**Національний технічний університет України**

**«Київський політехнічний інститут**

**імені ігоря сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

|  |  |
| --- | --- |
| «На правах рукопису»  УДК \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | «До захисту допущено»  В.о. завідувача кафедри  \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Голуб Н.Б.  “\_\_\_”\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2021р. |

**Магістерська дисертація**

**на здобуття ступеня магістра**

**за освітньо-професійною програмою «Біотехнологіі»**

**зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»,**

**на тему: «Біотехнологія ізольованої лінії стовбурових клітин з крові»**

Виконала: студентка ІI курсу, групи БМ-01 мп

Калініченко Юлія Олександрівна

(підпис)

Науковий керівник: доц. кафедри біоенергетики,

біоінформатики та екобіотехнології, к.т.н., с.н.с.

Маринченко Л.В.

(підпис)

Консультант з розділу 4. Розрахунок обладнання

для проведення технологічного процесу:

заст. зав. кафедри, д. т. н., професор

Саблій Л.А.

(підпис)

Консультант з розділу 6. Економічна частина:

доц, к. е. н., Ткаченко Т.П. су

(підпис)

Рецензент: доц. каф.трансляційної медичної

інженерії, д.ф., Мотроненко В.В.

(підпис)

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студент \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(підпис)

Київ – 2021 року

**ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № з/п | Формат | Позначення | Найменування | Кількість листів | Примітка |
| 1 | А4 |  | Завдання на дипломний проєкт | 3 |  |
| 2 | А4 | ДП 0108. 00.000 ПЗ | Пояснювальна записка | 105 |  |
| 3 | А1 | ДП 0108. 01.000 ТК | Технологічна схема | 1 |  |
| 4 | А1 | ДП 0108. 02.000 ТК | Апаратурна схема | 1 |  |
| 5 | А1 | ДП 0108. 03.000 ТК | Біореактор | 1 |  |
| 6 | А1 | ДП 0108. 03.000 ТК | Схема автоматизації стадії культивування | 1 |  |
| 7 | А1 | ДП 0108. 03.000 ТК | Техніко-економічні показники проекту | 1 |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

2

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  | ДП 0108.00.000.00 | | |
|  | ПІБ | Підп. | Дата |
| Розробн. | Калініченко Ю.О. |  |  | Відомість  дипломного проєкту | Лист | Листів |
| Керівн. | Маринченко Л.В. |  |  | 1 | 1 |
| Консульт. |  |  |  | КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ББЕ гр. БМ-01 мп | |
| Н/контр. |  |  |  |
| Зав.каф. | Голуб Н.Б. |  |  |

1

**Національний технічний університет України**

**«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології**

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о. завідувача кафедри

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Наталія ГОЛУБ

« » 2021 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на магістерську дисертацію студенту**

**Калініченко Юлії Олександрівні**

1. Тема дисертації «Біотехнологія ізольованої лінії стовубрових клітин з крові», науковий керівник дисертації Маринченко Лоліта Вікторівна, доц. кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології, к.т.н., с.н.с., затверджені наказом по університету від «\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 20\_\_ р. №\_\_\_\_\_

2. Термін подання студентом дисертації « » 2021 р.

3. Об’єкт дослідження – технологія отримання препарату для аутотрансплантації на основі ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин з крові.

4. Вихідні дані: біологічний агент – гемопоетичні стовбурові клітини з периферичної крові, титр в готовому препараті не менше 5∙104 кл / мл, кінцевий продукт – препарат ізольованої лінії ГСК в кріопробірках та кріопакетах об’ємом 10 і 100 мл відповідно. Препарат має бути мікробіологічно чистим та не містити клітини із ознаками мутацій.

2

5. Перелік завдань, які потрібно розробити:

* здійснити науковий літературний та патентний пошук існуючих технологій культивування гемопоетичних стовбурових клітин, надати характеристику біологічного агента;
* обґрунтувати вибір способу виділення та очищення гемопоетичних стовбурових клітин з периферичної крові;
* обґрунтувати технологічні аспекти виробництва препарату на основі ізольованої лінії стовбурових клітин з крові;
* розробити технологічну схему;
* обґрунтувати вибір конструкції біореактора, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки;
* розробити апаратурну схему виробництва та креслення біореактора, розробити автоматизацію дільниці біосинтезу;
* виконати економічні розрахунки технології, розробити стартап-проєкт виробництва;
* розробити заходи по створенню безпечних умов праці, пожежної безпеки виробництва, знешкодження та утилізації відходів.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: технологічна схема – 1 арк. А1, апаратурна схема – 1 арк. А1, креслення загального виду біореактора – 1 арк. А1, схема автоматизації дільниці культивування – 1 арк. А1, техніко-економічні показники проекту – 1 арк. А1.

7. Орієнтовний перелік публікацій: апробація (тези) за результатами розробки.

8. Консультанти розділів дисертації

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Розділ | Прізвище, ініціали та посада  консультанта | Підпис, дата | |
| завдання  видав | завдання прийняв |
| Розділ 4. Розрахунок обладнання  для проведення технологічного процесу | Саблій Л.А., заст. зав. кафедри,  д. т. н., професор |  |  |
| Розділ 6. Економічна частина | Ткаченко Т.П., доц., к.е.н. |  |  |

9. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

3

Календарний план

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № з/п | Назва етапів виконання  магістерської дисертації | Термін виконання етапів магістерської дисертації | Примітка |
| 1 | Вступ. Характеристика біологічного агента. Біохімічні основи виробництва. | 13.09.21 |  |
| 2 | Технологічна частина. Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу. Автоматизація виробництва | 27.09.21 |  |
| 3 | Економічна частина. | 4.10.21 |  |
| 4 | Охорона праці та навколишнього середовища. | 18.10.21 |  |
| 5 | Креслення технологічної та апаратурної схем. | 01.11.21 |  |
| 6 | Креслення біореактора та автоматизації стадії культивування. | 15.11.21 |  |
| 7 | Оформлення пояснювальної записки і креслень. Розробка презентації | 29.11.21 |  |

Студент Юлія КАЛІНІЧЕНКО

Науковий керівник Лоліта МАРИНЧЕНКО

4

Пояснювальна записка

до магістерської дисертації

на тему: «Біотехнологія ізольованої лінії

стовбурових клітин з крові»

Київ – 2021 року

5

**РЕФЕРАТ**

Магістерську дисертацію викладено на 103 сторінках друкованого тексту. Складається зі вступу, переліку скорочень, семи розділів, висновків, переліку посилань, 6 рисунків, 29 таблиць, 51 посилання.

**Метою роботи** є проектування виробництва ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин з периферичної крові людини для аутологічної трансплантації.

В проєкті наведено обгрунтування вибору технологічної схеми, розроблено апаратурну схему, креслення біореактора та схему автоматизації стадії культивування. Здійснено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки біореактора. Розроблено стартап-проект виробництва препарату на основі ізольованої лінії стовбурових клітин з крові.

Перевагою даної технології є зниження праце- та матеріаломісткості виробництва, мінімізація накопичення в клітинах мутацій за рахунок заміни декількох пасажувань одним циклом культивування ГСК у біореакторі, як наслідок – зниження собівартості препарату; використання сучасної апаратури та повна автоматизація технологічного процесу, що зводить до мінімуму ризик контамінації.

Запропонований склад поживного середовища із замінником ембріональної бичачої сироватки дає змогу уникнути потрапляння тваринних клітин та інших антигенів до організму людини, при цьому забезпечуючи максимальний вихід біомаси і титру активних клітин.

ГЕМОПОЕТИЧНІ СТОВУБРОВІ КЛІТИНИ, ПРЕПАРАТ, ІЗОЛЬОВАНА ЛІНІЯ, КУЛЬТИВУВАННЯ, ГЕМОПОЕЗ, ПРОЛІФЕРАЦІЯ, КРІОКОНСЕРВАЦІЯ, АУТОЛОГІЧНА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ

6

**ABSTRACT**

The master's dissertation is presented on 105 pages of printed text. It consists of an introduction, a list of abbreviations, seven chapters, conclusions, a list of references, 6 figures, 29 tables, 51 references.

The aim of the work is to design the production of an isolated line of hematopoietic stem cells from human peripheral blood for autologous transplantation.

The project provides a rationale for the choice of technological scheme, developed a hardware scheme, drawings of the bioreactor and the scheme of automation of the cultivation stage. Technological, constructive and thermal calculations of the bioreactor were performed. A startup project for the production of the drug based on an isolated stem cell line from blood has been developed.

The advantage of this technology is the reduction of labor and material consumption of production, minimization of accumulation of mutations in cells by replacing several passages with one cycle of HSC cultivation in a bioreactor, as a result – reducing the cost of the drug; use of modern equipment and full automation of the technological process, which minimizes the risk of contamination.

The proposed composition of the nutrient medium with a substitute for embryonic bovine serum makes it possible to avoid the entry of animal cells and other antigens into the human body, while ensuring maximum yield of biomass and titer of active cells.

HEMOPOETIC STEM CELLS, DRUG, ISОLATED LINE, CULTIVATION, HEMOPOESIS, PROLIFERATION, CRYOCONSERVATION, AUTOLOGICAL TRANSPLANTATION

7

**ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ**

**ГСК** – гемопоетичні стовбурові клітини

**КМ** – кістковий мозок

**FBS** (*англ.* fetal bovine serum) – ембріональна теляча сироватка

**MPP** (*англ.* multi-potent progenitor) – мультипотентні клітини-попередники

**ДНК** – дезоксирибонуклеїнова кислота

**IMDM** (*англ.* Iscove's Modified Dulbecco's Medium) – середовище Дульбекко, модифіковане способом Ісков

**HPP-CFC** (*англ.* сolony-forming cells with a high proliferative potential) – колонієформуючі клітини з високим проліферативним потенціалом

**CFU-GEMM** (*англ.* сolony-forming unit − granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte) – мультипотентні колонієформуючі одиниці

**CFU-GM** (*англ.* granulocyte-macrophage colony-forming unit) – здатність до гранулоцитарного та макрофагального диференціювання

**CFU-G** (*англ.* granulocyte colony-forming unit) – здатність до гранулоцитарного диференціювання

**CFU-M** (*англ.* macrophage colony-forming unit) – здатність до макрофагального диференціювання

**BFU-E** (*англ*. burst forming unit erythroid) – колонієутворюючий еритроїд

**SCF** (*англ.* stem cell factor) – рекомбінантний людський фактор стовбурових клітин

**TGF-b** (*англ.* transforming growth factor beta) – трансформуючий фактор росту

**ПС** – поживне середовище

**M-CSF** (*англ*. macrophage colony-stimulating factor) – макрофагальний колонієстимулюючий фактор

**EPO** – еритропоетин (фактор росту)

8

**DMEM** (*англ.* Dulbecco's modified Eagle medium) – модифіковане за способом Дульбеко середовище Ігла

**BME** (*англ.* basal media Eagle's) – базальне середовище Ігла

**RPMI** (*англ.* Roswell Park Memorial Institute medium) – поживне середовище, розроблене в однойменному інституті

**IL** – інтерлейкін

**TNF** (*англ.* Tumor necrosis factor) – фактор некрозу пухлин

**EДTA** – етилендіамінтетраоцтова кислота

**СОП** – стандартні операційні процедури

**КУО** – колонієутворюючі одиниці

**МПА** – м’ясо-пептонний агар

**ДМСО** – диметилсульфоксид (кріопротектор)

**НТД** – нормативно-технічний документ

9

**ЗМІСТ**

Зм.

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Аркуш

10

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консульт.



Керівник

Маринченко Л.В.

Затверд.

ЗМІСТ

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

ВСТУП………………………………………………………………………………12

РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА………………..…..14

1.1 Загальні відомості про стовбурові клітини………………………….….14

1.2 Поняття гемопоетичних стовбурових клітин……………………….….15

1.3 Морфологічно-цитологічні ознаки ГСК………………………….…….17

1.4 Культуральні ознаки ГСК…………………………………………….….21

РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА……………………..……...23

2.1 Оптимальні умови біосинтезу………………………………….………..23

2.2 Процес отримання лінії ГСК……………………………………….……27

РОЗДІЛ 3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА……………………………………..…...31

3.1 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовують у виробництві……………………………………………………31

3.2 Опис технологічного процесу…………………………………………...33

3.3 Характеристика кінцевої продукції …………………………………….48

3.4 Контроль виробництва…………………………………………………..50

3.5 Матеріальний баланс…………………………………………………….54

РОЗДІЛ 4 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ………………………………………………….55

4.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату………………………………………..55

4.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки…………..57

4.2.1 Конструктивний розрахунок біореактора…………………………..57

4.2.2 Розрахунок перемішуючого пристрою……………………………..58

4.2.3 Розрахунок барботера………………………………………………..59

4.2.4 Тепловий розрахунок.………………………………………………..59

4.3 Вибір загальнозаводського обладнання………………………………...63

РОЗДІЛ 5 АВТОМАТИЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА…………………………………...67

5.1 Актуальність автоматизації……………………………………………..67

5.2 Короткий опис стадії культивування виробництва ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин……………………………………………….67

5.3 Основні рішення автоматизації…………………………………………68

5.3.1 Технологічний контроль…………………………………………….68

5.3.2 Автоматичне регулювання…………………………………………..69

5.3.3 Сигналізація та захист………………………………………....…….70

5.4 Специфікація на технічні засоби………………………………………..71

РОЗДІЛ 6 ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА…………………………………………….73

6.1 Резюме стартап-проекту…………………………………………………73

6.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу…………..76

6.3 Визначення ключових факторів успіху проекту……………………….79

6.4 Визначення потенційних споживачів…………………………………...80

6.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку…………………………………83

6.6 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту……………………………………………………………...….……………87

6.7 Ризики стартап-проекту та методи управління ними…………………..90

РОЗДІЛ 7 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА……...94

ВИСНОВКИ………………………………………………………………………...98

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ…………………………………….100

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

11

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

**ВСТУП**

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

12

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Клітинна терапія – це новий напрям у медицині, заснований на застосуванні регенеративного потенціалу стовбурових клітин дорослого організму для лікування ряду важких захворювань, реабілітації пацієнтів після травм чи різних видів терапії (зокрема, хіміотерапії), а також боротьби з передчасними ознаками старіння.

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) – це клітини кісткового мозку, з яких в результаті диференціювання і дозрівання утворюються всі види клітин крові: еритроцити, тромбоцити та лейкоцити. Як джерело ГСК для трансплантації використовують кістковий мозок або периферичну кров, а також пуповинну кров, зібрану після народження дитини [1].

На цей час за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин дає змогу виліковувати більше 90% пацієнтів із злоякісними і доброякісними захворюваннями крові, якщо хвороба виявлена на ранній стадії. Щорічно в світі виконується більше   
50 000 трансплантацій гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку і периферичної крові і близько 2 000 трансплантацій пуповинної крові [2].

У розвиток біотехнології ізольованих ліній стовбурових клітин вже більше 10 років активно інвестують провідні фармацевтичні концерни, оскільки методи клітинної терапії стають все більш конкурентоспроможною альтернативою лікарських засобів. Біобанк стовбурових клітин пуповинної крові, інших тканин і клітин людини, як і реєстри донорів гемопоетичних стовбурових клітин, стали невід'ємним сектором системи охорони здоров'я розвинених країн. Саме це, а також розуміння того, що дослідження стовбурових клітин, розробка нових методів їх отримання та культивування є перспективним напрямком для науковців та медиків обумовлює **актуальність** обраної теми.

**Метою роботи** є розроблення технології виробництва ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин з периферичної крові людини для аутологічної трансплантації.

Відповідно до мети поставлено наступні **завдання**:

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

13

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

* здійснити науковий літературний та патентний пошук існуючих технологій культивування гемопоетичних стовбурових клітин, надати характеристику біологічного агента;
* обґрунтувати вибір способу виділення та очищення гемопоетичних стовбурових клітин з периферичної крові;
* обґрунтувати технологічні аспекти виробництва препарату на основі ізольованої лінії стовбурових клітин з крові;
* розробити технологічну схему;
* обґрунтувати вибір конструкції біореактора, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки;
* розробити апаратурну схему виробництва та креслення біореактора, розробити автоматизацію дільниці біосинтезу;
* виконати економічні розрахунки технології, розробити стартап-проєкт виробництва;
* розробити заходи по створенню безпечних умов праці, пожежної безпеки виробництва, знешкодження та утилізації відходів.

**Апробація результатів**: ***Калініченко Ю.О., Маринченко Л.В.*** Біотехнологія ізольованої лінії стовбурових клітин з крові // VII Міжнародна молодіжна науково-практична інтернет-конференція «Наука і молодь в ХХІ сторіччі», 30.11.2021.

Перевагою запропонованої технології є отримання цільового продукту із значно меншими затратами трудових ресурсів та часу, а також мінімізація накопичення в цільових клітинах мутацій, пов’язаних з реплікацією, так як для напрацювання об’єму препарату потрібен лише один цикл культивування у біореакторі; використання сучасної апаратури та майже повна автоматизація технологічного процесу зводить до мінімуму ризики контамінації препарату. Запропонований склад поживного середовища із замінником ембріональної бичачої сироватки дає змогу уникнути потрапляння тваринних клітин та інших антигенів до організму людини.

**РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА**

Зм.

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Аркуш

14

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консульт.



Керівник

Маринченко Л.В.

Затверд.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

**1.1 Загальні відомості про стовбурові клітини**

Стовбурові клітини мають неабиякий потенціал перетворюватися на різні типи клітин в організмі. Служачи своєрідною системою відновлення організму, вони теоретично здатні до поділу без обмежень, для відновлення та поповнення запасів інших клітин. Після поділу стовбурової клітини кожна нова клітина може або залишитися стовбуровою клітиною, або стати іншим типом клітин з більш спеціалізованою функцією, наприклад, м’язовою клітиною, еритроцитом або клітиною мозку [2].

Тип стовбурових клітин залежить від походження. Вони поділяються на три категорії: ембріональні, фетальні та дорослі стовбурові клітини.

Ембріональні стовбурові клітини – стовбурові клітини, що виділяються з ранніх ембріонів (на етапі бластоцисти або з 5-тижневих ембріонів) або тератокарциноми (пухлинної лінії) *in vitro*.

Фетальні стовбурові клітини – клітини, що знаходяться в пуповинній крові, плаценті, вони здатні трансформуватися в різні типи клітин (мультипотентні стовбурові клітини).

Клітини дорослого організму:

1. Гемопоетичні стовбурові клітини, що знаходяться в кровотворних органах і крові, здатні давати початок, в основному, різним клітинам кровотворення.

2. Мезенхімальні (стромальні) стовбурові клітини, що знаходяться в кістковому мозку, мають здатність до диференціації в остеобласти, хондроцити, теноцити, міобласти, фібробласти.

3. Стовбурові клітини інших тканин, наприклад, шкіри, судин, нервової тканини та інші, знаходяться у відповідних тканинах і диференціюються в клітинах цих тканин [1].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

15

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

[Дорослі стовбурові клітини](https://en.wikipedia.org/wiki/Adult_stem_cells) знаходяться в кількох окремих місцях тіла, відомих як [ніші](https://en.wikipedia.org/wiki/Stem-cell_niche), наприклад у [кістковому мозку](https://en.wikipedia.org/wiki/Bone_marrow) або [гонадах](https://en.wikipedia.org/wiki/Gonads). Вони існують для відновлення втрачених типів клітин і є [мультипотентними](https://en.wikipedia.org/wiki/Multipotent) або уніпотентними, що означає, що вони диференціюються лише на кілька або лише один тип клітин. У ссавців такі клітини включають [гемопоетичні стовбурові клітини](https://en.wikipedia.org/wiki/Hematopoietic_stem_cells), які є попередниками клітин крові та імунних клітин, [базальні клітини](https://en.wikipedia.org/wiki/Basal_cells), які підтримують [епітелій](https://en.wikipedia.org/wiki/Epithelium) шкіри, і [мезенхімальні стовбурові клітини](https://en.wikipedia.org/wiki/Mesenchymal_stem_cells), які підтримують кістки, [хрящі](https://en.wikipedia.org/wiki/Cartilage), м’язові та жирові клітини.

Дорослі стовбурові клітини становлять невеликих відсоток від усіх клітин; вони значно переважають за кількістю клітини-попередники та диференційовані клітини [[3]](https://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell#cite_note-:7-1).

**1.2 Поняття гемопоетичних стовбурових клітин**

Об’єктом досліджень даної роботи є гемопоетичні стовбурові клітини.

Гемопоетичні стовбурові клітини – клітини кісткового мозку, з яких в результаті диференціювання і дозрівання виходять всі види клітин крові: еритроцити, тромбоцити та різні види лейкоцитів. [Гемопоетичні стовбурові клітини](https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/hematopoietic-stem-cell) характеризуються великою здатністю до самовідновлення та [плюрипотентністю](https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/pluripotency). Ці клітини, в основному, знаходяться в кістковому мозку (КМ), підтримують кровотворення і поповнюються протягом усього життя дорослої людини [1].

Історія клінічного застосування гемопоетичних стовбурових клітин почалася більше 60 років тому, і зараз трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин – один із методів лікування гематологічних, деяких онкологічних і ряду імунологічних та спадкових захворювань.

ГСК мають здатність до практично необмеженого клітинного поділу. Це означає, що з порівняно невеликого числа ГСК може утворитися велика кількість дочірніх клітин, також здатних як до подальшого поділу, так і до диференціювання з подальшим дозріванням в ті чи інші клітини крові.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

16

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

При введенні ГСК в організм, де власне кровотворення знищено (наприклад, в результаті високодозової хіміотерапії), введені клітини здатні заселити кістковий мозок хворого і відновити кровотворення. Саме на цій здатності ГСК заснована трансплантація гемопоетичних стовбурових клітин. Для цього хворому потрібно ввести їх внутрішньовенно. Рухаючись по кровотоку, ГСК поступово заселяють кістковий мозок і починають функціонувати в ньому, виробляючи нові клітини крові [2].

Клінічні випробування [трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hematopoietic-stem-cell-transplantation) з метою поповнення [кровотворення](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hematopoiesis) широко проводилися для лікування лейкемії, [важкого комбінованого імунодефіциту](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/severe-combined-immunodeficiency) і важких аутоімунних захворювань. Крім того, гемопоетичне лікування використовувалося в доповненні до хіміотерапії негематопоетичного раку, такого як рак молочної залози, [нейробластома](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/ganglioneuroblastoma) та [рак яєчок](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/testis-cancer) [4].

Як джерело ГСК для трансплантації використовують кістковий мозок або периферичну кров, а також пуповинну кров, зібрану після народження дитини (рис. 1) [5].

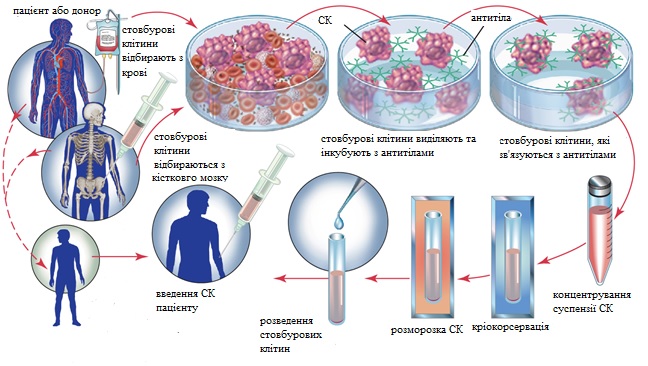


Рисунок 1.1. Етапи аутотрансплантації гемопоетичних стовбурових клітин [2].

