходити періодичну перевірку на відсутність туберкульозу [71].

5.4.2 Охорона наколишнього середовища

Якщо розглядати сублимаційну установку загалом, то можливим джерелом забруднення навколишнього середовища є масло (його пари), яке використовується для зменшення сили тертя кочення у підшипниках в насосах. Хоча підшипники знаходяться у замкнутому просторі і для масла організований замкнутий цикл, можливості витоку виключати не можна. Для попередження витоку в конструкції також передбачають ущільнення [174]. Відпрацьоване масло зливається й утилізується. При правильному використанні масла для вакуумних насосів не є шкідливими для людини та навколишнього середовища.

Повітря та силіконове масло, що використовуються, також є безпечними та не несуть небезпеки навколишньому середовищу.

Вентиляція забезпечується багатоступеневим фільтруванням атмосферного повітря за використання індивідуального фільтру тонкої очистки безпосередньо перед апаратом сублимаційної установки, що відповідно позначено на апаратурній схемі. Відпрацьоване повітря перед

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		123

скидом в атмосферу також відфільтровується, зокрема від можливих масляних парів.

Єдиним негативним фактором, що пов'язаний із використанням даної установки, є її висока енергоємність, тобто значне споживання електроенергії, вироблення якої не є екологічним.

Таким чином, можна зробити висновок, що в цілому установка сублімаційної сушки є безпечною для навколишнього середовища.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		124

ВИСНОВКИ

Згідно із затвердженим завданням, у дипломному проекті спроектована та представлена технологія виробництва імунобіологічного препарату – J07AN01 – протитуберкульозної вакцини БЦЖ.

1. На основі патентного пошуку обґрунтовано вибір продуценту – рекомбінантного штаму *M. bovis* BCG Tice/ald, який за рахунок залишкової вірулентності забезпечує високий захист від туберкульозу. Субштам є більш чутливим до антибіотиків і може використовуватися при онкотерапії, що робить технологію на його основі соціально привабливою і перспективною.
2. Проаналізовано біохімічні основи формування імунітету до збудника туберкульозу. Встановлено, що реалізація клітинного захисту відбувається шляхом активації макрофагів і дендритних клітин та ініціації вродженої імунної відповіді через секрецію цитокінів та хемокинів. Гуморальний імунний захист реалізується шляхом утворення антитіл, які здатні швидко опсонізувати збудника, перешкоджаючи його поширенню.
3. Спираючись на патентну розробку, запропоновано схему отримання продуценту, який володіє додатковою аланіндегідрогеназною активністю. В результаті трансформації плазмиди pMD31, яка несе ген *ald* геномної ДНК *M. tuberculosis*, штам набуває кращої виживаності й довше персистує в організмі людини, забезпечуючи йому тривалий захист.
4. Враховуючи культуральні та фізіолого-біохімічні особливості *M. bovis* BCG Tice/ald, для його культивування обрано середовище Сотона, яке забезпечує максимальний приріст біомаси. Визначені раціональні

					ДП 6104.00.000 ПЗ		
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробив		Байко Т.Ю.			Стадія	Аркуш	Аркушів
Консульт.					Д	125	142
Керівник		Орядінська Л.Б.			КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Затвер.							
ВИСНОВКИ							

параметри культивування: температура – 37+/-0,5°C; рН 7-7,2; тривалість – 6-7 діб; поверхнева аерація –15 л/год; частота обертання мішалки – 840 об/хв.

5. Обґрунтовано вибір вакуум-сублімаційної сушарки. На основі розрахунків спроектовано субліматор вакуум-сублімаційної установки, а також підібрано модель сушарки – Lyopharma 25, що задовольняє вимоги асептики, продуктивності – 105 200 ампул за цикл, та площі завантаження продукту – не менше 23,67 м². Розраховано та підібрано модель вакуум-насосу для проведення процесу сушіння – 2XZ-25С, потужністю 3,0 кВт.
6. Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва вакцини БЦЖ, які дозволяють отримувати серію препарату з 21 040 упаковок по 5 комплектів вакцинного препарату в кожній. Для всіх технологічних стадій наведено матеріальний баланс із врахуванням можливих втрат.
7. Проведено аналіз небезпечних та шкідливих факторів виробництва, включаючи ризики при експлуатації вакуум-сублімаційної установки і роботі персоналу з вакцинним штамом. Наведено основні вимоги з техніки безпеки та охорони праці.

					<i>ДП 6104.00.000 ПЗ</i>	Арк.
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>		126