Під час [гемопоезу](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/hematopoiesis) дорослої людини стовбурові клітини кісткового мозку генерують як лімфоїдні, так і [мієлоїдні клітини](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/myeloid-cell). [Лімфоїдні клітини](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/lymphoid-cell) складаються переважно з [Т-клітин,](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/t-cell) В-клітин і природних клітин-кілерів (NK-клітин). Мієлоїдні клітини включають гранулоцити, макрофаги, мегакаріоцити та еритроцити. Гематопоез – це поступовий процес диференціації, який включає декілька етапів, починаючи з гемопоетичних стовбурових клітин і закінчуючи остаточно диференційованими лініями (рис. 1.2) [1].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

17

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

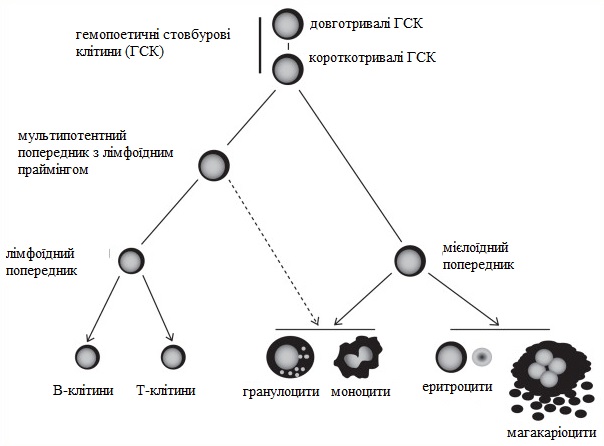


Рисунок 1.2. Схема диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин [1].

**1.3 Морфологічно-цитологічні ознаки ГСК**

У класичній моделі гемопоезу ГСК спочатку обмежують свою здатність до самовідновлення для генерації мультипотентних попередників (MPP), після чого відбувається поетапне обмеження потенціалу поділу клітинної лінії в бінарних точках розгалуження, що призводить до деревоподібної ієрархії. Відповідно до цієї моделі, гемопоетичні стовбурові клітини вважалися відносно однорідною популяцією. Однак нещодавні дослідження виявили величезну молекулярну та функціональну гетерогенність у фенотиповому пулі ГСК [6].

Гемопоетична стовбурова клітина нагадує малий лімфоцит, має діаметр від 7 до 12 мкм. Ядро клітини еухроматинове, велике, містить 1-2 великих ядерця. Ядерно-цитоплазматичне відношення зрушене у бік ядра. У вузькому базофільному обідку цитоплазми міститься невелика кількість мітохондрій та помірна кількість вільних рибосом. Комплекс Гольджі та гранулярна ендоплазматична мережа розвинені мінімально або відсутні. Вміст ГСК у тканинах організму невелика, наприклад, у червоному кістковому мозку зустрічаються з частотою 1:20 000, а в периферичній крові – 1:100 000 .

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

18

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Однак ГСК не можна розпізнати виключно на основі їх морфології. Гемопоетичні стовбурові клітини можна диференціювати за допомогою методів поділу клітин, які спрямовані на специфічні антигени. Одним з найважливіших з них є CD34**+**, глікопротеїн, який міститься на поверхні ГСК, ранніх клітинах-попередниках і ендотеліальних клітинах судин. Інші маркери та їх роль у гемопоезі наведено в таблиці 1.2 [6].

Таблиця 1.2 – Маркери для диференціації ГСК

|  |  |
| --- | --- |
| **Маркер** | **Роль у гемопоезі** |
| CD34 | Адгезія до строми в кістковому мозку |
| **Thy-1** | Адгезія Т-лімфоцитів |
| CD49f | Адгезія клітин |
| CD38 | Вказує на відсутність маркерів диференціації |
| **Lin-** | Адгезія Т-лімфоцитів |
| HLA-DR | Визначення гістосумісності |
| **TPO-R** | Рецептор тромбопоетину |

Хоча гетерогенність у пулі ГСК відносно добре охарактеризована, знання про основні причини неоднорідності клітин залишаються обмеженими. Комбінація різних факторів, імовірно, формує гетерогенність всередині стовбурового і прогеніторного компартменту різною мірою, включаючи зовнішні фактори клітини, накладені мікросередовищем; внутрішні фактори клітини, такі як мутації ДНК, конфігурації хроматину та асиметрична сегрегація клітинних детермінант; а також стохастичні ефекти.

Гемопоетичні стовбурові клітини виділяють із кісткового мозку чи периферичної крові за допомогою методу імуномагнітної сепарації. За даними досліджень [7], відразу після імуномагнітної сепарації близько 53% гемопоетичних стовбурових клітин містять агрегати частинок заліза різного розміру, як правило, згруповані на одному полюсі клітинної поверхні (рис. 1.3); приблизно у половини мічених клітин частинки заліза також були помітні в невеликих піноцитарних везикулах безпосередньо під цитоплазматичною мембраною (рис. 1.4). Більшість клітин, мічених або немічених, мають ознаки незрілих клітин, тобто велике ядро з дисперсним хроматином та мізерною цитоплазмою.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

19

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

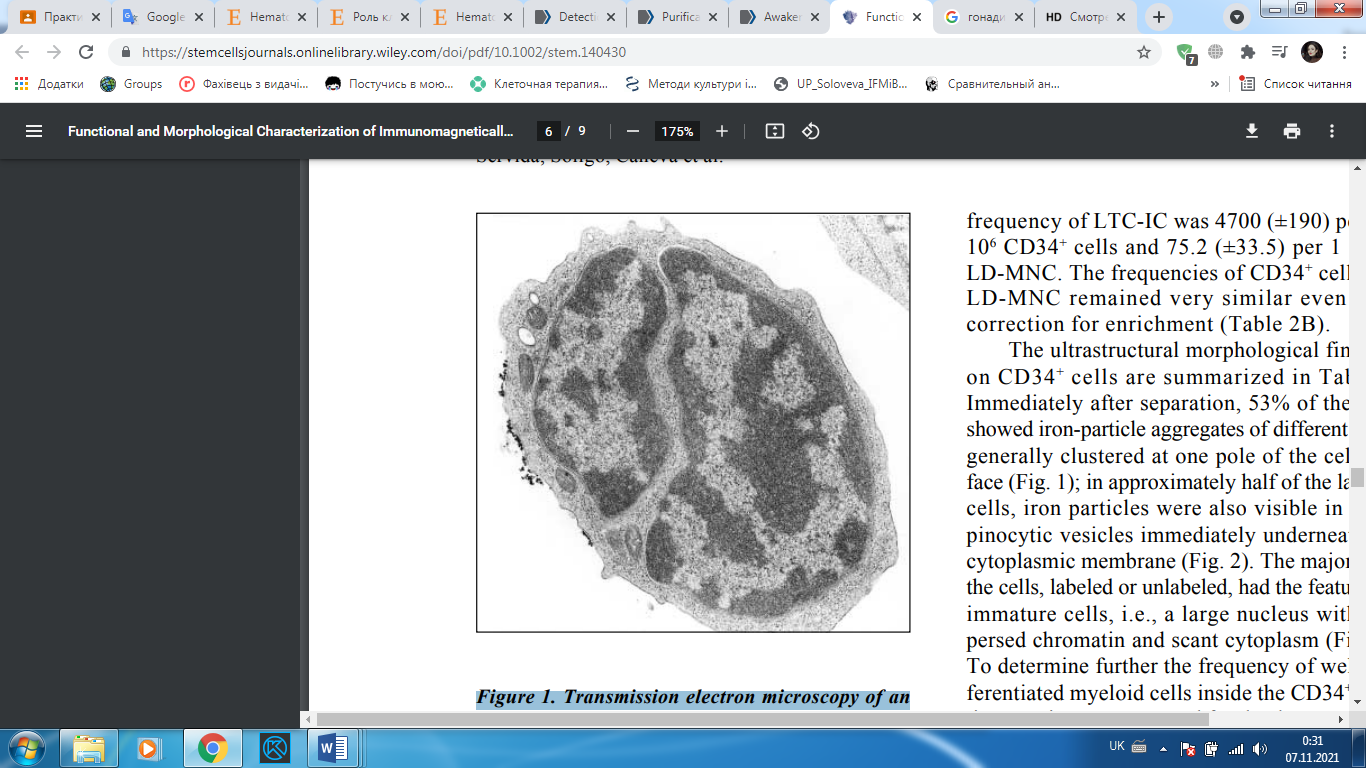


Рисунок 1.3. Трансмісійна електронна мікроскопія імуномагнітно відокремленої клітини CD34+, що показує незрілий фенотип і полярний розподіл мічення частинками заліза (збільшення ×21 700) [7].

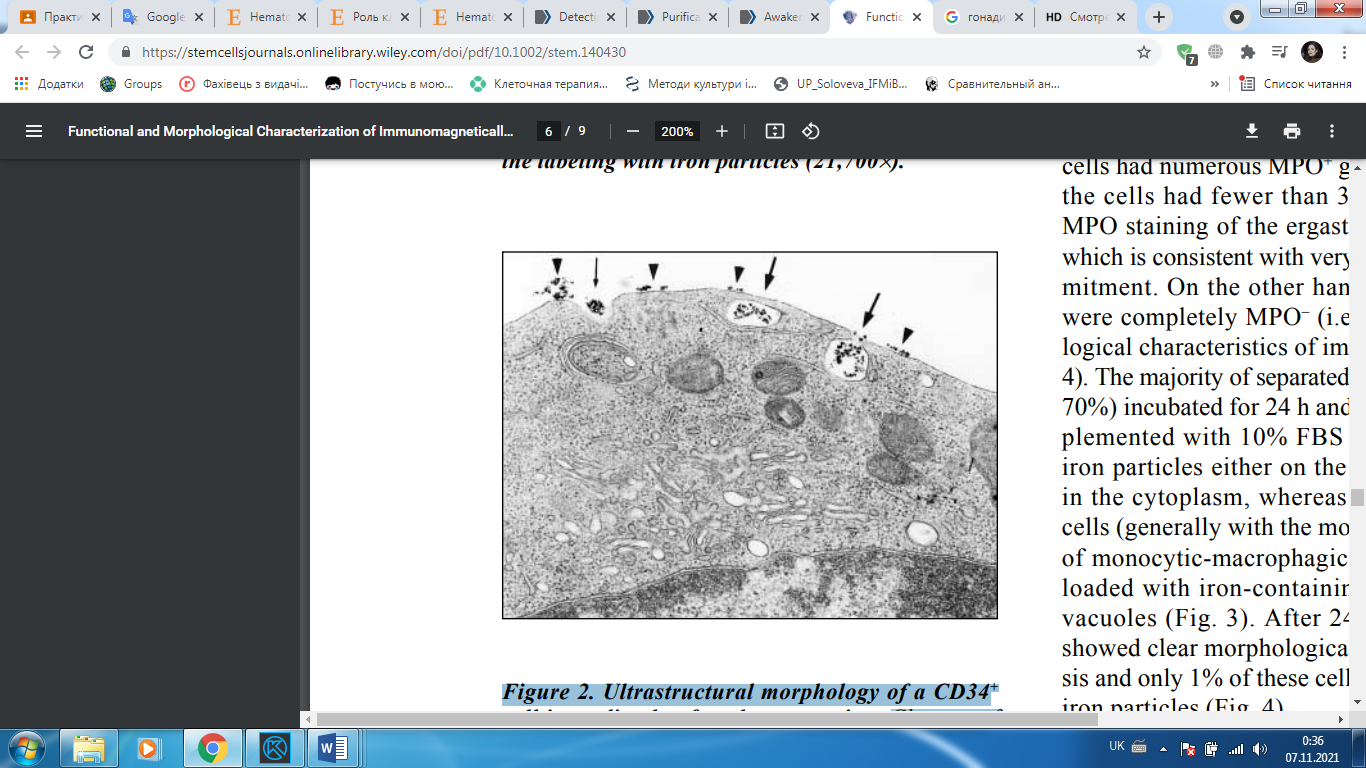


Рисунок 1.4. Ультраструктурна морфологія клітини CD34+ відразу після поділу. Скупчення частинок заліза можна спостерігати на поверхні клітини (кінчики стрілок), у ранній ендоцитарній вакуолі (мала стрілка) і двох піноцитарних везикулах (великі стрілки) (збільшення ×29 400) [7].

Більшість відокремлених клітин CD34+ (близько 70 %), інкубованих протягом 24 годин і 48 годин у IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium – середовище Дульбекко, модифіковане способом Ісков), доповненому 10% FBS (fetal bovine serum – ембріональна теляча сироватка), за температури 37˚C, не містили частинок заліза ні на зовнішній мембрані, ні в цитоплазмі, тоді як близько 30% клітин (загалом з морфологічними ознаками моноцитарно-макрофагічних клітин) містили залізовмісні великі фагоцитарні вакуолі   
(рис. 1.5). Через 24 години 8% клітин виявили чіткі морфологічні ознаки апоптозу, і лише 1% цих клітин містили фагоцитарні вакуолі з частинками заліза (рис. 1.6) [7].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

20

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

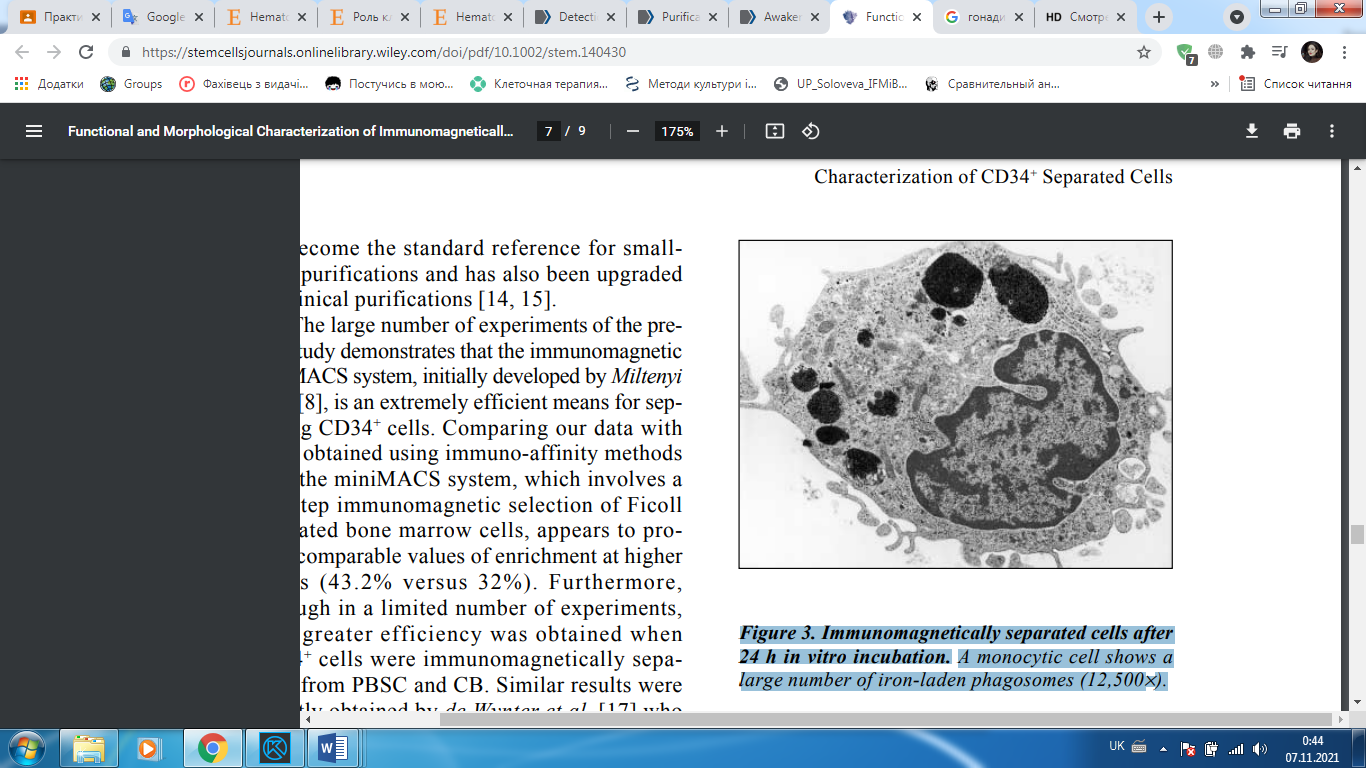


Рисунок 1.5. Імуномагнітно розділені клітини після 24 год інкубації *in vitro*. Моноцитарна клітина демонструє велику кількість фагосом, насичених залізом (збільшення ×12 500) [7].

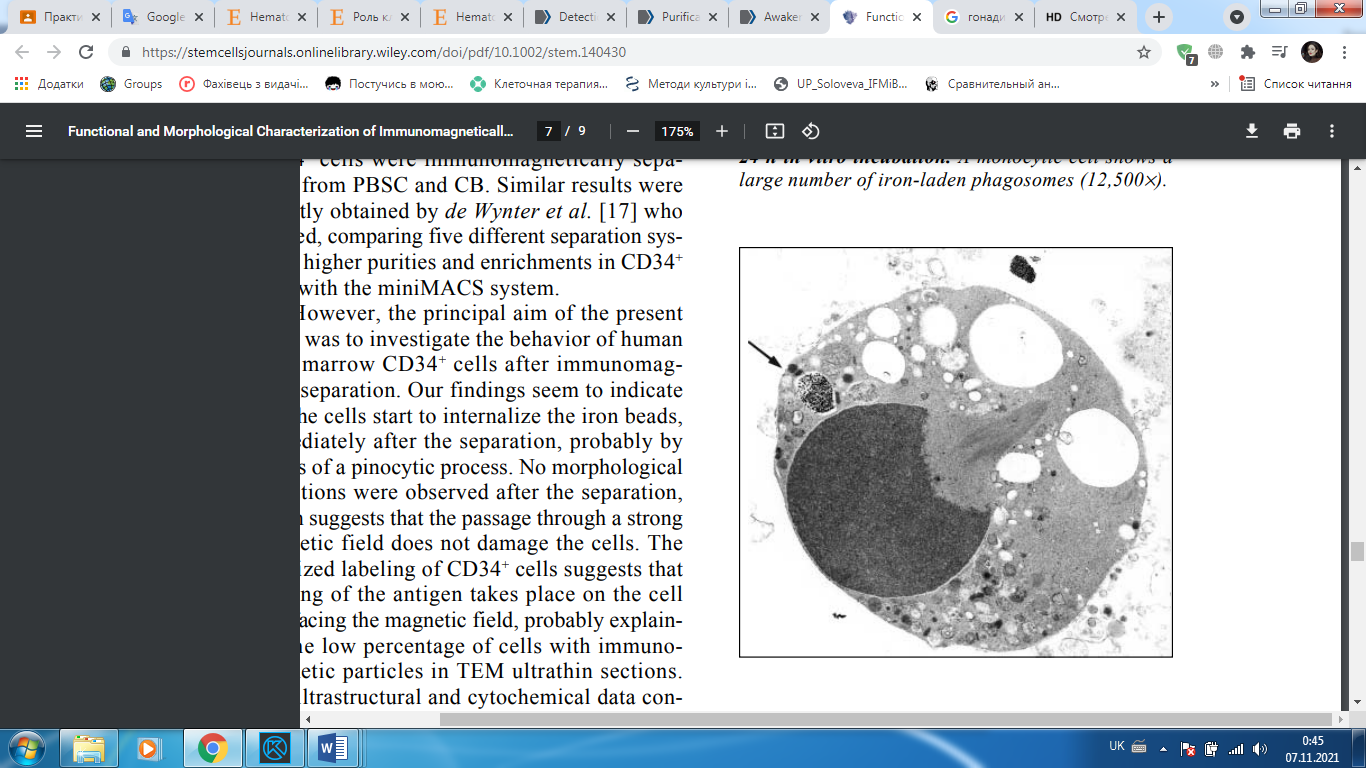


Рисунок 1.6. Імуномагнітно розділені клітини після 24 год інкубації *in vitro*. Апоптотична клітина показує один фагоцитарний пухир (стрілка), що містить частинки заліза (збільшення ×12 500) [7].

**1.4 Культуральні ознаки ГСК**

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

21

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Для клітин-попередників і більш зрілих підтипів стовбурових клітин (тих, які, ймовірно, не мають довготривалої здатності до відновлення популяції *in vivo*) використовують методи росту клітин у напівтвердому поживному середовищі, типу агару, агарози або метилцелюлози, або суспензійному середовищі [8].

Напівтверді поживні середовища дають змогу отримати характерні колонії. Ці колонії походять з окремих клітин, які є стовбуровими клітинами з обмеженою здатністю до самооновлення або клітинами-попередниками. Гемопоетична стовбурова клітина, яка дає початок колонії, може бути розпізнана диференційованим потомством в колонії. Аналіз колоній дає змогу ідентифікувати ГСК, колонієформуючі клітини з високим проліферативним потенціалом (HPP-CFC), мультипотентні колонієформуючі одиниці (CFU-GEMM) та більш лінійно обмежені попередники типу CFU-GM (здатність до гранулоцитарного та макрофагального диференціювання), CFU-G (здатність до гранулоцитарного диференціювання), CFU-M (здатність до макрофагального диференціювання) і BFU-E (бурст-формуюча одиниця – еритроїдна).

Пасажування (пересаджування) окремих колоній з однієї чашки Петрі на іншу з розвитком вторинних колоній дає змогу оцінити здатність до самооновлення початкової клітини, яка дала початок первинній колонії, особливо якщо первинна і вторинна колонії є мультилінійними [9].

Для культивування стовбурових гемопоетичних клітин у пробірках, флаконах чи чашках Петрі використовують рідкі поживні середовища IMDM з додаванням 20% замінника сироватки BIT 9500, 10 мкг / мл пеніциліну,  
10 мкг / мл стрептоміцину, 584 мкг / мл L-глутаміну.

Оптимальна концентрація цитокінів: фактор стовбурових клітин   
(100 нг / мкл), інтерлейкінів-3 (5 нг / мкл) і -6 (10 нг / мкл), а також тромбопоетину (50 нг / мкл) [10].

Для культивування гемопоетичних стовбурових клітин у біореакторах використовують готове безсироваткове синтетичне стерильне поживне середовище PluriSTEM® (SCM130, SCM132) з L-глутаміном, гентаміцином і фенолом червоним. Середовище є повноцінним і не потребує подальшого доповнення цитокінінами.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

22

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Ще один варіант – рідке поживне середовище StemMACS HSC Expansion Cocktail, яке містить комбінацію рекомбінантних людських цитокінів, склад яких підібраний для підтримки проліферації гемопоетичних клітин-попередників людини. До його складу входять: рекомбінантний людський FltS-ліганд, рекомбінантний людський фактор стовбурових клітин (SCF) і рекомбінантний тромбопоетин. Подібна комбінація цитокінів індукує проліферацію ГСК і незрілих попередників [11].

**Висновки за розділом:**

Препарат на основі ГСК використовується у медицині для лікування хвороб кровотворення та у терапевтичних цілях. Для успішного відновлення кровотворення у пацієнта необхідно трансплантувати 1-2∙106 клітин / кг маси тіла. Лікування стовбуровими клітинами ґрунтується на їх внутрішньовенному введенні подібно лікарському препарату.

Препарат ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин не токсичний для пацієнта, не викликає алергічних реакцій чи запальних процесів, не викликає реакції відторгнення чи явища «трансплантат проти господаря», так як пацієнту вводяться власні клітини (аутотрансплантація).

На цей час активно вивчають на удосконалюють технології культивування ГСК на поживних середовищах із різними концентраціями факторів росту для напрацювання необхідних об’ємів препарату.

**РОЗДІЛ 2 БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА**

Зм.

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Аркуш

23

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консульт.



Керівник

Маринченко Л.В..

Затверд.

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

**2.1 Оптимальні умови біосинтезу**

Кожен етап гемопоезу регулюється та контролюється *in vivo* мікрооточенням клітини. Це включає не тільки склад і концентрацію факторів росту, але також місцеву концентрацію кисню, рН, осмоляльність, постачання поживних речовин, клітинне і молекулярне оточення клітин (контакт клітини з клітиною, молекули адгезії та позаклітинний матрикс). Усі ці параметри впливають на стан клітини, тому, щоб здійснити процес культивування клітин для створення певної субпопуляції, вплив усіх цих факторів необхідно враховувати у розробці технології.

Вибір поживного середовища, особливо використання ембріональної бичачої сироватки (FBS) або її замінника, безпосередньо впливає на диференціацію клітин, тому для розроблення складу середовища, яке буде використано, слід враховувати мету культивування та вимоги до готового продукту. Сироватка зазвичай містить TGF-b, який, як відомо, інгібує еритроїдну та мегакаріоцитарну лінію, таким чином сприяючи диференціюванню гранулоцитів та макрофагів. У культурі, що містить строму, сироватка підсилює адгезію клітин і стабілізує поживний шар. Іншим аспектом, який слід враховувати у разі використання сироватки тварин (наприклад, фетальної великої рогатої худоби або коня), є клінічна застосовність, оскільки середовища, що містять компоненти із сироваток тварин, будуть стикатися з більшими регуляторними перешкодами, ніж середовища без сироватки [12].

Оскільки кровотворення в кістковому мозку відбувається в статичних умовах, з безперервною подачею поживних речовин і одночасним видаленням продуктів життєдіяльності, для культивування кровотворних клітин було розроблено кілька стратегій живлення.

У статичних культиваціях були встановлені графіки подачі компонентів поживного середовища, які коливаються від заміни половини обсягу поживного середовища (ПС) на тиждень до загального щоденного обміну [13].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

24

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Концентрація кисню відіграє важливу роль у культурі гемопоетичних клітин, оскільки безпосередньо впливає на проліферацію та диференціацію клітин. Низький рівень кисню (5%) підтримує проліферацію колонієутворюючих клітин, ймовірно, через зменшення окисного пошкодження та підвищену чутливість до факторів росту, таких як EPO (еритропоетин) або M-CSF (англ. macrophage colony-stimulating factor – макрофагальний колонієстимулюючий фактор). Висока концентрація кисню (20%-30%) сприяє зростанню зрілих еритроїдних і мегакаріоцитарних клітин, тоді як зрілі гранулоцити демонструють більшу проліферацію за низького рівня кисню. Разом з вибором комбінації цитокінів, це може бути використано для контролю та спрямування проліферації та диференціації культури цільових клітин [14].

Вміст кисню в середовищі під час культивування потрібно точно вимірювати за допомогою датчиків та контролювати для уникнення порушення концентрацій. Це особливо важливо під час культивування стовбурових клітин і клітин-попередників за низького рівню кисню. Відповідно до росту клітин подачу кисню необхідно регулювати шляхом збільшення концентрації кисню в газовій фазі, збільшення перфузії, збільшення швидкості перемішування або регулювання вмісту СО2 [8].

Регуляція кровотворення в кістковому мозку контролюється не тільки складом цитокінів, мікрооточенням клітин і концентрацією кисню, але, як було вказано вище, а також локальним рН. У той час як CFU-GM найкраще проліферують в діапазоні pH 7,2–7,4 (нормальний pH крові), для еритроїдних клітин оптимальний рН становить 7,6. Нижче pH 6,7 не спостерігається диференціювання або проліферація жодної гемопоетичної клітини. Клітини еритроїдної лінії значно інгібуються навіть за рН нижче 7,1.

Щоб уникнути пригнічення проліферації та диференціації, рН у культурах гемопоетичних клітин необхідно ретельно контролювати. Особливо в культурі без перфузії рН змінюється під час культивування через секретовані кислі метаболіти, такі як лактат [15].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

25

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Процес культивування гемопоетичних стовбурових клітин повинен відповідати таким вимогам:

● Напрацювання достатньої кількості біомаси за відносно короткий час. Більшість клітин, необхідних для терапії, мають бути специфічними для пацієнта, а отже, їх необхідно надати «на вимогу» і в кількості, достатній для одного пацієнта. Збільшення в мільярди разів протягом кількох місяців не відповідає клінічним вимогам. Наприклад, у разі трансплантації стовбурових клітин після високодозової хіміотерапії культивування клітин необхідно проводити під час протоколу хіміотерапії, при цьому культивування не перевищує 7–10 днів. Винятком можуть бути мегакаріоцити, які використовуються для лікування тромбоцитопенії, які можна кріоконсервувати та розморозити в необхідній кількості перед трансплантацією.

● Враховуючи зазвичай невелику кількість клітин на ранній стадії культивування та значне збільшення їх кількості під час культивування, використовувані біореактори повинні мати змогу не тільки збільшити концентрацію клітин, але й об’єм культуральної рідини без зміни системи культивування.

● Легке виділення та відбір клітин. Ні істотна втрата кількості клітин, ні пошкодження клітин не є прийнятними, оскільки це безпосередньо вплине на терапевтичну цінність трансплантата. Велика кількість трудомістких етапів ізоляції та очищення також неприпустима. Це пов’язано не тільки зі збільшенням часу та витрат, але й із збільшенням ризику контамінації.

● Контрольовані умови культивування. Як описано вище, умови культивування мають величезний вплив на проліферацію та диференціацію гемопоетичних стовбурових і прогеніторних клітин. Незначні зміни концентрації кисню, рН або складу середовища та фактора росту можуть призвести до значних змін у структурі диференціації та проліферативному потенціалі. Матеріали, що використовуються для установки біореактора, а також механічні сили, що виникають під час культивування, повинні бути адаптовані до передбачуваного підтипу клітин.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

26

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

● Клінічна застосовність. Умови регулювання клітинної терапії безпосередньо стосуються клітин і матеріалів, які використовуються під час культивування. Використання ліній клітин, особливо тваринного походження (наприклад, стромальних клітинних ліній у разі спільного культивування), використання тваринної сироватки слід уважно переглянути та, за можливості, замінити синтетичними аналогами чи безсироватковими середовищами.

Завдяки застосуванню рекомбінантних цитокінів, культивування та напрацювання біомаси ізольованих гемопоетичних стовбурових і прогеніторних клітин можливе без підтримки живильного шару стромальних клітин. Саме простота цих культурних систем є їх головною перевагою для проектування виробництва. Клітини культивують у хімічно визначеному культуральному середовищі, що містить певні комбінації цитокінів і без будь-яких стромальних продуктів [15].

Існує три різних підходи до культивування ізольованих гемопоетичних стовбурових клітин: статична, перемішувана та іммобілізована культура.

Статичне культивування відбувається в дуже простих культуральних системах, таких як лунки, колби для культивування або газопроникні культуральні пакети [8]. Оскільки перші дві системи не дають змоги культивувати клітини в клінічному масштабі, остання насправді є найбільш часто використовуваним прийомом для напрацювання необхідних об’ємів біомаси стовбурових клітин. Ці системи мають перевагу в тому, що вони прості, використовуються одноразові витратні матеріали та обладнання, які дають змогу швидко напрацьовувати та виділяти клітини. Але всі вони не дають змоги контролювати процес культивування або безперервно подавати свіже поживне середовища. Це викликає зміни в умовах культивування (концентрація кисню, pH, концентрація субстрату, метаболіту та цитокінів).

Біореактори з перемішуваними простоями поширені в культивуванні тваринних клітин, оскільки вони забезпечують однорідність середовища, репрезентативний відбір проб, кращий доступ до контролю процесу та підвищену передачу кисню [16].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

27

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

**2.2 Процес отримання лінії ГСК**

Процес отримання ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин з крові за запропонованою технологією складається із таких послідовних операцій:

клітин з крові;

* иділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;

виділення мононуклеарних клітин з крові

клітин з крові;

* иділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;

виділення гемопоетичних стовбурових клітин

методом імуномагнітної сепарації

* літин з крові;
* иділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;

отримання посівного матеріалу

* клітин з крові;
* иділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;

рідкофазне культивування ГСК

ітин з крові;

* иділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення мононуклеарних клітин з крові;

кріоконсервація суспензії ГСК

Розлив і кріоконсервація препарату відбувається безпосередньо після закінчення процесу культивування. Препарат ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин містить 5∙104 клітин / мл.

На першій стадії виділення для того, щоб оцінити функцію ГСК та ідентифікувати нові молекулярні компоненти, важливо виділити ГСК із гетерогенної клітинної суміші, яка міститься в ніші кісткового мозку.

Отже, функціональна чистота є важливим фокусом у галузі напрацювання гемопоетичних стовбурових клітин, оскільки метод [очищення](https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/copurification) може різко вплинути на [приживлення](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/engraftment) та відновлення кровотворення. ГСК очищають комбінацією збагачення (шляхом магнітного сортування клітин) та [флуоресцентно-активованого сортування клітин](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/fluorescence-activated-cell-sorting) на основі [маркерів клітинної поверхні](https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/cell-surface-marker) або фарбування життєво важливим барвником. Було показано, що людські ГСК експресують [CD34](https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/cd34)+ і не мають експресії [CD38](https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/cd38)+, що становить основу всіх схем очищення гемопоетичних стовбурових клітин [1].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

28

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Культивування гемопоетичних стовбурових клітин включає оптимізовані протоколи, а також якісні реагенти; однак найважливішою вимогою є середовище, яке містить необхідні компоненти, такі як глюкоза, вітаміни, амінокислоти тощо, які є життєво важливими складовими для метаболізму стовбурових клітин для підтримки росту та проліферації [17].

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – модифіковане за способом Дульбеко середовище Ігла) – є однією з широко використовуваних модифікованих версій середовища Basal Media Eagle's (BME), яке містить у чотири рази більші концентрації вітамінів, амінокислот та інших добавок, ніж BME. Оригінальна композиція DMEM містить 1000 мг / л глюкози, яка переважно використовується для культивування ембріональних клітин. Нині існують різні модифікації даного середовища на основі комбінації глюкози,   
L-глутаміну та пірувату натрію.

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) із бікарбонатною буферною системою використовується для культивування та збільшення виходу мононуклеарних клітин периферичної крові протягом 5-7 днів. Середовище доповнюють L-глутаміном (200 ммоль), 2-бета-меркаптоетанолом (50 ммоль), гентаміцином (20 μг / мл), FBS (10%) і факторами росту, такими як GM-CSF (англ. granulocyte-macrophage colony stimulating factor), IL-4 (інтерлейкін-4), TNF-альфа (англ. tumor necrosis factor-alpha – фактор некрозу пухлин), IL-1 альфа, IL-1 бета, ліганд c-kit, IL-3, M-CSF, IL-2 [18].

Модифіковане середовище Дульбекко (IMDM) складається з буферних систем бікарбонату натрію, а також численних добавок, таких як альбумін, додаткові амінокислоти, вітаміни, лецитин, селен і трансферин. IMDM разом із різними комбінаціями добавок, таких як IL-3 (5 нг / мл), EPO (3 МО / мл), SCF (100 МО / мл), гідрокортизон (10 μМ), інсулін (330 μг / мл) , L-глутамін (2 мМ) і сироватку людини використовували для культивування та проліферації CD45+ клітин [19].

Незважаючи на те, що описані вище базальні середовища широко використовуються численними дослідниками стовбурових клітин у всьому світі, вимоги до культур стовбурових клітин надзвичайно зросли за останні два десятиліття, в результаті чого потреба в спеціалізованих середовищах для культивування стовбурових клітин зросла. Крім вищезгаданих базальних середовищ, також використовують різні спеціалізовані поживні середовища для культивування ГСК, їх самоновлення та диференціації.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

29

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Сироватка, переважно продукт тваринного походження, що використовується разом із базальними середовищами, може становити небезпеку під час культивування людських стовбурових клітин, особливо в терапевтичних цілях. Це спонукає до використання середовищ без вмісту сироватки.

Stem pro-34 SFM – одне із спеціалізованих середовищ без сироватки, яке складається з базового рідкого поживного середовища разом із добавками та факторами росту. ГСК культивують за допомогою середовища StemPro-34 SFM з додаванням 0,05 мМ 2-β-меркаптоетанолу, 2 мМ L-глутаміну і цитокінового коктейлю з SCF (10 нг / мл), ІЛ-3 (10 нг / мл), ТПО (100 нг / мл),  
 G-CSF (10 нг / мл), ІЛ-11 (100 нг / мл) та ІЛ-6 (100 нг / мл) [20].

Гемопоетичні стовбурові клітини ростуть у рідкій фазі (культивування у суспензії) скупченнями клітин, які можна легко розбити легким піпетуванням. Нові клони ГСК виникають у суспендованій культурі на 4-6 день культивування. Кожен клон переносять в лунки планшета і вирощують до агрегату із 40-50 клітин. Процедуру повторюють багаторазово в пасажах, збільшуючи об’єм культури до концентрації 5-10 млн клітин / мл.

Проліферація гемопоетичних стовбурових клітин має свої особливості. Кожна стовбурова клітина піддається асиметричному поділу. Тільки одна із дочірніх клітин зберігає статус тотипотентної клітини, інша клітина ділиться та диференціюється в прогеніторні шари клітин. Прогеніторні клітини-попередники діляться симетрично, обидві дочірні клітини диференціюються в зрілі вузькоспеціалізовані лінії клітин [8].

В центрі конгломерата стовбурові клітини діляться з меншою швидкістю, ніж на периферії. Спочатку спостерігається експоненціальна фаза росту, яка переходить в стадію рівноваги (в результаті загибелі крайніх клітин, що вступають в кінцеве диференціювання) і включення механізмів апоптозу. Число клітин в суспензії не змінюється, якщо швидкість проліферації клітин врівноважена швидкістю гибелі та міграції одиночних клітин із конгломерату. Для підвищення швидкості проліферації клітин у середовище вносять додаткові фактори росту та живлення клітин, наприклад ембріональну бичачу сироватку.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

30

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Гемопоетичні стовбурові клітини, як і всі інші клітини, що активно діляться, зазнають 10-9 спонтанних мутацій на кожен нуклеотид. У 2004 році журнал Nature Genetics опублікував дані довгострокового культивування 9 ліній стовбурових клітин людини із колекції NIH. В результаті 8 із 9 ліній на пізніх пасажах (55-59) несли одну або декілька генетичних змін, характерних для злоякісних клітин: 45 % – генні мутації (делеціїї та ампліфікації) в області проонкогенів, 22 % – мутації мітохондріальної ДНК; 90 % – збільшення метилювання генних промоторів (епігенетичні зміни) [8].

**Висновки за розділом:**

Терапевтичне клонування та промислове культивування гемопоетичних стовбурових клітин потребує мінімальної кількості пасажів *in vitro* через підвищення ризику накопичення в цільових клітинах мутацій, пов’язаних з реплікацією під час багаторазового пасажування. Саме тому в запропонованій технології напрацювання об’єму препарату здійснюється за один цикл культивування у біореакторі замість декількох пасажувань та культивування у чашках Петрі.

Також пропонується використання готового безсироваткового поживного середовища або замінника сироватки для попередження потрапляння тваринних клітин та інших антигенів у організм людини.

**РОЗДІЛ 3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА**

Зм.

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Аркуш

31

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консульт.



Керівник

Маринченко Л.В..

Затверд.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

**3.1 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовують у виробництві**

Показники, що регламентують вимоги до якості сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовують у даному виробництві, наведено у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів

| **Найменування** | **Категорія і номер НТД, згідно з якою перевіряють показники якості** | **Показники, що обов’язкові для перевірки та їх нормативне значення** | **Примітка** |
| --- | --- | --- | --- |
| **1. Основна сировина** | | | |
| 1.1. Фікол-400 | Паспорт безпеки | Згідно з вимогами | Градієнт щільності |
| 1.2. IMDM | ДСТУ EN 12322:2015 | рН 7,0 - 7,6, мікробіологічна чистота | ПС |
| 1.3. DMEM | ДСТУ EN 12322:2015 | рН 7,0 - 7,4,  мікробіологічна чистота | ПС |
| 1.4.FBS | ДСТУ EN 12322:2015 | Згідно з вимогами | Компонент ПС |
| 1.5. Магнітні наночастинки Dynabeads CD34 | ISO 18113-1:2009 | Вміст життєздатних антитіл не менше 95 % | Для магнітної імуносепарації |
| 1.6. Detachabeads | ISO 18113-1:2009 | Згідно з вимогами | Для відмивання мононуклеарів від магнітних наночастинок |
| 1.7. Розчин Хенкса | ДСТУ EN ISO 10993-1:2015 | рН 6,8 - 7,2,  вміст хлор-іону –4,72 - 5,78 г / л | Для промивання клітин |
| 1.8. DMSO | Паспорт безпеки | Згідно з вимогами | Кріопротектор |
| 1.9. Антитіла CD34+ | ISO 15190:2020 | Вміст життєздатних антитіл не менше 95 % | Для фенотипування клітин |
| 1.10. Замінник сироватки | ДСТУ EN 12322:2015 | Згідно з вимогами | Компонент ПС |
| 1.11. Пеніцилін | ДСТУ 8397: 2015 | Концентрація 10 мкг/мл | Компонент ПС |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 1.12. Стрептоміцин  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  32  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | ISO 7218 | Концентрація 10 мкг/мл | Компонент ПС |
| 1.13. L-глутамін | Паспорт безпеки | рН 3,0 - 3,5 | Компонент ПС |
| 1.14. Цитокіни | ISO 15189:2007 | Вміст речовин: фактор стовбурових клітин –  100 нг/мкл,  інтерлейкін-3 – 5 нг/мкл і інтерлейкін-6 –  10 нг/мкл,  тромбопоетин – 50 нг/мкл | Компонент ПС |
| 1.15. Трипановий синій | Паспорт безпеки | Згідно з вимогами | Для визначення життєздатності клітин |
| 1.16. Середовище StemMACS HSC Expansion Cocktail | ДСТУ EN 12322:2015 | рН 7,0-7,6, мікробіологічна чистота | ПС для оцінки проліферації ГСК |
| 1.17. Периферична кров з ЕДТА в пробірці | ISO 15223-1:2016 | Концентрація ЕДТА – 1,2 мг / мл крові | Для виділення мононуклеарів |
| **2. Допоміжна сировина** | | | |
| 2.1. Вода очищена | ДСТУ ISO 3696: 2003 | Смак, запах, вміст мікробних частин, рН,  жорсткість | Для ополіскування апаратів |
| 2.2. Вода питна | ДСТУ 7525:2014 | Відсутність механічних частинок | Для подачі в сорочку біореактора |
| 2.3. Етиловий спирт | ДСТУ 4221:2003 | Об’ємна доля не менш 96,2% | Для дезінфекції |
| 2.4. Повітря очищене | ДСТУ ISO 14644-1:2009 | Кількість КУО, не більше ніж 10-6 кл / м3 | Для аерації |
| 2.5. Миючий засіб «Вернедор» | ДСТУ 2207.3-93 | Згідно з вимогами | Для миття обладнання, поверхонь |
| 2.6. Дезинфікуючий розчин «Максисан» | ДСТУ EN 14348:2014 | Згідно з вимогами | Для дезінфекції |
| 2.7. Рідкий азот | ДСТУ ГОСТ 9293:2009) | Об’ємна частка не менш 99,8% | Для кріоконсервації |
| **3. Матеріали** | | | |
| 3.1. Губки | ДСТУ ISO 6916-1:2009 | Зовнішній вигляд | Для мийки посуду, обладнання |
| 3.2. Гумові рукавички | ДСТУ EN ISO 374-1:2018 | Зовнішній вигляд | Для персоналу |
| 3.3. Гумовий фартух | ДСТУ EN 13688:2016 | Зовнішній вигляд | Для персоналу |
| 3.4. Електроди | ISO 19396-1:2017 | Зовнішній вигляд | Для виміру рН |
| 3.5. Етикетки | ТУ 9571-002-14350732-2006 | Зовнішній вигляд | Для маркування |
| 3.6. Предметні та покривні скельця | ISO 8037/1 | Згідно з вимогами | Для мікроскопії |
| 3.7. Чашки Петрі неадгезивні  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  33  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | ТУ 9464-021-29508133-2016 | Згідно з вимогами | Для культивування |
| 3.8. Кріопробірки | ДСТУ EN ISO 13485:2018 | Згідно з вимогами | Для пакування |
| 3.9. Камера Горяєва | ДСТУ ISO 1042:2005 | Згідно з вимогами | Для підрахунку клітин |
| 3.10. Піпетки різних об’ємів | ISO 648:2008 | Згідно з вимогами | Лабораторний посуд |
| 3.11. Пробірки центрифужні 50 мл | EN ISO 13485:2016 | Згідно з вимогами | Лабораторний посуд |
| 3.12. Пробірки | ДСТУ ISO 1042:2005 | Згідно з вимогами | Лабораторний посуд |
| 3.13. Кріопакети | ISO 10993-1:2018 | Згідно з вимогами | Для пакування |
| 3.14. Спецодяг | ДСТУ EN ISO 13688:2016 | Зовнішній вигляд | Для персоналу |
| 3.15. Наконечники одноразові | ДСТУ ISO 10993-1:2004 | Згідно з вимогами | Лабораторний посуд |

**3.2 Опис технологічного процесу**

Вибір технологічних способів та прийомів реалізується на основі типової технології, описаної, головним чином, в роботі В. В. Соловйової «Выделение, культивирование и биохимический анализ первичных клеток человека» [21].

Типова технологічна схема виробництва ізольованої лінії стовбурових клітин з крові складається із таких послідовних операцій:

* виділення мононуклеарних клітин з крові;
* виділення гемопоетичних стовбурових клітин методом імуномагнітної сепарації;
* отримання посівного матеріалу (пасажування клітин у чашках Петрі);
* культивування стовбурових клітин у біореакторі;
* кріоконсервація суспензії із ГСК.

Розлив і кріоконсервація препарату відбувається безпосередньо після закінчення процесу культивування. Препарат ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин містить 5∙104 клітин / мл.

Робота в чистих приміщеннях організовується відповідно до ДСТУ ISO 14644-4:2012 «Чисті приміщення і пов’язані з ними контрольовані середовища», а також GMP (Good Manufacturing Practic – належна виробнича практика).

*ДР 1. Санітарна підготовка виробництва*

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

34

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Виконання санітарної підготовки виробництва впливає на більшість факторів, такі як якість проміжних продуктів та кінцевого препарату, зберігання та транспортування продукції, а також впливає на працівників і, в разі неналежної санітарної підготовки, піддає ризику їх здоров’я.

*ДР 1.1. Підготовка технологічної води та води очищеної*

Груба очистка води є підготовчим етапом перед тонкою очисткою води. На цьому етапі технологічну воду пропускають через фільтри грубої очистки для видалення грубих дисперсних частин, такі як пісок, іржа, глина, волокна та інші механічні домішки. Для цього використовують сітчасті фільтри, які затримують частинки розмірами 20-300 мкм.

Підготовка води очищеної відбувається шляхом очищення її за допомогою методів коагуляції, осадження й фільтрації нерозчинних домішок та видалення патогенних мікроорганізмів шляхом фільтрування, хлорування або кип’ятіння. Далі воду направляють у фільтри тонкої очистки.

*ДР 1.2. Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів*

Дезінфекцію проводять для знищення патогенних мікроорганізмів та виключення можливості контамінації продукту. Приготування миючих та дезінфікуючих речовин здійснюють строго за правилами техніки безпеки та відповідно до внутрішніх стандартних операцій і процедур (СОП).

*ДР 1.2.1. Приготування розчину миючого засобу*

На біотехнологічних виробництвах для обробки значних площ поверхонь обладнання та інвентарю, для обробки виробничих приміщень надають перевагу економічно вигідним та достатньо ефективним дезінфікуючим речовинам. Найчастіше використовують «Вернедор» та «Максисан». Їх готують відповідно до інструкцій від виробника.

*ДР 1.2.2. Приготування розчину Хлораміну Б*

Хлорамін має бактерицидні, противірусні та спороцидні властивості в кислому і нейтральному середовищі. Препарат виявляє антимікробну дію проти вегетативних форм мікроорганізмів у концентрації 0,25 - 0,5 % і за температури 30 °С та високу ефективність проти спор за температури 50 – 60 °С. Водний розчин даного засобу з масовою часткою хлораміну Б (монохлораміну Б) від 0,3 до 3% використовують для обробки робочих поверхонь, підлоги прилеглих та виробничих приміщень, в технологічних приміщеннях – місць, куди потрапляють компоненти поживного середовища чи культуральна рідина.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

35

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Хлорамін Б (бензосульфохлорамід натрію) являє собою білий кристалічний порошок, який готують згідно з інструкцією: розводять 1 л хлораміну в 20 л води. Готовий розчин містить 25-29 % активного хлору (ВТУ 27/24-79-65).

*ДР 1.2.3. Приготування 76 % розчину етилового спирту*

Щоб приготувати 1 л спирту 76 %, потрібно 800 мл етилового спирту 96 % і 221 мл води очищеної змішати у змішувачі.

*ДР 1.3 Підготовка одягу*

Працюючим в боксі лаборантам необхідно використовувати одноразові халати (багаторазові за умови обов’язкового прання та прасування після кожної зміни), шапочки, рукавички, маски та окуляри. На ногах має бути змінне взуття або бахіли.

*ДР 1.4. Санітарна підготовка персоналу*

Робочий персонал має дотримуватися санітарних норм та правил на виробництві. Працівники повинні слідкувати за придатністю до роботи одягу та засобів індивідуального захисту, вчасно змінювати маски та рукавички. Чітко контролюють вхід та вихід у виробничі приміщення за допомогою електронних пропусків.

Для допущення на виробництво, персонал повинен пройти інструктаж з охорони праці, техніки безпеки, ознайомитися із правилами пожежної та електробезпеки. Необхідно регулярно проводити навчання персоналу кваліфікованими спеціалістами з відділу охорони праці. Потрібно вести протоколи інструктажів. Раз в рік проводити повторні інструктажі.

*ДР 1.5. Підготовка виробничих приміщень*

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

36

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Дезінфекцію та прибирання виробничих приміщень проводять згідно з внутрішніми протоколами у спеціальному одязі та засобах індивідуального захисту – гумових рукавичках, змінному взутті та гумовому фартусі, за необхідності використовують респіратор.

За 30 хв до початку та одразу після закінчення роботи вмикають УФ-лампи для дезінфекції повітря у виробничих приміщеннях.

*ДР 1.6. Підготовка обладнання та комунікацій*

Перед роботою обладнання перевіряють на дефекти. Також в обов’язковому порядку перевіряють герметичність біореактора.

*ДР 1.6.1. Мийка та дезінфекція обладнання*

Мийку біореактора місткістю 0,01 м3 з коефіцієнтом заповнення 0,2-0,7, лопатевою мішалкою та барботером здійснюють шляхом подачі очищеної води з магістрального трубопроводу із застосуванням миючих засобів. Далі відбувається обробка обладнання дезінфікуючими розчинами. Приготування миючих засобів та дезінфікуючих розчинів здійснюють шляхом розведення та змішування відповідних речовин зі складу.

Відпрацьована вода по трубопроводах прямує до ділянки знешкодження відходів.

*ДР 1.6.2. Ополіскування обладнання*

Ополіскування проводять за допомогою подачі питної води для видалення залишків розчину для мийки. Відпрацьована вода Т1.2 по трубопроводах прямує до ділянки знешкодження відходів.

*ДР 1.6.3. Стерилізація обладнання*

Стерилізацію основного та допоміжного обладнання проводять насиченою водяною парою за температури 135 °С протягом 1-2 год. Конденсат стікає в нижню частину обладнання і видаляється через нижній штуцер. По завершенні процесу стерилізації штуцер відведення конденсату перекривають і подають стерильне повітря, яке заповнює ущільнюючий пристрій. Конденсат і вторинну пару направляють до ділянки переробки відходів.

*ДР 2. Підготовка стерильного повітря*

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

37

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Технологічне аераційне повітря в біотехнологічному виробництві є джерелом лімітуючого субстрату – кисню, а також слугує джерелом енергії за перемішування культуральної рідини. За допомогою аерації повітрям в біореакторі підтримують та регулюють рівень СО2.

*ДР 2.1. Забір повітря з атмосфери*

Забір повітря проводять з атмосфери за допомогою трубчастих конструкцій, які розташовуються в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю. Стандартна висота труби становить 10 м, діаметр труби – 30 cм. На даному етапі повітря проходить крізь решітку, встановлену у повітропроводі, для видалення крупних часток – листя, гілок та ін.

*ДР 2.2 Попереднє очищення від механічних частинок*

Перед подачею повітря до фільтру попередньої очистки, контролюють рівень відносної вологи за допомогою психрометра. Для цього здійснюють відбір проби, після чого за показниками різниці термометрів у психрометра визначають рівень відносної вологи, і, за необхідності, за таблицями визначають рівень абсолютної вологи. Контролювати рівень вологості повітря необхідно для подовження терміну роботи фільтрів.

Вимірювання рівня біологічної контамінації повітря здійснюється за допомогою імпактора «Флора-100». Для цього апаратом відбирають пробу повітря певного об’єму, після чого відбувається осадження мікроорганізмів на чашку Петрі зі щільним поживним середовищем. Після культивування мікроорганізмів визначають кількісний вміст КУО (колонієутворюючих одиниць) на 1 м3 повітря. Даний показник не повинен перевищувати допустиму норму для кожного класу чистоти виробничих приміщень.

Фільтр попередньої очистки від механічних частинок складається із гофрованих сіток конструкції Рекка. На даному етапі видаляються частинки розміром від 5 мкм.

*ДР 2.3 Стиснення повітря на турбокомпресорі*

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

38

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Відбір проби повітря для визначення мікробіологічної чистоти також здійснюють після виходу повітря з фільтру попередньої очистки. Після цього фіксують показники чистоти повітря на вході і виході з фільтру, визначають ефективність очистки та порівнюють її із заявленою.

Після попередньої очистки повітря направляють у турбокомпресор, який стискає повітря до тиску 0,2 МПа, повітря нагрівається до 200 °С на виході. Тиск контролюють за допомогою манометра, а вимір швидкості потоку повітря в системі здійснюють за допомогою анемометра крилатого. Даний вид анемометра дає змогу фіксувати найменший рівень змін швидкості потоків повітря.

*ДР 2.4 Охолодження повітря*

Повітря охолоджується до температури нижче 40 °С в теплообміннику (холодильнику), оскільки культивування гемопоетичних стовбурових клітин передбачає підтримку температури температури на рівні 37 °С. Для контролю процесу встановлений датчик температур та манометр для контролю рівня тиску в апараті. Також здійснюється контроль вологості повітря за допомогою психрометра, оскільки існує залежність температури повітря від вологості.

*ДР 2.5 Конденсація вологи*

Для відділення вологи повітря подають у ресивер. Дана операція запобігає передчасному виходу з ладу головного та індивідуального фільтрів, у яких використовується тканина Петрянова.

*ДР 2.6 Стабілізація термодинамічних показників повітря*

Повітря направляють в теплообмінник, де відбувається стабілізація основних показників – здійснюється підігрів до необхідної температури за допомогою термопари.

*ДР 2.7 Очищення повітря в головному фільтрі*

Перед головним фільтром встановлений пробовідбірник для вимірювання рівня відносної вологи повітря за допомогою психрометра. Контроль даного показника є критичним, оскільки головні та індивідуальні фільтри не витримують рівня вологи вище 60%, яка може стати причиною псування та розриву фільтрувальної тканини.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

39

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Після виходу з фільтрів встановлюють анемометр крилатий для виміру рівня витрати повітря. За допомогою нього контролюють рівень подачі повітря в систему і визначають періодичність, з якою необхідно здійснювати заміну фільтрів у системі.

В електростатичних фільтрах передбачено кілька ступенів фільтрації. На стадії попередньої фільтрації вилучаються великі фрагменти контамінантів повітря. Далі в роботу включається стимер, суть роботи якого полягає в уловлюванні і затримці дрібних фракцій забруднень на різнозаряджених алюмінієвих пластинах. Даний етап дає змогу забезпечити ефективність очищення повітряних мас до 95%, адже розмір вловлюваних фрагментів досягає 0,1 мікрона.

*ДР 2.8 Стерилізація повітря в індивідуальному фільтрі*

На останньому етапі очистки повітря направляють в індивідуальні фільтри, встановлені перед кожним біореактором. До та після фільтрів встановлюють пробовідбірники для мікробіологічного та технологічного контролю. До технологічного контролю відносять контроль показників рівня відносної вологості повітря за допомогою психрометра, температури за допомогою термопари, рівень витрати повітря за допомогою анемометра крилатого. Таким чином здійснюється остаточний контроль показників повітря перед подачею його у виробництво.

Контроль мікробіологічної чистоти повітря здійснюється на вході та виході повітря з індивідуального фільтру. За допомогою імпактора «Флора-100» здійснюють л2відбір проб повітря з подальшим осадженням мікроорганізмів на чашку Петрі, культивуванням мікроорганізмів та визначенням їх кількісного вмісту в 1 м3 повітря. Дані порівнюють і визначають відповідність ефективності фільтра заявленій виробником. Показник мікробіологічної чистоти повітря не повинен перевищувати допустиму норму для кожного класу чистоти виробничих приміщень.

ФТО-60 – індивідуальний фільтр біореакторі, призначений для стерилізації аераційного повітря. Продуктивність становить 60 м3/ год, площа поверхні фільтрування – 1 м2. Ефективність очистки повітря після індивідуального фільтру досягає 99,9999%.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

40

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

*ДР 3. Підготовка лабораторного посуду*

*ДР 3.1. Миття лабораторного посуду*

Миття лабораторного посуду проводять вручну, використовуючи миючі засоби та воду з водопроводу за температури 40-60 ℃.

*ДР 3.2. Ополіскування лабораторного посуду*

Ополіскування проводять водою очищеною за температури 30-40 ℃. Ополіскування необхідно повторити три рази.

*ДР 3.3. Сушіння лабораторного посуду*

Для сушіння використовують сушильну камеру із температурою 60 ℃.

*ДР 3.4. Стерилізація лабораторного посуду*

Стерилізацію лабораторного посуду проводять в автоклаві за температури 120℃ протягом 30-40 хвилин. Стерильний посуд зберігають в паперових крафтових пакетах та виймають з індивідуальної упаковки безпосередньо перед початком роботи.

*ТП 4. Виділення мононуклеарної суспензії з периферичної крові людини*

Мононуклеарні клітини з крові людини отримують методом седиментації в градієнті щільності фіколу. Для виділення клітин використовують периферичну кров, відібрану у пацієнта (венозний забір крові). Всі маніпуляції по безпосередній роботі з кров'ю з метою нівелювання ризику контамінації проводять в асептичних умовах у ламінарному боксі.

Виділення стовбурових клітин проводять в одноразових 50 мл центрифужних пробірках. В кожну пробірку вносять по 25 мл фіколу густиною 1,077 г / мл і обережно, за допомогою автоматичного дозатора, нашаровують рівний об'єм крові з антикоагулянтом (співвідношення крові і антикоагулянту в діапазоні 1:1-1:3). Після 20 хвилин центрифугування за 1900 об / хв виходить чіткий поділ крові на 3 фракції: еритроцити, лейкоцити (мононуклеарні клітини) і плазма. Лейкоцити відбирають одноразовим наконечником в одноразову пробірку на 50 мл [22].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

41

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Оцінюють структурну цілісність клітин за допомогою мікроскопії.

*ТП 5. Виділення стовбурових клітин методом магнітної імуносепарації*

*ТП 5.1 Магнітна імуносепарація цільових клітин*

Магнітні наночастинки Dynabeads CD34™ додають безпосередньо до зразка біологічної рідини з ТП 4 з розрахунку 50 мкл магнітних частинок на 1 мл загальної суміші, перемішують та інкубують протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Переносять пробірку (без кришки) в магніт EasySep™ та інкубують протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Під час інкубації CD34+ клітини прикріпляються до стінок пробірки. Видаляють супернатант за допомогою одноразового наконечника. Необхідно повторити процеси сепарації три рази (1 раз протягом 10 хвилин і 2 рази протягом 5 хвилин).

Після цього магнітні частинки відділяють від виділених клітин за допомогою реагенту Detachabeads. Клітини двічі відмивають розчином Хенкса.

Далі отримані клітини ресуспендують в 10 мл середовища IMDM, що містить FBS, L-глутамін і суміш антибіотиків пеніцилін-стрептоміцин [23].

З метою попередження ризику контамінації усі маніпуляції з клітинами проводять в асептичних умовах у ламінарному боксі.

*ТП 5.2 Підрахунок виходу стовбурових клітин, перевірка життєздатності клітин*

Відсоток гемопоетичних стовбурових клітин з фенотипом СD34+ підраховують на проточному цитометрі, використовуючи стандартну методику фенотипування та моноклональні антитіла фірми Caltag Laboratories, USA. Виділена фракція клітин характеризується високим ступенем чистоти. Вихід цільових клітин становить > 85%, збереження життєздатності виділених клітин - 95%. Концентрація ГСК CD34+ становить 45·106 кл/мл [24].

*ТП 6. Культивування стовбурових клітин на чашках Петрі*

Отриману суміш з ТП 5 переносять в стерильну одноразову неадгезивну культуральну чашку Петрі діаметром 10 см і культивують в CO2-інкубаторах Memmert за температури 37 °С у вологій атмосфері з 5% вмістом СО2 протягом 3 діб. Для культивування стовбурових гемопоетичних клітин використовують   
10 мл середовища IMDM з додаванням 20% замінника сироватки BIT 9500™,   
10 мкг / мл пеніциліну, 10 мкг / мл стрептоміцину, 584 мкг / мл L-глутаміну.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

42

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Оптимальна концентрація цитокінів: фактор стовбурових клітин   
(100 нг / мкл), інтерлейкінів 3 (5 нг / мкл) і 6 (10 нг / мкл), а також тромбопоетину (50 нг / мкл) [10].

Після закінчення часу культивування морфологію виділених клітин оцінюють за допомогою фазово-контрастної мікроскопії на інвертованому мікроскопі. Виділені мононуклеари повинні бути невеликими за розміром округлими клітинами.

Дана стадія відноситься до критичних точок виробництва, тому параметри можуть бути критичними і знаходяться в діапазоні: t=37±1ºС, рН=7,1-8,5. Під час даної стадії виконують мікробіологічний, хімічний та технологічний контроль. Для перевірки мікробіологічної чистоти та відповідності нормам біохімічних властивостей стовбурових клітин проводять відбір проб під час пасажування. Морфологічні ознаки та концентрацію ГСК перевіряють за допомогою мікроскопії та підрахунку в камері Горяєва, відсутність контамінантів визначають методом прямого посіву на поживне середовище МПА в чашці Петрі. За необхідності використовують метод Коха (розведення в 10, 100, 1000 і т.ін. разів). Чашки Петрі поміщають у термостат за температури 37 ºС на 24 години. Візуально перевіряють відсутність сторонньої мікрофлори.

*ТП 7. Пасажування (пересів) гемопоетичних стовбурових клітин*

Кожні 2 дні проводять процедуру пересівання клітин. Для цього із чашок Петрі з культурою видаляють старе культуральне середовище, після чого додають 10 мл свіжого ПС. Клітини ретельно ресуспендують піпетуванням та підраховують в камері Горяєва, необхідну кількість клітин переносять в чистий культуральний флакон або чашку Петрі з аналогічним середовищем. Культивування проводять за температури 37 °С у вологій атмосфері з 6 % вмістом СО2.

Здійснюють 2-3 пасажі для отримання біомаси із вмістом 95 % стовбурових клітин.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

43

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Відсоток CD34+ клітин оцінюють методом проточної цитометрії відповідно до протоколів виробників і внутрішніх СОП. Для забарвлення використовують антитіла до CD34 (BD Biosciences) і CD133 (Miltenyi Biotec).

Оцінка життєздатності клітин здійснюють за допомогою фарбування клітин розчином трипанового синього. Трипановий синій здатний проникати всередину клітини у разі пошкодження мембрани і фарбувати її ядро в синій колір. Пофарбовані клітини вважають нежиттєздатними [23].

Концентрація клітин після останнього пасажу повинна становити   
5∙103 кл / мл. Життєздатність клітин – не менше 95 %.

*ТП 8. Кріоконсервація первинних культур клітин*

Клітини за необхідності заморожують в спеціальному середовищі, що містить кріопротектор диметилсульфоксид (ДМСО): 10 % ДМСО та 90 % FBS.

Клітини забирають із чашки Петрі, доводять концентрацію до 1∙106 кл / мл, переносять 1 мл клітинної суспензії в кріопробірки, які поміщають в контейнер для заморожування з ізопропанолом. Контейнер ставлять на 24 години в морозильну камеру за температури мінус 80 °С, після чого переносять кріопробірки з контейнера в кріосховище з рідким азотом для зберігання за температури мінус 196 °С [25].

Заморожування аліквот гемопоетичних стовбурових клітин у рідкому азоті слід проводити на регулярній основі для підтримки надійних запасів клітин.

*ТП 9 Культивування ГСК у біореакторі*

Перед початком культивування апарат та комунікації піддають перевірці на герметичність. Вентилі перевіряють гідравлічним пресуванням за тиску   
0,3 МПа. Герметичність з'єднань перевіряють за надмірного тиску пари 0,15-  
0,2 МПа.

Для культивування гемопоетичних стовбурових клітин використовують готове безсироваткове синтетичне стерильне поживне середовище PluriSTEM® (SCM130, SCM132) з L-глутаміном, гентаміцином і фенолом червоним. Середовище є повноцінним і не потребує подальшого доповнення цитокінінами. Нагрівають середовище на водяній бані до 37 °C протягом 30-60 хвилин. Не рекомендується тримати ПС на водяній бані більше 1 години та за температури, що перевищує 37 °C, оскільки тривалий вплив високої температури знизить ефективність факторів росту.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

44

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Суспензію клітин із ТП 7 з концентрацією 5∙103 кл / мл вносять у біореактор (20∙106 кл / 4 л середовища), після чого додають 4 л готового стерильного поживного середовища. Культивування проводять у біореакторі BioFlo 320 (Україна) циліндричної форми зі сферичними днищем і кришкою, робочий об’єм якого становить 0,01 м3, внутрішній діаметр – 250 мм. Біореактор оснащений механічним перемішуючим для гомогенізації середовища – лопатевою мішалкою, а також барботером, який забезпечує аерацію середовища та підтримку рО2. Апарат забезпечений усіма необхідними датчиками контролю параметрів культивування, системою піногасіння, відбору проб, регулятором швидкості обертання мішалки, датчиками pH і pO2, системою аерації з 4 інтегрованими ротаметрами і 2 регуляторами масової витрати газу для поверхневої аерації.

Культивування ГСК відбувається за температури 37 °С, рН 7,1-8,5, із 6% вмістом СО2 і 90 % відносної вологості протягом 4-5 днів.

Температурний режим культивування підтримують за рахунок подачі теплоагента у сорочку біореактора. В процесі виробничого культивування постійно відбувається вимірювання і регулювання рН культуральної рідини до показників 7,1-8,5 за рахунок додавання порції свіжого поживного середовища, оскільки під час росту культура здатна підвищувати кислотність середовища. Для визначення показника рН передбачено монтаж приймального пристрою для вимірювання фізико-хімічного складу та якості культуральної рідини. Тиск повітря в біореакторі 0,04-0,05 МПа, швидкість обертів мішалки n=10 об/хв [18].

Клітинний цикл гемопоетичних стовбурових клітин становить приблизно 18-20 годин, а колонії стовбурових клітин (тривимірні структури) повинні бути помітні на 3-4 день. Під час культивування необхідно контролювати, щоб дві або більше колонії не зливалися або не змішувалися, оскільки це може викликати диференціацію клітин.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

45

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Про закінчення культивування свідчить підвищення концентрації клітин до 5∙104 кл / мл. Контроль та підрахунок концентрації клітин здійснюють відбором проб та підрахунком в камері Горяєва.

Відсоток гемопоетичних стовбурових клітин з фенотипом СD34+ підраховують на проточному цитометрі, використовуючи стандартну методику фенотипування та моноклональні антитіла фірми Caltag Laboratories. Перевіряють життєздатність клітин, а також мікробіологічну чистоту суспензії прямим висівом на чашки Петрі із середовищем МПА [26].

Протягом всього процесу біосинтезу проводять технічний, мікробіологічний і хімічний контроль для запобігання порушень умов культивування.

Для контролю температури в кожусі апарату передбачено монтаж термометру, який представляє собою пристрій для вимірювання температури, встановлений за місцем. Для контролю тиску в апараті встановлюють прилад для вимірювання тиску. Для перевірки мікробіологічної чистоти та відповідності нормам біохімічних властивостей клітин встановлено пробовідбірник.

Морфологічні ознаки та концентрацію ГСК перевіряють за допомогою мікроскопії та підрахунку в камері Горяєва, відсутність контамінантів визначають методом прямого посіву на поживне середовище МПА в чашці Петрі. За необхідності використовують метод Коха (розведення в 10, 100, 1000 і т.ін. разів). Чашки Петрі поміщають у термостат за температури 37 ºС на 24 години. Візуально перевіряють відсутність сторонньої мікрофлори.

Також передбачено встановлення пробовідбірника на місцевому трубопроводі після фільтра тонкої очистки для перевірки ефективності стерилізації повітря, що подається через барботер для гомогенізації культуральної рідини та підтримки концентрації СО2 на рівні 5-6 % [27].

Для оцінки здатності гемопоетичних стовбурових клітин до проліферації використовують спеціальні поживні середовища з точним вмістом рекомбінантних цитокінів, що необхідно для достовірної оцінки *in vitro* здатності ГСК до проліферації. Поживне середовище StemMACS HSC Expansion Cocktail (# 130-100-843) містить комбінацію рекомбінантних людських цитокінів, склад яких підібраний для підтримки проліферації гемопоетичних клітин-попередників людини. До його складу входять: рекомбінантний людський FltS-ліганд, рекомбінантний людський фактор стовбурових клітин (SCF) і рекомбінантний тромбопоетин. Подібна комбінація цитокінів індукує проліферацію ГСК і незрілих попередників [28].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

46

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

1 мл суспензії клітин відбирають через пробовідбірник, переносять у стерильну одноразову неадгезивну культуральну чашку Петрі і культивують у термостаті за температури 37 °С у вологій атмосфері з 5% вмістом СО2 протягом 14 діб. Принциповим недоліком даного методу культивування є тривалість отримання результатів аналізу – два тижні. Однак отримані результати мають клінічне значення, оскільки характеризують проліферативний потенціал ГСК. Для успішного відновлення кровотворення у пацієнта необхідно трансплантувати 1-2 ∙ 106 кл / кг маси тіла.

*ПМВ 10. Пакування та маркування препарату*

Для кріоконсервації ГСК клітини з ТП 9 доводять до концентрації   
2 ∙ 107 клітин / мл, суспендують у реагенті для заморожування клітин (30% FBS, 10% DMSO, 60% DMEM). Варто зазначити, що використання готового кріопротектора дає змогу виключити ризик контамінації препарату [29].

Розлив у кріопакети або контейнери (пробірки) відбувається в асептичних умовах в ламінарному боксі. Заготовлений трансплантаційний матеріал, обсяг якого в різних випадках може становити від 200 до 8000 мл, рівномірно розподіляють по декількох кріопакетах або пробірках ємністю 50 - 100 мл. Це дає змогу убезпечити від втрати весь обсяг трансплантаційного матеріалу у разі випадкової розгерметизації одного з пакетів.

Слід зазначити, що на етикетці пакету із заготовленим матеріалом, рекомендується крім ідентифікаційного коду, відображати таку інформацію: ПІБ хворого; групу крові за системою АВО, резус-приналежність; найменування компонента крові (гемопоетичні стовбурові клітини); обсяг компонента; дата заготовки; найменування медичної організації.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

47

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Для етикетки кріопакетів, в якому буде міститися заморожений аутотрансплантат (відповідно до Наказу МОЗУ від 17.12.2013 № 1093 «Про затвердження Інструкції з виготовлення, використання та забезпечення якості компонентів крові») рекомендується, крім вище описаної інформації, вказати додатково: обсяг компонента в кріопакетах; найменування кріопротектора; обсяг кріопротектора, його концентрацію; дату заморожування і температуру зберігання; позначку «тільки для аутологічної трансфузії» [30].

*ТП 11. Кріоконсервація гемопоетичних стовбурових клітин*

Кріопакети з ПМВ 10 переносять в морозильний кріоконтейнер Frosty, наповнений ізопропанолом. Залишають морозильний контейнер Frosty в морозильній камері за температури мінус 80 °C на 24 год, після чого переносять кріопакети з контейнера в кріосховище з рідким азотом для тривалого зберігання препарату за температури мінус 196 °С [29, 30].

*ЗВ 12. Знешкодження відходів*

Знешкодження відходів – зменшення чи усунення небезпечності відходів шляхом механічного, фізико-хімічного чи біологічного оброблення. Знешкодження відходів здійснюється відповідно до наказу «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами» [31].

Система поводження з відходами складається з таких етапів:

* збирання та сортування відходів;
* маркування відходів;
* знезараження (дезінфекція) відходів;
* транспортування і перенесення відходів у корпусні / міжкорпусні (накопичувальні) контейнери в межах закладу, де вони утворюються;
* утилізація відходів (тих, що можуть підлягати утилізації);
* захоронення відходів (лише для відходів категорії А).

Відходи даного виробництва належать до відходів типу В – епідемічно небезпечні медичні відходи (червоне маркування). Наповнені пакети або контейнери після первинного збирання заливають дезінфікуючим розчином, герметизують, позначають біркою для маркування, переміщують в накопичувальні контейнери, що закриваються кришкою.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

48

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Найбільш розповсюджені способи знешкодження медичних відходів: спалювання (інсинерація); обробка парою за високих температур під тиском (автоклавування); обробка дезінфекційними розчинами (хімічний метод) [31].

*ПВ 13. Переробка відходів*

На даній стадії здійснюють технологічні операції, що пов'язані зі зміною фізичних, хімічних чи біологічних властивостей відходів, з метою підготовки їх до екологічно безпечного зберігання, перевезення, утилізації чи видалення. Ці процеси забезпечують екологічну чистоту виробництва.

Для конденсату, що утворюється під час стерилізації посуду та обладнання під час санітарної підготовки виробництва, проводять регенерацію і знову використовують у виробництві або спрямовують у виробничі відходи.

**3.3 Характеристика кінцевої продукції**

Характеристика кінцевої продукції виробництва:

1. Назва продукції. Ізольована лінія гемопоетичних стовбурових клітин з крові.

2. Категорія та номер чинного нормативно-технічного документу на продукцію. Препарат відповідає Наказу МОН «Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань» [32].

3. Призначення продукції та можливі галузі використання.

Для успішного відновлення кровотворення у пацієнта необхідно трансплантувати 1-2∙106 клітин / кг маси тіла. Об’єм рідини, у якому буде міститися задана кількість клітин, визначається лікарем індивідуально для кожного пацієнта залежно від діагнозу, ступеня пошкодження тканин чи органів, місця введення та кількості інфузій, передбачених планом лікування.

Лікування гемопоетичними стовбуровими клітинами може ґрунтуватися як на їх внутрішньовенному введенні подібно лікарському препарату, так і на безпосередньому введенні в пошкоджені тканини чи органи. Також відомий метод введення стовбурових клітин безпосередньо в коронарні судини (у разі ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда), що отримав назву клітинна кардіоміопластика.

Клітинна терапія може проводитися як в монотерапії, так і доповнюючи хірургічне або медикаментозне лікування. Метод введення ГСК пацієнту визначається лікарем.

4. Стислий опис зовнішнього вигляду та фізико-хімічних характеристик продукції. Препарат ізольованої лінії стовбурових клітин для аутотрансплантації представляє собою непрозору суспензію ГСК від червоного до рожево-жовтого кольору в середовищі культивування у пробірках або кріоконтейнерах, можливий осад. Кінцевий продукт містить близько 2 ∙ 107 клітин / мл. Для кріоконсервації препарат суспендують у реагенті для заморожування клітин (30% замінника FBS, 10% DMSO, 60% DMEM).

Культивовані аутологічні ГСК передають лікарю, який виконує трансплантацію не пізніше ніж через 30 хв після трипсинізації. На кожен зразок заповнюють паспорт зразка стовбурових клітин для терапії, що містить таку інформацію:

1. Тип клітин.

2. Дата заготовки.

3. Тривалість культивування.

4. Кількість пасажів.

5. Чи піддавалися клітини кріоконсервуванню: так / ні (якщо так, то вказати таке): дата кріоконсервування; концентрація клітин під час кріоконсервування; дата розморожування.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

49

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

6. Дата та результати бактеріального посіву.

7. Дата та результати імунофенотипування.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

50

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

8. Життєздатність клітин.

9. Загальна кількість клітин у зразку.

10. Обсяг зразка.

11. Середовище розведення (серія).

12. Дата та час видачі зразка.

Паспорт підписують лікар лабораторної діагностики, який підготував зразок до трансплантації, та лікар-фахівець, який виконує трансплантацію [33].

Препарат ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин не токсичний для пацієнта, не викликає алергічних реакцій чи запальних процесів, оскільки в технології виробництва препарату передбачена заміна ембріональної бичачої сироватки на синтетичний аналог для унеможливлення потрапляння тваринних клітин або їх компонентів в організм людини; препарат не викликає реакції відторгнення або явища «трансплантат проти господаря», оскільки пацієнту вводять власні клітини (аутотрансплантація).

**3.4 Контроль виробництва**

Для забезпечення відповідності готової продукції вимогам нормативно-технічної документації на підприємстві забезпечується постадійний контроль виробництва.

У таблиці 3.2 наведено перелік контрольних точок виробництва препарату ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин, що забезпечують виконання технологічного режиму. У процесі виробництва препарату контролюють відповідність основної, допоміжної сировини та матеріалів вимогам НТД, санітарний стан виробничих приміщень та робочих місць, виконання регламентованих технологічних операцій і виконання технологічних режимів роботи.

Таблиця 3.2 – Перелік контрольних точок

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

51

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

| **Назва стадії та номер контрольної точки** | **Об’єкт контролю та показник, що вивчається** | **Метод контролю** | **Періодичність перевірки** | **Нормативн.хар-ка показника** |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| ДР 1.1. Підготовка води технологічної та води питної  Кт 1.1.1 | Органолептичні показники води питної | Фотоколориметрія | Кожну операцію | Відповідно до вимог |
| Км 1.1.2 | Мікробіологічна чистота | Висів на чашки Петрі | Кожну операцію | Колі-індекс не більше 3 |
| ДР 1.2.  Приготування миючих та дезінфікуючих розчинів  Кт 1.2.1 | Миючі властивості | Візуально, ваги, мірний посуд | Кожну операцію | Відповідно до вимог |
| Кх 1.2.2 | Концентрація етилового спирту | Ваги, мірний посуд | Кожну операцію | 76% |
| ДР 1.3.  Підготовка одягу  Кт 1.3.1 | Чистота та цілісність одягу | Візуально | Кожну операцію | Відповідно до вимог |
| ДР 1.5.  Підготовка виробничих приміщень  Кт 1.5.1 | Чистота приміщень | Візуально | Кожну операцію | Відповідно до вимог |
| ДР 1.6. Підготовка обладнання та комунікацій  Кт 1.6.1 | Температура, тривалість, тиск | Регулятор температури, годинник, манометр | Кожну операцію | 80-135º С,  0,5-1 год,  0,5-1 МПа |
| Км 1.6.2 | Мікробіологічна чистота | Висів на чашки Петрі | Кожну операцію | Не більше 3,5·106 КУО |
| ДР 2. Підготовка стерильного  повітря  Кт 2.1 | Вміст часток | Пробовідбірник | Кожну операцію | Не більше 3,5 млн/м3 |
| Кт 2.2 | Вологість | Психрометр | Кожну добу | 75% |
| Кт 2.3 | Температура | Термометр | Кожну операцію | 30ºС |
| Км 2.4 | Мікробіологічна чистота | Висів на чашки Петрі | Кожну операцію | Відсутність контамінантів |
| ДР 3. Підготовка лабораторного посуду  Кт 3.1 | Лабораторний посуд | Візуально | Кожну операцію | Відсутність дефектів |
| Кт 3.2 | Температура, тривалість стерилізації | Термометр, годинник | Кожну операцію | 120℃,  30-40 хв |
| ТП 4. Виділення мононуклеарної суспензії з периферичної крові  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  52  *ДП 0108.00.000 ПЗ*  Кх 4.1 | Градієнт щільності Фікол | рН-метр | Кожну операцію | Відповідно до НТД |
| Кт 4.2 | Швидкість обертів, тривалість | Центрифуга | Кожну операцію | 1900 об / хв, 20 хв |
| ТП 5. Виділення стовурових клітин методом магнітної імуносепарації  Кх 5.1 | Концентрація магнітних частинок | Автоматичний дозатор | Кожну операцію | 50 мкл на 1 мл загальної суміші |
| Кт 5.2 | Тривалість, температура | Годинник, термометр | Кожну операцію | 30 хв, 21 ºС |
| ТП 6. Культивування стовубрових клітин на чашках Петрі  Км 6.1 | Мікробіологічна чистота,  Морфологія клітин | Висів на чашки Петрі, мікроскопіювання | Під час процесу | Відсутність сторонньої мікрофлори,  невеликі округлі клітини |
| Кт 6.2 | Температура | Термометр | Під час процесу | 37 ºС |
| Кт 6.3 | Тривалість | Годинник | Кожну операцію | 3 доби |
| Кт 6.4 | Вміст СО2 | Датчик вимірювання СО2 | Під час процесу | 5 % |
| ТП 7. Пасажування (пересів) гемопоетичних стовбуровиї клітин  Км 7.1 | Мікробіологічна чистота,  Морфологія та концентраціяклітин | Висів на чашки Петрі, мікроскопіювання, підрахунок у камері Горяєва | Під час процесу | Відсутність контамінантів,  невеликі округлі клітини, 5∙103 кл/мл |
| Кт 7.2 | Температура | Термометр | Під час процесу | 37 ºС |
| Кт 7.3 | Періодичність | Годинник | Кожну операцію | Кожні 48 год |
| Кт 7.4 | Вміст СО2 | Датчик вимірювання СО2 | Під час процесу | 5 % |
| Км 7.5 | Життєздатність клітин | Мікроскопія, трипановий синій | Кожну операцію | Не менше 95 % |
| ТП 8. Кріоконсервація первинних культур клітин Км 8.1  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  53  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | Мікробіологічна чистота  Концентрація клітин | Висів на чашки Петрі  Підрахунок в камері Горяєва | Перед заморозкою | Відсутність сторонньої мікрофлори  1∙106 кл / мл |
| Кх 8.2 | Склад кріопротектора | Автоматичний дозатор | Під час процесу | 10% ДМСО та 90% FBS |
| Кт 8.3 | Температура, тривалість | Термометр | Під час процесу | -80 ºС на 24 год,  зберігання при - 196 ºС |
| ТП 9. Культивування ГСК у біореакторі  Км 9.1 | Мікробіологічна чистота,  Морфологія, концентрація клітин | Висів на чашки Петрі, мікроскопіювання, підрахунок в камері Горяєва | Під час процесу | Відсутність контамінантів,  округлі клітини, 5∙104 кл/мл |
| Кт 9.2 | Температура | Термометр | Під час процесу | 37 ºС |
| Кт 9.3 | Тривалість | Годинник | Кожну операцію | 4-5 днів |
| Кт 9.4 | Вміст СО2 | Датчик вимірювання СО2 | Під час процесу | 6 % |
| Кт 9.5 | рН | рН-метр | Під час процесу | 7,1 – 8,5 |
| Км 9.6 | Життєздатність клітин | Мікроскопія, трипановий синій | Після культивування | Не менше 95 % |
| ПМВ 10. Пакування та маркування препарату  Кт 10.1 | Наповнення, правильність  маркування | Візуально | Кожну операцію | 50 - 100 мл, згідно з паспортом препарату |
| Км 10.2 | Концентрація клітин | Підрахунок у камері Горяєва | Під час процесу | 2∙107 кл / мл |
| Кх 10.3 | Склад кріопротектора | Автоматичний дозатор | Під час процесу | 30% FBS, 10% DMSO, 60% DMEM |
| Кт 10.4 | Колір та зовнішній вигляд | Візуально | Кожну операцію | Непрозора суспензія від червоного до рожево-жовтого кольору |
| ТП 11. Кріоконсервація гемопоетичних стовбурових клітин  Кт 11.1 | Температура, тривалість | Термометр | Під час процесу | -80 ºС на 24 год,  зберігання при - 196 ºС |

**3.5 Матеріальний баланс**

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

54

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Матеріальний баланс стадій виробничого культивування, пакування та маркування препарату наведено у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Матеріальний баланс стадій культивування ГСК, пакування та маркування препарату

| **Використано** | | | | **Отримано** | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів** | **Кількість** | | | **Назва сировини, матеріалів, напівпродуктів** | **Кількість** | | |
| **кг** | **шт** | **мл** | **кг** | **шт** | **мл** |
| **ТП 9. Культивування ГСК у біореакторі** | | | | | | | |
| Готове стерильне поживне середовище |  |  | 4000 | Культуральна рідина ГСК |  |  | 4180 |
| Суспензія клітин |  |  | 200 |
| Стерильне аераційне повітря |  |  | 4000 | Відпрацьоване повітря |  |  | 4000 |
| Моноклональні антитіла |  |  | 0,05 | Суспензія клітин із антитілами |  |  | 1,05 |
| Суспензія клітин для фенотипування |  |  | 1 |
| ПС для перевірки проліферації |  |  | 20 | Суспензія клітин у чашці Петрі |  |  | 21 |
| Суспензія клітин |  |  | 1 | Втрати |  |  | 20 |
| Чашки Петрі |  | 10 |  | Чашки Петрі із ПС |  | 10 |  |
| Пробірки |  | 2 |  | Пробірки із суспензією клітин |  | 2 |  |
| Одноразові наконечники для дозаторів |  | 15 |  | Використані наконечники |  | 15 |  |
| Всього |  | 27 | 8222,05 | Всього |  | 27 | 8222,05 |
| **ПМВ 10. Пакування та маркування препарату** | | | | | | | |
| ГСК із концентрацією  2∙107 кл / мл |  |  | 1000 | Суспензія клітин із кріопротектором |  |  | 2000 |
| Кріопротектор |  |  | 1000 |
| Кріопробірки |  | 20 |  | Кріопробірки із препаратом |  | 20 |  |
| Кріопакети |  | 10 |  | Кріопакети із препаратом |  | 10 |  |
| Етикетки |  | 30 |  | Етикетки на кріопробірках та кріопакетах |  | 30 |  |
| Всього: |  | 60 | 2000 | Всього: |  | 60 | 2000 |

**РОЗДІЛ 4 РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ**

Зм.

Арк.

№ документу

Підпис

Дата

Аркуш

55

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консультант

Саблій Л.А.

Керівник

Маринченко Л.В.

Затвердив

РОЗДІЛ 4. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

**4.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату**

Для даного дипломного проекту було обрано розробку біореактора для стадії культивування виробництва препарату ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин з крові.

Конструкція біореактора визначається рядом факторів: агрегатним станом реагуючих речовин, продуктів і консистенції середовища, інтенсивністю перемішування, аерації, температурою процесу культивування і тиском в апараті, тепловим ефектом та інтенсивністю теплообміну, хімічними властивостями компонентів, продуктивністю апарату, зручністю монтажу і ремонту апарата, простотою його виготовлення та установки і т. ін. [34].

За обраною технологією культивування ГСК проводять у біореакторі BioFlo 320 (Україна) циліндричної форми зі сферичними днищем і кришкою, робочий об’єм якого становить 0,01 м3, внутрішній діаметр – 250 мм. Біореактор оснащений механічним перемішуючим пристроєм для гомогенізації середовища, а також барботером, який забезпечує аерацію середовища та підтримку рО2. Апарат забезпечений усіма необхідними датчиками контролю параметрів культивування, системою піногасіння, відбору проб, регулятором швидкості обертання мішалки.

Культивування гемопоетичних стовбурових клітин – це екзотермічний процес, але питоме тепловиділення невелике. Щоб підтримувати задану температуру культивування (37 °С), культуральну рідину підігрівають за допомогою рубашки реактора.

Істотним недоліком барботажних біореакторів є нерівномірність концентрацій клітин по висоті апарата. Тому в нижніх шарах середовища, де концентрація клітин найменша, є надлишок розчиненого кисню, а у верхніх його нестача [35]. Для компенсації цього недоліку в апарат встановлюється механічний перемішуючий пристрій.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

56

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Перемішування культуральної рідини в біореакторах може бути здійснено лопатевими, якірними, рамними, турбінними або трьохлопатевими мішалками. За швидкістю обертання мішалки умовно поділяють на тихохідні (якірні та ін., у яких колова швидкість кінців лопатей зазвичай не перевищує 1 м/с) і швидкохідні (гвинтові, турбіні та інші, у яких вказана швидкість найчастіше не менше 10 м/с) [36]. Для гомогенізації культуральної рідини та уникнення утворення конгломератів клітин було обрано реактор із механічним перемішуючим пристроєм – лопатевою мішалкою.

Для приведення в рух лопатевої мішалки в реакторі встановлені приводи, де як рухому силу використовують електроенергію або магнітні сили. Для культивування стовбурових клітин найчастіше використовують магнітний привод мішалки із швидкістю до 300 об / хв.

Матеріали, з яких виготовляють конструктивні елементи біореакторів, повинні забезпечувати міцність і стійкість даних елементів, бути хімічно інертними, нетоксичними та корозійностійкими, а також витримувати обробку дезінфікуючими засобами та стерилізацію. Конструктивні елементи біореактора Techfors S виготовляють із нержавіючої сталі 316 L. Для забезпечення герметичності апарату використовують торцеві ущільнення, які дають змогу попередити втрату робочого середовища з апарата та не допускають потрапляння повітря в апарат [37].

На кришку апарату встановлюють виносний індивідуальний привод мішалки. Для аерації культуральної рідини біоректор забезпечений кільцевим барботером із повітророзподільною системою та трубкою для підведення повітря в барботер. Реактор має рубашку з нержавіючої сталі, в яку подають воду для нагрівання середовища і підтримання у реакторі постійної температури   
(37 °С).

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

57

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

У нижній частині апарату встановлені трубопроводи – для зливу культуральної рідини і каналізаційний. Біореактор повинен бути герметичним та з можливістю стерилізації для забезпечення асептичних умов культивування [38].

**4.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки**

**4.2.1 Конструктивний розрахунок біореактора**

Розрахунок проводили за методикою Ружинської Л.І. «Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв» [37].

Номінальний об’єм апарата:

За ГОСТ 20680-2002 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Типы и основные параметры» було обрано номінальний об’єм 0,01 м3.

Обраний апарат з еліптичним днищем і еліптичною знімною кришкою.

D*вн* = 250 мм – внутрішній діаметр;

Висота корпусу Н = 220 мм;

Розрахуємо днище апарату. Висоту еліптичної частини днища реактору визначимо за формулою:

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 «Днища эллиптические отбортованные стальные для сосудов, аппаратов и котлов. Основные размеры» знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату:

Висота основи еліптичного днища ;

Товщина стінки еліптичного днища ;

Внутрішня поверхня еліптичного днища ;

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

58

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Об’єм еліптичного днища ;

Маса еліптичного днища .

Повна висота днища: *=*+ = 55 + 220 = 275 мм.

Об’єм циліндру конструкції:

Висота циліндра:

Для даного апарату стандартна рубашка має площу теплообміну   
*F* = 0,16 м2. Її висота складає, згідно з ГОСТ 26-01-984-74 «Рубашки неразъемные с эллипсоидным днищем стальных сварных сосудов и аппаратов. Основные параметры и размеры»: .

**4.2.2 Розрахунок перемішуючого пристрою**

Для перемішування середовища обрано відкриту лопатеву мішалку.

Діаметр даної мішалки визначаємо за формулою:

Обираємо стандартну лопатеву мішалку. Стандартне значення діаметра мішалки визначаємо за ГОСТ 20680-2002 «Аппараты с механическими перемешивающими устройствами вертикальные. Типы и основные параметры»:

Розрахуємо геометричні розміри мішалки. Висота перемішуючого пристрою:

Відстань до днища апарату:

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

59

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Приймаємо h = 80 мм.

Ширина лопасті:

Ширина перегородки:

Обираємо діаметр вала мішалки з АТК 24.201.17-90 «Мешалки  
типы, параметры, конструкция, основные размеры и технические  
требования»: dв=18 мм.

Для ущільнення валу мішалки обираємо торцьове ущільнення. Обираємо двигун з номінальною потужністю Маркування АИР 132М4.

**4.2.3 Розрахунок барботера**

Розрахунок проводили за методикою Соколов В.Н. «Машины и аппараты химических производств» [39].

Апарат об’ємом 0,01 м3, діаметром 250 мм, діаметр мішалки 80 мм.

Приймемо приведену швидкість кисню в апараті ωр=0,04 м/с, отримаємо його витрату:

*Vp* = (3,14/0,01) · 0,252 ·0,04 = 0,785 м3/c

Діаметр труби барботера за швидкості газу в ній ωб=25 м/с буде:

*dб* =

Середній діаметр барботеру:

*Dср* = 1,75 *dm* = 1,75 · 80 = 140 мм

**4.2.4 Тепловий розрахунок**

В процесі нагрівання середовища в біореакторі теплова енергія підводиться теплоносієм, що поступає в теплообмінний пристрій апарата (сорочку). Нагріванням, спричиненим культивуванням, нехтуємо.

Теплота, що надходить в середовище в реакторі у разі нагрівання:

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

60

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

,

де mc – маса середовища; Сср1 – питома теплоємність середовища в апараті за середньої температури нагрівання; tK1 – кінцева температура в середовищі (тут: задана температура середовища в апараті tc1 = 37 oC), tH1 – початкова температура середовища (приймаємо кімнатну температуру 20оС).

Маємо масу середовища:

Середня температура нагрівання:

Теплота, що витрачається на нагрівання реактора:

,

де ma – маса реактора, 25 кг; Са − питома теплоємність матеріла, з якого виготовлений реактор (для вуглецевих сталей *С*а = 500); tKa та tHa – початкова і кінцева температури реактора у разі нагрівання, (приймаємо початковою температуру середовища на початку процесу, тобто tHa = 20) ; tKa – приймаємо за 37

Теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

Втрати теплоти в навколишнє середовище під час нагрівання:

Рівняння теплового балансу:

Далі розрахунок проводили за методикою Колосков С. П. «Оборудование ферментной промышлености» [40].

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

61

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

t1=40 ℃ – температура води на вході в сорочку; t2=37 ℃ – температура води на виході із сорочки.

Тепло, що підводиться водою:

*Qвод= Qа – Qвтр*= 212 – = 192,62 кДж

Витрати води для підводу тепла:

Для апаратів із сорочками з перемішуванням мішалкою коефіцієнт тепловіддачі від перемішуючої рідини до стінки визначають за рівнянням:



Критерій Нусельта: 



Звідси коефіцієнт тепловіддачі від рідини, що перемішується, до стінки :

В’язкість середовища:  = 1,55‧10-3 Па·с

Густина середовища: ρс = 1050 кг/м3

Питома теплоємність середовища: сс = 4186 Дж/кг·℃

Теплопровідність середовища: λ= 0,6 Вт/м·℃

Внутрішній діаметр біореактора: Dвн=0,25 м

Діаметр мішалки: dм =0,08 м

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

62

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Число обертів мішалки: n=10

Розрахуємо коефіцієнт тепловіддачі від води до стінки апарата.

Знайдемо середню температуру стінки апарата:

Тоді різниця температур:

де *tсp*- середня різниця температур теплоносія .

Тоді відповідно :

де  – коефіцієнт, який відповідає значенню середньої температури води; *Нр*= 0,088 м – рівень рідини в апараті.

Критерій Нусельта:

де *С*, *a* – коефіцієнти при *Gr*Pr < 109, *С* = 0,54; *а* = 0,25.

Коефіцієнт тепловіддачі від стінки апарата до води :

де *λв* = 0,6 *Вт/м∙К* – теплопровідність води; *Нруб* = 0,234 м – висота рубашки.

Розрахуємо термічний опір стінки апарата:

Товщина стінки біореактора: S = 0,008 м, коефіцієнт тепловіддачі стінки біореактора: λ=58,15 Вт / м·℃.

Розрахуємо необхідну поверхню теплообміну реактора:

Час нагрівання = 10 хв = 600 с, тоді площа поверхні теплообміну :

0,13 м2 < 0,16 м2.

Для даного апарату стандартна рубашка має площу теплообміну 0,16 м2 за ОСТ 26-01-984-82 «Рубашки неразъемные с эллипсоидным днищем стальных сварных сосудов и аппаратов. Основные параметры и размеры». Розрахована площа теплообміну є меншою ніж стандартна, тобто рубашка забезпечує необхідну температуру у біореакторі протягом його роботи без додаткових теплообмінників.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

63

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

**4.3 Вибір загальнозаводського обладнання**

Під час культивування культур клітин, а в даному випадку гемопоетичних стовбурових клітин людини, необхідно здійснювати різноманітні операції. У цьому разі правильність вибору допоміжного обладнання суттєво впливає на ефективність всього процесу виробництва препарату.

Для транспортування рідини (зокрема, поживного середовища) використовують гідравлічні машини – насоси, в яких механічна енергія двигуна перетворюється в енергію транспортованої рідини в результаті підвищення її тиску. Основні характеристики роботи насосів – продуктивність, напір, корисна потужність, ККД, частота обертання ротору, допустима висота всмоктування [41].

Розрахунок насоса включає визначення напору і потужності електродвигуна за заданого параметру витрати рідини і вибір насосу із каталогів, враховуючи особливості технологічної операції.

Розрахунок насосів здійснюється за методикою Иоффе И.Л. «Проектирование процессов и аппаратов химической технологии» [42].

Припустимо, що стерильне поживне середовище у біореактор подають за 30 с. Тоді об’ємна витрата рідини:

Розрахунок швидкості руху рідини:

де S – площа поперечного перерізу трубопроводу   
(діаметр трубопроводу, який вибирають з економічної і конструктивної точок зору).

Коефіцієнт тертя λ для турбулентного режиму:

де густина речовини за 30

Втрати напору:

де L - довжина труб,  – сума коефіцієнтів місцевого опору потоку в трубному просторі., де тр1 = 0,09 – плавний відвід круглого перерізу; тр2 = 0,5 – вхід в труби; тр3 = 1,0 – вихід з труб; тр4 = 4,1 – опір вентеля.

Отже, втрати напору в трубному просторі становлять 1 кПа.

Напір визначається за формулою:

де – тиск в апараті, з якого перекачується середовище, – тиск в реакторі, – геометрична висота підйому рідини, – втрати напору.

Корисна потужність насоса:

Потужність, яку має розвивати електронасос на вихідному валу за встановленого режиму роботи:

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

64

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

де – ккд насоса, приймаємо ; – ккд передачі від електропривода до насоса, .

Потужність, яку споживає двигун від мережі за :

Враховуючи коефіцієнт запасу потужності , встановлюємо двигун потужністю:

Встановлюємо центробіжний насос марки Grundfos, UPS 25-50 180 9H, з такою характеристикою: продуктивність 4,8 м3 / год; напір до 5 м; номінальної потужності 0,04-0,06 кВт.

Для забезпечення аерації та підтримки концентрації СО2 на рівні 5-6% під час культивування гемопоетичних стовбурових клітин необхідна підготовка стерильного аераційного повітря. Для біотехнологічних виробництв традиційним методом підготовки стерильного повітря є метод фільтрування. Вибір методу стерилізації повітря в загальному вигляді є вибором фільтруючого матеріалу і способу його фіксації в корпусі фільтра.

Основною вимогою до повітря для аерації є його мікробіологічна чистота. Ефективність роботи системи стерилізації повітря оцінюють коефіцієнтом проскоку – Кп , %

*Кп = (Х/Х0 )\*100%*

де *Х, Х0* – концентрація мікроорганізмів у повітрі після і до системи очищення повітря відповідно, кл / м3.

Для асептичних процесів культивування *Кп* має бути в межах 10-8 -10-11 %.

Для підготовки стерильного повітря з належними характеристиками використовують два методи: знищення мікрофлори за допомогою нагрівання або іонізуючого випромінювання та вилучення контамінантів фільтруванням.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

65

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

До системи очищення повітря входить різне обладнання:

* фільтр для очистки повітря від пилу та інших механічних домішок (фільтр попередньої очистки);

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

66

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

* система стабілізації термодинамічних показників повітря;
* головний повітряний фільтр для очищення повітря;
* індивідуальний повітряний фільтр перед кожним біореактором.

Вибір фільтру попередньої очистки повітря орієнтований на ефективне видалення крупних фракцій контамінантів з повітря, які можуть пошкодити компресійне обладнання. Перевага надається фільтрам простої конструкції, які легко регенеруються.

Головний повітряний фільтр використовується для підготовки повітря перед індивідуальним фільтром. Фільтруючим матеріалом є багатошарова конструкція, яка складається з шару активного вугілля, над та під яким укладають шар скляної вати для унеможливлення провалу та виносу частинок вугілля.

Для остаточної стерилізації перед входом у біореактор встановлюють індивідуальні фільтри тонкої очистки.

Для даної технології обираємо індивідуальний фільтр із нержавіючої сталі з кришкою і конічним дном. Усередині фільтра встановлюють декілька циліндричних перфорованих трубок, обгорнутих тканиною Петрянова. Після проходження крізь тканину повітря має бути стерильним. Продуктивність такого фільтра близько 1000 м3 / год.

Для запобігання пошкодження фільтру та потрапляння механічних частинок і біологічних контамінантів на стадію основного технологічного процесу встановлюють декілька фільтрів у системі, щоб можна було своєчасно здійснити заміну пошкодженого фільтру, не знижуючи показники якості повітря.

Фільтри, в конструкції яких використовуються мінеральні волокна, керамічні або металокерамічні перегородки, стерилізуються гострою парою. Для фільтрів із полімерних волокон загальновизнаним є метод стерилізації хімічними речовинами – аерозолем формаліну [43].

**РОЗДІЛ 5 АВТОМАТИЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА**

Зм.

Арк.

№ документу

Підпис

Дата

Аркуш

67

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консультант

Керівник

Маринченко Л.В.

Затвердив

РОЗДІЛ 5. АВТОМАТИЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

**5.1 Актуальність автоматизації**

Автоматизація виробництва є одним із напрямків науково-технічного прогресу, який вирішує задачі підвищення продуктивності виробництва і покращення умов праці.

Підтримка стабільної температури культивування, рівня культуральної рідини, тиску, концентрації СО2 в біореакторі, аерація, витрата пари під час стерилізації, потребує забезпечення високого рівня надійності устаткування, вузлів та механізмів.

Для цього використовують системи автоматичного управління, за відсутності яких відбувається пришвидшений знос устаткування, а також нераціональне використання матеріалів і ресурсів, що, в свою чергу, призводить до фінансових втрат на підприємстві.

**5.2 Короткий опис стадії культивування виробництва ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин**

У біореактор об’ємом 0,01 м3 вносять посівний матеріал (суспензію клітин із концентрацією 5∙103 кл/мл), після чого додають 0,004 м3 готового стерильного поживного середовища StemMACS HSC Expansion Cocktail (# 130-100-843). Культивування ГСКтриває 4-5 діб за температури 37 °С та рН середовища 7,1-8,5. Культуральну рідину періодично барботують повітрям та перемішують лопатевою мішалкою з частотою обертання 10 хв-1. Вміст СО2 підтримують на рівні 6%. Через кожні 24 години проводять відбір проб для мікробіологічного і біохімічного контролю процесу культивування та визначення концентрації клітин і ступеня їх проліферації.

Після завершення культивування отримують культуральну рідину, що складається із залишків поживного середовища, біомаси гемопоетичних стовбурових клітин та продуктів їх метаболізму.Концентрація ГСК становить 5∙104 кл / мл. Контроль та підрахунок концентрації клітин здійснюють після відбору проби методом підрахунку в камері Горяєва.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

68

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Після стадії культивування культуральну рідину подають у збірник для подальшого концентрування та фасування в кріопробірки.

**5.3 Основні рішення автоматизації**

**5.3.1 Технологічний контроль**

Процес виробництва ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин підлягає контролю за такими параметрами:

1) Рівень культуральної рідини у біореакторі контролюють автоматично за допомогою електричного рівнеміра QE (поз.3-1), вторинного перетворювача LT (поз.3-2) та вторинного показуючого, реєструючого і сигналізуючого приладу LIRA (поз.3-3), що розташований на щиті оператора. Через регулятор рівня рідини, отриманий сигнал порівнюється із заданим сигналом та за допомогою магнітного пускача NS (поз.3-4), поступає на регулюючий клапан подачі поживного середовища в біореактор.

2) Контроль температури у біореакторі здійснюють термопарою ТЕ   
(поз.1-1) та передають пристроєм дистанційної передачі ТТ (поз.1-2), що встановлений по місцю відбору сигналу, а також реєструючим ТС (поз.1-3) та показуючим приладом ТІR (поз.1-4). Отриманий сигнал порівнюється із заданим сигналом та за допомогою магнітного пускача NS (поз.13-1) поступає на регулюючий клапан подачі води в сорочку біореактора.

3) Тиск у біореакторі контролюють за допомогою електронного манометра РЕ (поз.5-1), який пристроєм дистанційної передачі РТ (поз.5-2) передає дані на реєстратор РС (поз.5-3), а далі на індикатор РСА (поз.5-4) з виходом на сигналізацію. Прийнятий сигнал порівнюється із заданим і передається за допомогою магнітного пускача NS (поз.5-5), поступає на регулюючий клапан виходу повітря за перевищення значень тиску.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

69

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

4) Датчик рН культуральної рідини QE (поз.7-1) передає сигнал на пристрій дистанційної передачі QТ (поз.7-2), що встановлений по місцю відбору сигналу, після чого сигнал реєструється та відтворюється приладом QІR (поз.7-3). Отриманий сигнал порівнюється із заданим сигналом та за допомогою магнітного пускача NS (поз.13-1) поступає на регулюючий клапан подачі стерильного поживного середовища в біореактор.

5) Концентрацію СО2  контролюють за допомогою датчика контролю вуглекислого газу СЕ (поз.9-1), який пристроєм дистанційної передачі СТ (поз.9-2) передає дані на реєстратор СС (поз.9-3), а далі на індикатор ССА (поз.9-4) з виходом на сигналізацію. Прийнятий сигнал порівнюється із заданим і передається за допомогою магнітного пускача NS (поз.13-1) на регулюючий клапан впуску повітря через барботер у разі перевищення значень СО2.

5) Вміст О2  під час культивування контролюють за допомогою датчика контролю концентрації кисню ОЕ (поз.11-1), який пристроєм дистанційної передачі ОТ (поз.11-2) передає дані на реєстратор ОС (поз.11-3), а далі на індикатор ОСА (поз.11-4) з виходом на сигналізацію. Прийнятий сигнал порівнюється із заданим і передається за допомогою магнітного пускача NS (поз.13-1) на регулюючий клапан впуску повітря через барботер у разі зниження значень концентрації О2.

**5.3.2 Автоматичне регулювання**

Автоматичному регулюванню підлягає регулювання рівня рідини у біореакторі, рН, тиску, температури, *р*СО2 та *р*О2.

Регулювання рівня рідини в біореакторі (Р-45) здійснюється за допомогою електричного рівнеміра LSD-30, який складається з двох первинних перетворювачів, які встановлено на мінімально та максимально допустимих значеннях рівня рідини (поз.3-1), а також вторинного перетворювача (поз.3-2), що на вході дає сигнал на посилювач у вигляді зміни напруги, а на виході з первинного утворюється сигнал постійного струму, що подається на вторинний показуючий, реєструючий і сигналізуючий прилад (поз.3-3).

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

70

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Регулювання рН в біореаторі (Р-45) здійснюється у випадку відхилення показників рН від норми (7,1-8,5). При цьому сигнал від датчика РН-метра (поз.7.1) передається до перетворювача рН-метра-мілівольтметра (поз.7-2,), потім надходить до вторинного показуючого реєструючого пристрою (поз. 7-3). Інформація з регулюючого пристрою порівнюється із заданою та через магнітний пускач (поз.13-1) сигнал поступає на виконавчий пристрій ВМ2, що регулює подачу свіжого поживного середовища.

Регулювання температури в біореакторі відбувається в разі відхилення від показника 37 °С за допомогою термометра опору, встановленого в місці заміру ТЕ (поз.1-1). Сигнал від приладу передається до перетворювача ТТ (поз.1-2), а звідти на показуючий реєструючий пристрій ТС (поз.1-3) і на сигналізацію ТСА (поз. 1-4).

Регулювання концентрації СО2 здійснюється у випадку відхилення значення від показника 6%. При цьому від SE (поз.9-1), сигнал передається до перетворювача ST (поз. 9-2), а звідти на показуючий реєструючий пристрій SC (поз.9-3) і на сигналізацію SCA (поз.13-1).

**5.3.3 Сигналізація та захист**

До світлової та звукової сигналізації приєднано такі контури: регулювання рівня рідини у біореакторі (контур 3), регулювання концентрації СО2 (контур 9), регулювання рН в біореакторі ФР-1 (контур 7), регулювання температури (контур 5). Система сигналізації починає діяти у разі відхилення значення параметрів, що регулюються від заданих.

У біореакторі сигналізація та захист вмикаються у випадку відхилення від заданого значення рН, концентрації СО2 та температури. При цьому на панелі загоряється індикатор червоного кольору, який свідчить про підвищення рН більше як на 1, рівня СО2 на1% і температури на 1 °С, а також вмикається звукова сигналізація зміни параметрів процесу культивування.

**5.4 Специфікація на технічні засоби**

СПЕЦИФІКАЦІЯ НА ТЕХНІЧНІ ЗАСОБИ

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

71

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

| **№ позиції за схемою** | **Шифр** | **Найменування параметру, середовища та місце відбору сигналу** | **Граничне значення параметру** | **Місце установки** | **Найменування, характеристика** | **Тип моделі** | **Число по проекту** | **Потрібно фактично** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1-1 | L | Рівень культуральної рідини у біореаторі | 0-20 см | По місцю | Електричний рівнемір | LSD-30 | 1 | 1 |
| 1-2 | L | - | - | По місцю | Перетворювач сигналу | ПП-04-ОМ-2 | 1 | 1 |
| 2-1 | T | Температура культуральної рідини у біореакторі | 37ºС | По місцю | Термоперетворювач опору | ТСПУ-0288 | 1 | 1 |
| 5-1 | P | Тиск у біореакторі | 0,1-0,06 МПа | По місцю | Пружинний прилад для вимірювання тиску | МВПЗ-У | 1 | 1 |
| 5-2 | P | - | - | По місцю | Перетворювач сигналу | OE-PS-A-I1 | 1 | 1 |
| 7-1 | Q | рH у біореакторі | 7,1-8,5 | По місцю | Датчик рН | П-02С | 1 | 1 |
| 7-2 | Q | - | - | По місцю | Перетворювач сигналу | рН-101П | 1 | 1 |
| 8-1 | С | Рівень СО2  у біореакторі | 6% | По місцю | Датчик СО2 | InPro- 5000i | 1 | 1 |
| 8-2 | С | - | - | По місцю | Перетворювач сигналу | 4G25 | 1 | 1 |
| 1-3  3-2 | Q  T | - | - | На щиті | Показуючий реєструючий прилад | РМТ-49Д | 3 | 3 |
| 7-2 | L  L | - | - | На щиті | Показуючий реєструючий прилад | А100 | 1 | 1 |
| 3-4  8-4  7-3 | T  L  Q | - | - | На щиті | Регулюючий пристрій | Р-12 | 4 | 4 |
| 11-1 | ВМ | - | - | По місцю | Виконавчий механізм | ПМЕ-222 | 1 | 1 |
|  |  | - | - | По місцю | Кулачковий перемикач ланцюга живлення МП | 4G25 | 1 | 1 |
| Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  72  *ДП 0108.00.000 ПЗ* |  | - |  | На пульті керування | Кнопка червона з підсвічуванням і звуковою сигналізацією | ELFIN  030 | 1 | 1 |

**РОЗДІЛ 6 ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА**

Зм.

Арк.

№ документу

Підпис

Дата

Аркуш

73

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консультант

Ткаченко Т.П.

Керівник

Маринченко Л.В.

Затвердив

РОЗДІЛ 6.

ЕКОНОМІЧНА ЧАСТИНА

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

**6.1 Резюме стартап-проекту**

Назва проекту: «Біотехнологія ізольованої лінії стовбурових клітин з крові».

Мета стартапу: задовольнити потребу приватних та державних медичних установ препаратом гемопоетичних стовбурових клітин для аутотрансплантації пацієнтам з метою отримання прибутку.

Предмет стартапу: розробка технології виробництва препарату на основі ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин з крові пацієнта, оцінка якості та ефективності технологічного процесу на основі даних культивування лінії ГСК.

Об’єкт стартапу: ізольована лінія ГСК.

Продукт стартапу представляє собою непрозору суспензію гемопоетичних стовбурових клітин від червоного до рожево-жовтого кольору в середовищі культивування у пробірках чи кріоконтейнерах з можливим осадом, містить близько 2 ∙ 107 клітин / мл. Продукт належить до 44 класу товарів та послуг – послуги банку крові.

Для успішної реалізації технології необхідно забезпечити виробництво якісними витратними матеріалами та вхідними речовинами (поживні середовища, сироватки, інші добавки), висококваліфікованими кадрами із досвідом роботи з культурами клітин, а також чітко дотримуватися санітарно-гігієнічних норм на виробництві та працювати згідно з протоколами СОП (стандартні операційні процедури).

Основними споживачами є державні та приватні медичні заклади, що проводять лікування хвороб кровотворення, а також фізичні особи – пацієнти, що потребують трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин.

Конкурентною перевагою запропонованої технології є отримання цільового продукту із значно меншими затратами трудових ресурсів та часу, мінімізація накопичення в цільових клітинах мутацій, унеможливлення потрапляння тваринних клітин та їх частин до організму людини завдяки використанню замінників сироваток тваринного походження, а також конкурентоспроможна ціна препарату.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

74

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Капіталовкладення у проект становлять 313 800 $, вартість препарату визначається з розрахунку 200 $ за 1 тис клітин. За умови реалізації 5025 тис. ГСК в рік (6 пацієнтів в місяць, або 2-3 пацієнти із курсом терапії стовбуровими клітинами) термін повернення капіталовкладень становить пів року.

Таблиця 6.1 – Резюме стартап-проекту

| **Показник** | **Характеристика** |
| --- | --- |
| 1. Сутність ідеї | Створення технології виробництва ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин людини для аутотрансплантації |
| 1. Наявність аналогів або прототипів ідеї | Прототип: Інститут клітинної терапії  Аналог: методика вирощування клітин компанією BioPro Stem Technology |
| 1. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап | Трансплантація стовбурових клітин пацієнтам після хіміотерапії та при лікуванні хвороб кровотворення |
| 1. Ступінь розробленості технології реалізації | Необхідно вдосконалити існуючу технологію культивування клітин за допомогою впровадження автоматизованого обладнання; провести оцінювання якості та ефективності технологічного процесу на основі даних культивування лінії ГСК |
| 5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів | 1. клас - послуги банку крові |
| 6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво | [86.90. Інша діяльність у сфері охорони здоров'я](https://kved.biz.ua/01.13_%D0%92%D0%B8%D1%80%D0%BE%D1%89%D1%83%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F_%D0%BE%D0%B2%D0%BE%D1%87%D1%96%D0%B2_%D1%96_%D0%B1%D0%B0%D1%88%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D0%B8%D1%85_%D0%BA%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%83%D1%80,_%D0%BA%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D0%BF%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D1%96%D0%B2_%D1%96_%D0%B1%D1%83%D0%BB%D1%8C%D0%B1%D0%BE%D0%BF%D0%BB%D0%BE%D0%B4%D1%96%D0%B2) |
| 7. Очікувана потужність стартапу | Мале підприємство |
| 8. За масштабом виробництва | Одиничне |
| 9. За рівнем спеціалізації | Вузькопрофільне |
| 10. За ресурсами, що споживатимуться | Матеріаломістке, капіталомістке |
| 11. За чисельністю персоналу (мале, середнє, велике) | Мале |
| 12. Органи управління при реалізації стартапу | Національні, міжнародні |
| 13. Бажане географічне розташування  - потужностей стартапу,  -офісу стартапу,  -збутової мережі  - постачальників комплектуючих  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  75  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | Лабораторія (потужності) та офіс в одному місці, в Києві.  Збутова мережа – приватні та державні клініки, Інститут клітинної терапії, Національний інститут раку. Постачальником комплектуючих будуть здебільшого іноземні компанії (середовища, реактиви, антитіла) та деякі вітчизняні компанії (лабораторне обладнання, устаткування) |
| 14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу | Технологія виробництва |
| 15. Гранична корисність ідеї стартапу | Позитивна (кожна наступна доза препарату пришвидшуватиме процес кровотворення пацієнта) |
| 16. Бізнес-модель стартапу | В2С (бізнес для споживача) |
| 17. Конкуренти вітчизняні | BioPro Stem Technology, 300 $/млн клітин. Переваги – сформована клієнтська база, співпраця із медичними закладами |
| 18. Конкуренти іноземні | Cord Blood Registry®, переваги – власний кріобанк |
| 19. Ключові фактори успіху стартапу | Ідея, команда |
| 20. Споживачі | Юридичні особи - державні та приватні медичні заклади |
| 21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації | 325 млн ГСК |
| 22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості | 1569 млн ГСК (приблизно 20 доз препарату) |
| 23. Споживачі на етапі розвитку | Медичні заклади, пацієнти |
| 24. Споживачі на етапі зрілості | Медичні заклади, пацієнти, лабораторії |
| 25. Конкурентна ціна на продукт стартапу | 200 $ |
| 26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту | 190 % |
| 27. Капіталовкладення в проект | 313 800 $ |
| 28. Період повернення капіталовкладень у проект | 6 місяців |
| 29. Джерела фінансування | Власні фонди, кредитування, інвестиції |
| 30. Основні компоненти продукції стартапу | Гемопоетичні стовбурові клітини, 2 ∙ 107 клітин / мл |
| 31. Потенційні постачальники складових  компонентів розробки | Іноземні - Beckman Coulter, Thermo Fisher Scientific, вітчизняні – Biostat, МедТехніка |
| 32. Планове місце реалізації результату розробки | Медичні центри у містах-мільйонниках |
| 33. Наявність посередників при реалізації | Кур’єри для доставки препарату в медичні заклади, форма оплати – зарахування на карту |
| 34. Методи просування результатів розробки на ринок | Реклама в інтернеті, участь у семінарах та виставках |

**6.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу**

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

76

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Таблиця 6.2 – Аналіз факторів зовнішнього середовища

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Фактор** | **Загрози** | **Можливості** |
| **Політика** | Зміна податкового кодексу може збільшити загальні витрати підприємства.  Зміна законодавства теж може негативно вплинути на функціонування проекту. | Можливість розповсюдження технології виробництва препарату на основі ГСК в інші країни.  Вітчизняний продукт користується популярністю через доступність за ціновою політикою та геолокацією. |
| **Економіка** | Загроза провалу стартапу, так як важко спрогнозувати подальший розвиток економіки.  Зниження платоспроможності населення.  Підвищення ціни на матеріали та обладнання.  Зростання конкуренції, так як проводяться нові дослідження культивування ГСК та лікувальних властивостей препаратів на їх основі. | Пошуки дешевших альтернатив в організації виробництва серед вітчизняних постачальників сировини та обладнання.  Можливе зростання попиту на продукцію вітчизняного виробника і зростання кількості потенційних клієнтів. |
| **Демографія** | При зменшені платоспроможного населення відповідає зменшенню виробництва продукції на основі стовбурових клітин | Збільшення числа потенційних клієнтів при збільшені кількості платоспроможного населення. |
| **Географія** | Збільшення частки конкурентів, через вигідне географічне положення (м. Київ) | Так як Київ є столицею, створені хороші перспективи для ведення бізнесу.  Можливість збуту продукції у країни СНГ і ЄС. |
| **Соціально-культурний** | Зниження попиту на продукцію через недостатню інформованість цільової аудиторії щодо лікування стовбуровими клітинами.  Скептичне ставлення споживачів до продукції через поширені міфи про лікування стовбуровими клітинами. | Збільшення попиту на продукцію серед пацієнтів, для яких інші стратегії лікування не дієві.  Збільшення попиту на anti-age терапію та використання стовбурових клітин в косметології. |
| **Науково-технічний прогрес** | Можливість виникнення конкуренції серед розробників альтернативної технології.  Незацікавленість технологією серед лікарів через незнання принципів роботи зі стовбуровими клітинами. | Покращення якості технології.  Мінімізація затрат на виробництво, що призведе до зниження собівартості продукції.  Можна зробити хорошу рекламну кампанію, так як продукт можна представити в якості високотехнологічної новинки в галузі медицини. |

Таблиця 6.3 – Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

77

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Фактор** | **Переваги** | **Недоліки** |
| **Конкуренти:**  BioPro Stem Technology  Інститут клітинної терапії | Відсутність аналогічної технології.  Відсутність вузькоспеціалізованих препаратів.  Можливість удосконалення наявної технології.  Можливість удосконалення продукції.  Інформування потенційних споживачів за допомогою мас медіа, реклами, продакт-плейсменту.  Можливість випуску іншої продукції за тією ж технологією. | Наявність аналогів продукції на ринку.  Наявність виробників аналогічної продукції.  Неможливість монополізації.  Витрати на рекламу.  Неможливе зменшення витрат на реактиви та поживні середовища. |
| **Постачальники:**  Матеріали, середовища та реактиви - Beckman Coulter  Обладнання -*Biostat,* Thermo Fisher Scientific  Витратні матеріали – *МедТехніка* | Впевненість у якості сировини.  Обладнання для виробництва невеликих розмірів і незначної технічної складності.  Обладнання стандартне, піддається заміні, випускається вітчизняними виробниками.  Широка сировинна база. | Обов’язкова сертифікація сировини.  Виробництво вимагає вкладень у вигляді обладнання та програмного забезпечення.  Витрати на пакувальні та одноразові витратні матеріали.  Дорого вартісні реагенти та поживні середовища. |
| **Посередники:**  Медичні центри, приватні клініки, кріобанки | Можливість покладення на посередників операцій зі зберігання, кріоконсервації, відмивання препарату від кріопротектора та надання продукції товарного вигляду.  Зменшення собівартості продукції.  Зменшення необхідної площі для складу. | Збільшення вартості готової продукції для кінцевого споживача.  Неналежна якість продукції через недотримання посередниками умов зберігання та транспортування. |
| **Споживачі:**  Фізичні особи,  юридичні особи | Висока якість та ефективність продукції.  Зацікавленість продукцією через терапевтичний ефект.  Актуальність продукції в косметології.  Свідомий підхід споживача до кріоконсервації власних стовбурових клітин. | Необізнаність споживачів щодо застосування та терапевтичного ефекту препарату.  Незацікавленість продукцією через високу вартість.  Неактуальність препарату через наявність більш ефективних та менш вартісних методик лікування. |

Таблиця 6.4 – Аналіз зацікавлених сторін

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

78

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Зацікавлена сторона** | **Вплив її на реалізацію проекту** | **Цікавість її до проекту** | **Загальний коефіцієнт впливу на проект** |
| **Суб’єкти внутрішнього середовища** | | | |
| *Виробник:* |  |  |  |
| ТМ «StemLife» | 0,7 | 1 | 0,85 |
| *Постачальник* |  |  |  |
| Beckman Coulter | 0,4 | 0,2 | 0,3 |
| Thermo Fisher Scientific | 0,45 | 0,3 | 0,375 |
| Biostat | 0,5 | 0,45 | 0,425 |
| МедТехніка | 0,45 | 0,25 | 0,35 |
| *Споживачі* |  |  |  |
| Косметологічна клініка «IDELIS» | 0,2 | 0,35 | 0,275 |
| Інститут клітинної терапії | 0,35 | 0,5 | 0,425 |
| Національний інститут раку | 0,4 | 0,5 | 0,45 |
| Фіз. особи | 0,7 | 0,5 | 0,6 |
| *Посередники* |  |  |  |
| Кріобанк «Гемафонд» | 0,3 | 0,1 | 0,2 |
| **Зовнішнє середовище** | | | |
| Політичні структури | 0,2 | 0,1 | 0,25 |
| Суб’єкти економічного середовища | 0,1 | 0,3 | 0,2 |
| Власники географічних об’єктів | 0,3 | 0,1 | 0,2 |
| Власник місця оренди | 0,4 | 0,1 | 0,25 |
| Суб’єкти демографії | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Суб’єкти культурного середовища | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Суб’єкти НТП | 0,7 | 0,8 | 0,75 |

Таблиця 6.5 **–** SWOT- аналіз

|  |  |
| --- | --- |
| **Сильні сторони** | **Слабкі сторони** |
| Інноваційний проєкт в Україні  Значний попит на продукцію  Молодий та енергійний колектив  Ефективний препарат  Незначна кількість конкурентів  Наявність трудових кадрів | Невелика кількість можливостей фінансування з боку держави  Відсутність значної кількості інвесторів  Недостатня проінформованість споживача, звідси – складності у рекламі та просуванні |
| **Можливості** | **Загрози** |
| Отримання грантів і програм для реалізації проєкту  Пошук нових ринків збуту  Налагодження роботи зі споживачами продукції | Зростання конкуренції  Не якісний продукт через порушення умов зберігання  Падіння попиту на продукцію  Підвищення цін на комунальні витрати  Рівень інфляції – 5% |

**6.3 Визначення ключових факторів успіху проекту**

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

79

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Таблиця 6.6 – Визначення ключових факторів успіху проекту методом Шонфільда\*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№** | **Характеристики** | **Вагомість х-тики** | BioPro Stem Technology  **конкурент 1** | **Інститут клітинної терапії конкурент 2** | **Наша компанія** |
| 1 | Працемісткість процесу | 0,6 | 5 | 3 | 5 |
| 2 | Пакування і маркування | 0,25 | 5 | 5 | 4 |
| 3 | Дотримання вимог НТД | 0,15 | 4 | 4 | 5 |

\*оцінка від 1 (крайнє негативна оцінка) до 5 (крайнє позитивна оцінка)

З урахуванням коефіцієнту вагомості характеристики визначається бальна оцінка кожної характеристики для нашої продукції і для конкурентів:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№** | **Характеристики** | **Вагомість х-тики** | **BioPro Stem Technology** **конкурент 1** | **Інститут клітинної терапії конкурент 2** | **Наша компанія** |
| 1 | Працемісткість процесу | 0,6 | 3 | 1,8 | 3 |
| 2 | Пакування і маркування | 0,25 | 1,25 | 1,25 | 1 |
| 3 | Дотримання вимог НТД | 0,15 | 0,6 | 0,6 | 0,75 |
|  | ∑ | 1 | 4,85 | 3,65 | 4,75 |

Рисунок 6.1 – Аналіз ключових факторів успіху проекту за Шонфільдом

Основний конкурент за підсумками аналізу - «BioPro Stem Technology». Працемісткість процесу культивування гемопоетичних стовбурових клітин має значний коефіцієнт для даного виду продукції, так як впливає на собівартість товару, тому конкурент має перевагу за рахунок уже існуючої технології та налагодженого технологічного процесу. Для конкурентоспроможності наші можливості будуть зосереджені на зниженні працемісткості процесу шляхом модернізації технології та заміни етапу пасажування клітин одним циклом культивування у біореакторі, що також підвищить якісні характеристики товару та знизить ризики контамінації продукту.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

80

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Таблиця 6.7– Варіанти розвитку ідеї стартапу

|  |  |
| --- | --- |
| **Варіант** | **Стислий опис можливого розвитку** |
| А. Найкращий | Розробка стартапу відбувається вдало, завдяки налагодженій технології та вдало підібраним матеріалам та обладнанню вдається за пів року вийти в беззбитковість і почати генерувати прибуток, збільшуючи клієнтську базу. |
| Б. Реалістичний | Впровадження технології у виробництво пройшло вдало, але для напрацювання необхідного об’єму клітин необхідно більших затрат часу та матеріалів. Через коливання крос-курсу валют, непрогнозованих подій падіння попиту і платоспроможності, підняття цін на електроенергію – зсув точки беззбитковості на рік-два. |
| В. Песимістичний | Маючи певні напрацювання, продаж ідеї з метою отримання частини в майбутньому бізнесі, або фінансових компенсацій. |

**6.4 Визначення потенційних споживачів**

Таблиця 6.8 – Класифікація потенційних споживачів

|  |  |
| --- | --- |
| **Критерій** | **Значення** |
| **Юридична особа** | |
| 1. Форма власності | Приватна, державна |
| 2. КВЕД | 86.10 Діяльність лікарняних закладів,  86.90 Інша діяльність у сфері охорони здоров'я |
| 3. За потужністю | Малі, середні |
| 4. За масштабом виробництва | Одиничні |
| 5. За рівнем спеціалізації | Вузькопрофільні, багатопрофільні |
| 6. За ресурсами, що споживаються | Матеріаломісткі, капіталомісткі, працемісткі |
| 7. За чисельністю персоналу | Малі, середні |
| 8. За сферою діяльності | Посередницькі |
| 9. За приналежністю капіталу і контролю | Національні, іноземні, спільні |
| 10. За географічним розташуванням | У містах-мільйонниках України та Європи |
| 11. За віддаленістю органів управління | Національні, міжнародні |
| 12. За характером господарської діяльності  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  81  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | Медичні, косметологічні |
| 13. За рівнем технологічної цілісності | Провідні, філії |
| 14. За долею іноземного капіталу | З іноземними інвестиціями (більше 10 %) |
| 15. За формуванням статутного капіталу | Унітарні |
| 16. За організацією виробничих процесів | Періодичні |
| 17. За роботою протягом року | Позасезонні |
| 18. За географічним розташуванням на території України | У обласних центрах |
| 19. За наявністю вільних ОбЗ (коштів) | Наявні |
| 20. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи:  - регіон  - чисельність населення  - динаміка росту регіону  - структура регіону  - правові обмеження торгівлі | Регіон: місто Київ  Чисельність населення: 2,96 млн (2021 р.)  Динаміка росту регіону: за останні десять років населення міста зросло майже на 10 %, збільшуючись в середньому на 20-25 тис. осіб щорічно  Структура регіону: столиця, територія міста поділена на 10 адміністративних районів  Правові обмеження торгівлі: немає  Регіон: місто Харків  Чисельність населення: 1,33 млн (2021 р.)  Динаміка росту регіону: за останні десять років населення міста зменшується в середньому на 0,01 % щорічно за рахунок від’ємного природного приросту населення.  Структура регіону: обласний центр, територія міста поділена на 9 адміністративних районів  Правові обмеження торгівлі: немає |
| **Фізична особа** | |
| 1. Вік | Не має значення |
| 2. За платоспроможністю | 5-10 тис. грн за 1 млн ГСК |
| 3. За соціальним рівнем споживачів | ЗП від 1000 $/міс і більше |
| 4. За способом життя (звички, традицій, стереотипи поведінки) | Стан повного фізичного, психологічного, духовного, емоційного, соціального та інтелектуального благополуччя. |
| 5. Тип особистості споживачів | Реаліст |
| 6. За ставленням до товару | Мотивація придбання: лікування, реабілітація, профілактика певних захворювань та передчасного старіння.  Пошук вигоди: участь у державних програмах лікування («Програма медичних гарантій»), пільги у зв’язку з інвалідністю.  Ставлення до товару: позитивне, у деяких випадках – це єдиний метод лікування для пацієнта.  Інформованість про товар: цільова аудиторія проінформована належним чином (консультації лікарів, інформація на сайті клініки / компанії / лабораторії).  Інтенсивність споживання товару: за необхідністю / призначенням лікаря. Іноді потрібен курс лікування, який супроводжують 3-5 і більше ін’єкцій препарату. У деяких випадках необхідне регулярне введення препарату протягом всього життя. |
| 7. За сімейними цінностями (склад сім’ї, рівень сімейного доходу, етап життєвого циклу сім’ї, традиції)  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  82  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | Рівень сімейного доходу достатній для придбання даного товару (виняток – державні програми лікування). |
| 8. За співвідношенням бажання придбати і цінової межі | Місячний дохід (1000 $) – вартість одиниці товару (200 $/млн ГСК)  5 : 1 |
| 9. За інтенсивністю споживання товару | Разове або періодичне придбання |
| 10. За інформованістю | Спеціальні джерела |

Таблиця 6.9 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

|  |  |
| --- | --- |
| **Категорія (група) клієнтів** | **Потреби, які задовольняються за допомогою продукту** |
| 1. Державні та приватні медичні заклади | Отримують готовий для введення хворим препарат ГСК (аутотрансплантація мінімізує ризики ускладнень або відторгнення трансплантату, персоналізоване виготовлення препарату). |
| 2. Косметологічні кабінети | Отримують готовий препарат для anti-age терапії, виготовлений для кожного клієнта індивідуально. |
| 3. Фізичні особи | Отримують препарат для аутологічної трансплантації, гіпоалергенний та повністю безпечний для здоров’я. Трансплантація стовбурових клітин не потребує хірургічного втручання. |

Таблиця 6.10 – Паспорт потенційного клієнта

|  |  |
| --- | --- |
| **Характеристика** | **Значення** |
| Організаційно-правова форма | ТОВ |
| Класифікація | За потужністю: мале  За чисельністю персоналу: мале  За обсягом виробництва: одиничне  За сезонністю виробництва: позасезонне |
| Розташування | Місто Київ |
| Вид продукту, який потрібен даному споживачеві | Ізольована лінія гемопоетичних стовбурових клітин із певною концентрацією, виділених з крові пацієнта, у кріопробірках або кріопакетах |
| Призначення придбаної розробки | Застосування даної технології для організації виробництва препарату ГСК, удосконалення наявної технології |
| Кваліфікація персоналу підприємства | Спеціалісти найвищої кваліфікації |
| Потенційний обсяг споживання розробки  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  83  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | 1-5 років з подальшим удосконаленням |
| Хто приймає рішення про придбання розробки | Директор медичного центру |

Таблиця 6.11– Запланований обсяг реалізації стартап-продукту

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Запл.  обсяг | **Січень, 2022** | **Лютий, 2022** | **Березень,**  **2022** | **Квітень**  **2022** | **Травень, 2022** | **Червень,**  **2022** | **Липень, 2022** | **Серпень, 2022** | **Вересень,2022** | **Жовтень, 2022** | **Листопад, 2022** | **Грудень,**  **2022** |
| млн ГСК | 325 | 400 | 450 | 500 | 300 | 550 | 500 | 400 | 350 | 450 | 450 | 350 |

За перший місяць планується реалізація 325 млн гемопоетичних стовбурових клітин (5 пацієнтів) з розрахунку 1 млн клітин на 1 кг маси тіла пацієнта. Далі планується поступове збільшення обсягів реалізації завдяки інформуванню потенційних клієнтів про даний продукт.

Максимум обсягів реалізації продукту передбачається на червень-липень, через пів року з моменту запуску стартапу. Це пояснюється тим, що на той момент буде налагоджено виробництво препарату, а також клітинна терапія для перших пацієнтів уже дасть позитивні результати, в результаті чого попит на препарат збільшиться.

За перший рік планується реалізувати 5025 млн ГСК.

**6.5 Ціна інноваційної пропозиції на ринку**

Таблиця 6.12 – Витрати, передбачені відкриттям лабораторії для вирощування стовбурових клітин

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Стаття витрат** | **Витрати на місяць, дол.** | **Витрати за рік, дол.** | **Разові витрати** | **Разом за рік** |
| Купівля або оренда приміщення | 6 400 | 76 800 | 6 400 | 83 200 |
| Ремонт, приведення у відповідність з нормами СЕС, проведення комунікацій |  |  | 2 000 | 2 000 |
| Отримання ліцензій СЕС, пожежної служби |  |  | 1 500 | 1 500 |
| Купівля обладнання |  |  | 15 000 | 15 000 |
| Витратні матеріали | 12 000 | 144 000 |  | 144 000 |
| Витрати на транспорт, доставку | 600 | 7 200 |  | 7 200 |
| Закупівля комп'ютерної техніки |  |  | 1 600 | 1 600 |
| Створення та обслуговування сайту, хостингу  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  84  *ДП 0108.00.000 ПЗ* |  |  | 1 700 | 1 700 |
| Рекламні витрати | 750 | 9 000 |  | 9 000 |
| Зарплата | 4 500 | 54 000 |  | 54 000 |
| Сплата податків | 1 900 | 22 800 |  | 22 800 |
| Непередбачені витрати |  |  | 4 000 | 4 000 |
| Разом | 26 150 | 313 800 | 32 200 | 346 000 |

Таблиця 6.13– Проектні ціни продажу ідеї, технології, методики, програми

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Найменування**  **товару** | **Планові обсяги продажу** | | **Аналоги, прототипи** | |
| **К-сть, млн** | **Ціна, дол/млн.** | **Кількість, млн.** | **Ціна, дол/млн.** |
| Препарат ізольованої лінії гемопоетичних стовбурових клітин | 5025 | 200 | BioPro Stem Technology,  8 000 | 250 |

Основні методи ціноутворення:

1. *Витратний метод.*

Ц = С + %П = + 5 % = 75,4 дол/млн, (6.1)

де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн., %П – відсоток прибутку.

1. *Агрегатний метод.*

Не використовується в даному виді товару.

1. *Параметричний метод.*

Цн = Цб = = 272,5 дол/млн, (6.2)

де Цн – ціна нового продукту, грн., Цб – ціна базового продукту (була взята ціна на продукцію BioPro Stem Technology, дол/млн., Бб – бали за властивості базового продукту, Бн – бали за властивості нового продукту (вирішальними і принципово новими були: ефекти).

1. *Метод точки беззбитковості.*

Ц = С = = = 68,85 дол/млн, (6.3)

де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн.

1. *Метод конкурентних цін.*

Ц = = = 225 дол/млн, (6.4)

де Ц – ціна одиниці товару, грн., Цx1,x2,x3 – ціни конкурентів, грн., N – кількість використаних цін конкурентів.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

85

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Для ціноутворення були проаналізовані різні методи, а також вибрана ціна продукту, що становить 200 $ за мільйон ГСК.

Таблиця 6.14– Забезпеченість проекту основними засобами

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Місце ОЗ у технологічному процесі** | **Назва ОЗ** | **Повна початк.**  **вартість ОЗ, дол** | **Плановий період експлуатації ОЗ, років** | **Очікуваний постачальник** | **Джерело фінансування придбання** |
| Стадія культивування ГСК | Обладнання та комунікації | 15 000 | 5 | Biostat, Thermo Fisher Scientific | Власні фонди |
| Стадія напрацювання посівного матеріалу, культивування, кріоконсервації | Піпетки, пробірки, чашки Петрі | 144 000 | 15 | Beckman Coulter,  МедТехніка |  |
| Увесь процес | Приміщення | 76800 | 15 | - |  |
| Контроль виробництва, маркування продукції | Комп’ютерна техніка | 1600 | 5 | Цитрус |  |
| Увесь процес | Ліцензія | 1500 | 15 | МОЗ |  |

Таблиця 6.15 **–** Забезпеченість проекту оборотними фондами

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Група ОбФ** | **Назва** | **Норма витрат на рік** | **Ціна, дол/од** | **Очікуваний постачальник** | **Джерело фінансування** |
| Сировина і матеріали | Поживні середовища, сироватки | 300 л | 75 | Sigma | Прибуток  Власні фонди |
| Реактиви, антитіла | 75 мл | 450 | Beckman Coulter |
| Одноразові витратні матеріали | 1 500 шт | 0,2 | МедТехніка |
| Кріопробірки, кріопакети з етикетками | 600 шт | 0,7 | Thermo Fisher Scientific |
| Вода | 120 м3 | 0,5 | Київводоканал |
| Паливо, електроенергія | Електроенергія | 50 440 кВт | 0,064 | Київтеплоенерго |
| Інші витрати | Податки | - | 100 | ДПС |
| Реклама | Сайт, витрати на рекламу | - | 10700 | WEB-DELUXE |

Таблиця 6.16 – Забезпеченість проекту трудовими ресурсами

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

86

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Категорія кадрів** | **Назва посади** | **Чис.** | **Кваліфікаційні вимоги** | **ЗП, дол** | **Джерело фінансування ФОП** |
| Спеціалісти | Інженер-технолог | 1 | Досвід роботи за спеціальністю від 5 років. Наявність профільної вищої освіти. | 1 000 | Прибуток |
| Молодший персонал обслуговування | Лаборант | 2 | Досвід роботи за спеціальністю від 1 року. Наявність профільної вищої освіти. | 700 | Прибуток |
| Керівники | Директор | 1 | Досвід роботи на керівних посадах від 1 року. Наявність вищої освіти (економіка, менеджмент, управління). | 2100 | Прибуток |

Таблиця 6.17– Техніко-економічні показники проекту

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Показники** | **Одиниця виміру** | **Умовне позначення, формула розрахунку** |
| 1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики | Млн ГСК | В = 5025 |
| 2. Середньорічна чисельність персоналу за списком | Осіб | Ч = 4 |
| 4.Середньорічний виробіток робітника | Млн./особу | 1256,25 |
| 5. Капіталовкладення у проект: |  | К = 313 800  62,44 |
| - всього | Дол. |
| - на одиницю продукції | Дол./од. |
| 6. Повна собівартість: |  | С = 346 000  68,85 |
| - всього  - на одиницю продукції | Дол.  Дол./од. |
| 7. Відносний прибуток | Дол./од. | П = 131,15 |
| 8. Рентабельність | % | Р= (П/С ) ×100 = 190 % |
| 9. Період повернення капіталовкладень | Років | Тпов= К/П =  6 місяців |
| 10. Фондовіддача виробничих фондів | Дол./дол. | ФВ=(Ц×В)/ОФ = 2,9 |
| 11. Фондоємкість | Дол./дол. | ФЄ = 1/ФВ=0,34 |
| 12. Продуктивність праці | Дол./особу | ПП= В/(Чсп× Т)= 688,35 |
| 13. Коефіцієнт економічної ефективності |  | Е=П/К=2,1 |

**6.6 Концепція бізнес-моделі проекту та карта бізнес-процесів реалізації проекту**

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

87

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Таблиця 6.18 – Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Стадія реалізації стартап-**  **Проекту** | **Бізнес-процеси** | **Характеристики** | | |
| **Задіяні ресурси** | **Орієнтовна тривалість процесу**  **(у днях)** | **Верхня межа фінансових витрат, дол** |
| **Розробка ідеї стартапу** | 1. Створення команди | Людський, приміщення, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації | 1 | 40 |
| 2. Генерація ідеї | Людський, інтернет | 7 | 115 |
| 3. Пошук актуальної інформації | Людський, інтернет, | 5 | 75 |
| 4. Розподілення обов’язків | Людський, засоби зв’язку та передачі інформації | 1 | 40 |
| 5. Попередня підготовка процесу | Людський, комп’ютер | 2 | 20 |
| 6. Пошук інвестиційних концепцій | Людський, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації | 14 | 150 |
| 7. Остаточне формулювання проекту та оцінка його техніко-економічної та фінансової прийнятності | Людський | 5 | 10 |
| 8. Фінальний розгляд проекту | Людський,  приміщення, техніка | 1 | 50 |
| **Реалізація ідеї** | 9.Формування бази даних постачальників матеріалів та обладнання | Людський, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації | 14 | 65 |
| 10. Отримання ліцензії | Людський, приміщення, засоби зв’язку та передачі інформації | 14 | 1500 |
| 11. Державний реєстр юридичної особи | Людський | 2 | 20 |
| 12. Пошук будівлі для купівлі / оренди, договір оренди | Людський, приміщення,  засоби зв’язку та передачі інформації | 21 | 90 000 |
| 13. Ремонт приміщення, проведення комунікацій  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  88  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | Людський,  засоби зв’язку та передачі інформації | 14 | 3 000 |
| 14. Придбання та установка обладнання | Людський, приміщення, обладнання | 7 | 17 000 |
| 15. Проведення переговорів, заключення контрактів із постачальниками | Людський, приміщення,  засоби зв’язку та передачі інформації | 14 | 75 |
| 16. Закуп матеріалів | Людський, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації | 7 | 145 000 |
| 17. Формування адміністрації фірми | Людський | 1 | 10 |
| 18. Розробка технології виробництва | Людський,  комп’ютер | 2 | 30 |
| 19. Формування інструкцій | Людський,  комп’ютер | 2 | 30 |
| 20. Набір та навчання персоналу | Людський, інструкції та навчальні матеріали, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації,  приміщення | 30 | 1 000 |
| **Впровадження у виробництво** | 21. Діагностика обладнання і комунікацій | Людський,  обладнання,  комунікації,  методи діагностики | 7 | 70 |
| 22. Короткотривалі заходи модернізації | Людський,  матеріали,  обладнання,  кошти | 1 день,  кожні 2 місяці | 750 |
| 23. Здача в експлуатацію та запуск підприємства | Людський,  обладнання,  комунікації,  приміщення | 1 | 185 |
| 24. Уточнення технології | Людський | 1 | 20 |
| 25. Організація контролю якості | Людський,  лабораторія | 7 | 300 дол / місяць |
| **Масова реалізація** | 26. Організація реклами в соціальних мережах | Людський,  інтернет,  техніка | 5 | 750 дол / місяць |
| 27. Встановлення контактів із посередниками та споживачами | Людський, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації | - | 40 |
| 28. Формування та підписання договорів | Людський, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації | 1 | 50 |
| **Закриття або продаж проекту (якщо передбачено)**  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  89  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | 29. Інформування потенційних покупців щодо технології | Людський, інтернет,  засоби зв’язку та передачі інформації,  презентації | 1 | 30 |
| 30. Договори із покупцями | Людський,  засоби зв’язку та передачі інформації,  приміщення | 7 | 50 |
| 31. Продаж технології | Людський | 1 | - |

Таблиця 6.19 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

| **Функції** | **Елементи** | | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Директор** | **Завідувач лабораторії** | **Інженер- технолог** | **Лаборант** | **СММ спеціаліст** | **ІТ-спеціаліст** |
| 1. Створення команди | + | + | + | + |  |  |
| 2. Генерація ідеї | + | + | + |  |  |  |
| 3. Пошук актуальної інформації | + | + |  |  |  |  |
| 4. Розподілення обов’язків | + | + | + |  |  |  |
| 5. Попередня підготовка процесу |  | + | + |  |  |  |
| 6. Пошук інвестиційних концепцій | + |  |  |  |  |  |
| 7. Остаточне формулювання проекту та оцінка його техніко-економічної та фінансової прийнятності | + | + | + |  |  |  |
| 8. Фінальний розгляд проекту | + | + |  |  |  |  |
| 9.Формування бази даних постачальників матеріалів та обладнання | + | + |  |  |  |  |
| 10. Отримання ліцензії | + |  |  |  |  |  |
| 11. Державний реєстр юридичної особи | + |  |  |  |  |  |
| 12. Пошук будівлі для оренди, договір оренди | + |  |  |  |  |  |
| 13. Ремонт приміщення, проведення комунікацій |  | + | + |  |  |  |
| 14.Придбання та установка обладнання | + | + | + |  |  |  |
| 15. Проведення переговорів, заключення контрактів із постачальниками | + | + |  |  |  |  |
| 16. Закуп матеріалів |  | + |  |  |  |  |
| 17. Формування адміністрації фірми | + |  |  |  |  |  |
| 18. Розробка технології виробництва |  | + | + | + |  |  |
| 19. Формування інструкцій |  | + | + | + |  |  |
| 20. Набір та навчання персоналу | + | + |  |  |  |  |
| 21. Попередня та безпосередня діагностика обладнання і комунікацій |  |  | + | + |  |  |
| 22. Короткотривалі заходи модернізації |  | + | + |  |  |  |
| 23. Здача в експлуатацію та запуск підприємства | + | + | + | + |  |  |
| 24. Уточнення технології виробництва |  | + | + |  |  |  |
| 25. Контроль якості |  |  |  | + |  |  |
| 26. Реклама в соціальних мережах | + | + |  |  | + | + |
| 27. Встановлення контактів із посередниками та споживачами  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  90  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | + |  |  |  |  |  |
| 28. Формування та підписання договорів | + | + |  |  |  |  |
| 29. Інформування потенційних покупців щодо технології | + | + | + |  | + |  |
| 30. Договори із покупцями | + |  |  |  |  |  |
| 31. Продаж технології виробництва ізольованої лінії стовбурових клітин з крові | + |  |  |  |  |  |

**6.7 Ризики стартап-проекту та методи управління ними**

Таблиця 6.20 – Ризики інноваційної розробки

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Назва стадії реалізації проекту** | **Бізнес- процеси** | **Зовнішні ризики** | **Внутрішні ризики** |
| Розробка ідеї стартапу | Створення команди |  | Відсутність експертності в основних питаннях |
| Генерація ідеї |  | Неуважність і перевтома розробників, недостатня забезпеченість інформаційними ресурсами |
| Пошук актуальної інформації | Відсутність необхідної інформації у вільному доступі | Невміння швидко знаходити якісну інформацію |
| Пошук інвестицій | Відсутність джерел фінансування |  |
| Фінальний розгляд проекту | Схожа технологія уже запатентована | Необхідність удосконалення технології |
| Реалізація ідеї | Набір та навчання персоналу | Недостатньо кваліфікованих кадрів із профільною освітою | Незацікавленість персоналу у навчанні та підвищенні кваліфікації, відсутність коштів для навчання персоналу за межами підприємства (курси, семінари, тренінги) |
| Пошук будівлі для купівлі / оренди, договір оренди |  | Оренда приміщення на не вигідних умовах, підвищення вартості оренди |
| Ремонт приміщення, проведення комунікацій |  | Приміщення у аварійному стані або таке, що підлягає капітальному ремонту |
| Придбання та установка обладнання | Відсутність обладнання на ринку для реалізації технології, відсутність бюджетних вітчизняних аналогів обладнання |  |
| Закуп матеріалів | Низька якість матеріалів | Закупівля дороговартісних матеріалів за наявності дешевших альтернатив |
| Впровадження у виробництво  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  91  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | Діагностика обладнання і комунікацій |  | Виявлення несправностей обладнання |
| Короткотривалі заходи модернізації |  | Відсутність ресурсів на модернізацію та оновлення обладнання |
| Запуск підприємства | Підвищення цін на комунальні витрати та зростання податків |  |
| Організація контролю якості |  | Продукція неналежної якості |
| Організація реклами в соціальних мережах |  | Неефективна реклама, неправильно обрана цільова аудиторія та платформи для реклами |
| Масова реалізація | Встановлення контактів із посередниками та споживачами | Зростання конкуренції, падіння попиту на продукцію | Недотримання умов зберігання та транспортування готової продукції |
| Продаж проекту | Продаж технології |  | Невигідна ціна та/або умови продажу технології |

Таблиця 6.21 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Види ризиків** | **Назва ризику** | **Ймовірність настання** | **Вплив на очікуваний результат** |
| **Зовнішні ризики** | | | |
| Науково-технічний ризик | Відсутність необхідної інформації у вільному доступі | 2 | 2 |
| Макроекономічний, інвестиційний ризик | Відсутність джерел фінансування | 2 | 3 |
| Товарний ризик | Недоброчесність постачальників і низька якість товару | 1 | 3 |
| Політико-законодавчий ризик | Зміни в процесі отримання ліцензії, зміна вимог та критеріїв для отримання дозволу на проведення медичної діяльності | 1 | 2 |
| Політико-законодавчий, податковий ризик | Зміни в процесі реєстрації юридичної особи, тощо | 1 | 1 |
| Товарний ризик  Зм.  *НТУУ «КПІ», ФБТ,*  *І-51*  Арк.  № докум.  Підпис  Дата  Арк.  92  *ДП 0108.00.000 ПЗ* | Відсутність обладнання на ринку для реалізації технології, відсутність бюджетних вітчизняних аналогів обладнання | 1 | 3 |
| Макроекономічний, податковий ризик | Підвищення цін на комунальні витрати та зростання податків | 2 | 3 |
| Культурно-соціальний ризик | Падіння попиту на продукцію, зниження платоспроможності потенційних клієнтів | 1 | 3 |
| Товарний ризик | Підвищення собівартості продукції | 2 | 2 |
| Ринковий ризик | Зростання конкуренції | 3 | 1 |
| Ризик ліквідності | Продаж технології на невигідних умовах | 2 | 1 |
| **Внутрішні ризики** | | | |
| Інформаційний ризик | Недостатня забезпеченість інформаційними ресурсами | 1 | 2 |
| Техніко-технологічний ризик | Недосконалість технології | 2 | 3 |
| Юридичний ризик | Неправильно написані заяви, не зібраний повний пакет документів для отримання ліцензії на проведення медичної діяльності | 2 | 2 |
| Майновий ризик | Оренда приміщення на не вигідних умовах, підвищення вартості оренди | 3 | 2 |
| Майновий ризик | Приміщення у аварійному стані або таке, що підлягає капітальному ремонту | 1 | 3 |
| Ресурсний ризик | Закупівля дороговартісних матеріалів за наявності дешевших альтернатив | 1 | 3 |
| Виробничий, техніко-технологічний ризик | Виявлення несправностей обладнання | 2 | 3 |
| Фінансовий ризик | Відсутність ресурсів на модернізацію та оновлення обладнання, навчання персоналу | 1 | 3 |
| Виробничий ризик | Продукція неналежної якості | 1 | 3 |
| Ризик персоналу | Недотримання персоналом санітарно-гігієнічних норм та правил роботи у чистих приміщеннях | 1 | 3 |
| Інформаційний, організаційний ризик | Неефективна реклама, неправильно обрана цільова аудиторія та платформи для реклами | 2 | 3 |
| Транспортний, виробничий ризик | Недотримання умов зберігання та транспортування готової продукції | 2 | 3 |

Таблиця 6.22 – Матриця оцінки ризиків

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

93

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **За впливом ризиків на очікуваний результат** | | **За ймовірністю настання ризиків** | | |
| **Критерій ризику** | **Числове значення** | Низька ймовірність | Середня ймовірність | Висока ймовірність |
| 1 | 2 | 3 |
| Високий рівень впливу | 3 | 8 (1 х 3) | 6 (2 х 3) | 0 (3 х 3) |
| Середній рівень впливу | 2 | 2 (1 х 2) | 3 (2 х 2) | 1 (3 х 2) |
| Низький рівень впливу | 1 | 1 (1 х 1) | 1 (2 х 1) | 1 (3 х 1) |

Таблиця 6.23 – План заходів з управління ризиками

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Назва ризику** | **Назва методу управління ризиком** | **Відповідальні виконавці** | **Період виконання / застосування методу** | **Очікувані результати від впровадження методів управління** |
| Підвищення вартості оренди приміщення | Покриття збитку з поточного доходу або фондів самострахування | Директор | Увесь час | Попередження накопичення боргу перед орендодавцем |
| Відсутність джерел фінансування | Запозичення (кредитування) | Директор | За необхідності | Отримання коштів для потреб підприємства |
| Підвищення цін на комунальні витрати та зростання податків | Покриття збитку з поточного доходу або фондів самострахування | Директор | Увесь час | Попередження накопичення боргу |
| Недосконалість технології | Відмова від ризику | Директор | - | Розробка нової технології |
| Здобуття додаткової інформації | Інженер-технолог | За необхідності | Внесенння змін до наявної технології |
| Виявлення несправностей обладнання | Самострахування | Інженер-технолог | За необхідності | Ремонт або придбання обладнання |
| Неефективна реклама | Відмова від ризику | Директор | За необхідності | Пошук компетентних рекламних агентств |
| Недотримання умов зберігання та транспортування готової продукції | Відмова від ризику | Директор, інженер-технолог | Увесь час | Пошук надійних та добросовісних посередників |

**РОЗДІЛ 7 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА**

Зм.

Арк.

№ документу

Підпис

Дата

Аркуш

94

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консультант

Керівник

Маринченко Л.В.

Затвердив

РОЗДІЛ 7. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

В організації виробництва в біотехнологічній промисловості повинні враховуватися усі елементи праці на всіх стадіях виробництва і залежно від того, як об'єктивно вони будуть враховані, будуть забезпечуватися умови праці робітників.

Охорона праці – це система законодавчих актів та відповідних соціально-економічних, технічних, гігієнічних і організаційних заходів, що забезпечують збереження здоров'я, безпеку та працездатність робітника в процесі праці [44].

Підприємство чи лабораторія, де займаються виробництвом препаратів на основі клітинних ліній, має складне технологічне обладнання, засоби автоматизації процесу та електрообладнання. В технологічному процесі присутні шкідливі для здоров’я хімічні речовини (антитіла для фенотипування клітин, ДМСО).

Антитіла Beckman Coulter містять 0,1% азиду натрію. У кислому середовищі азид натрію утворює азотисто-водневу кислоту, яка є надзвичайно токсичною сполукою. Для утилізації сполук азиду рекомендується змивати їх у водопровідно-каналізаційну систему великою кількістю проточної води. Ці маніпуляції дають змогу уникнути накопиченню азиду натрію в металевих трубах та запобігти утворенню вибухових речовин. У разі попадання реагенту на слизові оболонки, в очі або на шкіру, необхідно промити цю ділянку великою кількістю води.

Всі зразки біологічного матеріалу, проби та матеріали, що контактують з ними, слід розглядати як потенційно інфіковані. Під час роботи з ними та їх утилізації необхідно дотримуватися належних запобіжних заходів та уникати контакту зразків зі шкірою та слизовими оболонками.

Забороняється відбирати зразок через піпетку ротом. Для цього необхідно використовувати самплери (піпеточні дозатори) із одноразовими наконечниками необхідного розміру.

Під час роботи з матеріалами та реагентами слід дотримуватись вимог GLP (Good Laboratory Practice – належна лабораторна практика).

Попередження небезпечних дій під час підготовки та виконання заміни вузлів, реорганізації, нового будівництва та технічного переобладнання обґрунтовано та встановлено ДСТУ Б А.3.2-6:2009 «Система стандартів безпеки праці. Роботи з теплової ізоляції обладнання і трубопроводів. Вимоги безпеки» [45]. Проведення всіх робіт має відповідати вимогам ДСТУ ГОСТ 12.0.230:2008 «Система стандартів безпеки праці. Системи управління охороною праці. Загальні вимоги» [46], ДСТУ 8828:2019 «Пожежна безпека. Загальні положення» [47].

Мають бути приведені до норм такі параметри:

* запиленість та загазованість повітря у виробничих приміщеннях;
* рівень шуму та вібрацій на виробництві;
* рівень світла на робочому місці;
* фізичні показники: температура, вологість, швидкість потоку повітря;
* вміст шкідливих речовин, що не повинен перевищувати рівень ГДК, нормованих ГОСТ 12.1.005-88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны» [48].

Оскільки у технологічному процесі має місце робота із біологічним матеріалом пацієнтів, токсичними речовинами та культурами клітин, велика увага має приділятися попередженню професійних хвороб або інфікування працівників. На виробництві повинен проводитись регулярний та суворий контроль на наявність у повітрі токсичних та хімічних речовин. Працівники повинні користуватися засобами індивідуально захисту (халат, одноразові рукавички і шапочка, маска, окуляри).

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

95

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

У приміщенні виробництва можуть виникати несприятливі умови через недотримання оптимальних параметрів вологості, температури, швидкості руху повітря, підвищеного тепловиділення, що спричинено поганою вентиляцією або надмірним тепловим випромінюванням апаратів або пальників у ламінарних боксах. Ці фактори знижують працездатність та ефективність праці персоналу, підвищується втомлюваність та потовиділення, настає стан надмірної втоми.

Створення оптимальних параметрів мікроклімату виробництва досягається шляхом автоматизації процесу кондиціювання та вентиляції всіх відділень приміщення.

Працювати мають право лише ті працівники, які пройшли інструктаж із техніки безпеки та мають досвід роботи з обладнанням і культурами клітин.

Робота має проводитися лише на справному обладнанні, за наявності кожуха на вузлах, що обертаються, та заземлення обладнання.

Згідно з робочим регламентом періодично проводять перевірку відповідності реальних показників встановленим нормам [49].

Вимоги безпеки до біореакторів, в яких відбувається культивування гемопоетичних стовбурових клітин:

* апарати повинні бути герметичні відносно зовнішнього середовища. Ступінь герметичності апаратів, а також методи і способи їх випробування на герметичність, слід визначати за ОСТ 26.260.14-2001 «Сосуды и аппараты, работающие под давлением. Газовые и жидкостные методы контроля герметичности» [50];
* конструкція апаратів повинна забезпечувати повне звільнення від залишків поживного середовища та культуральної рідини перед їх розбиранням;
* апарати повинні бути забезпечені штуцерами для їх промивання і продування, для встановлення запобіжних пристроїв, контрольно-вимірювальних приладів та арматури. У необхідних випадках для проведення гідравлічних і пневматичних випробувань повинні бути передбачені штуцери для заповнення корпуса апарата й сорочки водою, випуску залишків повітря з верхньої частини корпусу апарату, а також отвір з пробкою і заглушкою для повного зливу води після випробувань;

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

96

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

* температура зовнішніх поверхонь апаратів або кожухів теплоізоляційних покриттів, доступних дотику з робочих місць обслуговуючого персоналу, не повинна перевищувати 45°С у разі установки апаратів усередині виробничих приміщень і 60°С у разі зовнішньої установки.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

97

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Знешкодження відходів – це зменшення або усунення небезпечності відходів шляхом механічного, фізико-хімічного або біологічного оброблення. Знешкодження відходів здійснюється відповідно до наказу «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами" [31].

Система поводження з відходами складається з таких етапів:

* збирання та сортування відходів;
* маркування відходів;
* знезараження (дезінфекція) відходів;
* транспортування і перенесення відходів у корпусні / міжкорпусні (накопичувальні) контейнери в межах закладу, де вони утворюються;
* утилізація відходів (тих, що можуть підлягати утилізації);
* захоронення відходів (лише для відходів категорії А) [31].

Стічні води можуть спускатися у каналізацію тільки відповідно до санітарних правил та норм. Для конденсату, що утворюється під час стерилізації посуду та обладнання під час санітарної підготовки виробництва, проводять регенерацію і знову використовують у виробництві або спрямовують у виробничі відходи [51].

Відходи даного виробництва належать до відходів типу В – епідемічно небезпечні медичні відходи (червоне маркування). Наповнені пакети або контейнери після первинного збирання заливають дезінфікуючим розчином, герметизують, позначають біркою для маркування, переміщують в накопичувальні контейнери, що закриваються кришкою та направляються на утилізацію [31].

**ВИСНОВКИ**

Зм.

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Аркуш

98

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консульт.



Керівник

Маринченко Л.В.

Затверд.

ВИСНОВКИ

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

1. На основі наукового та патентного пошуку було обґрунтовано та вибрано біотехнологію ізольованої лінії гемопоетичних стовубрових клітин, надано характеристику біологічного агента.

2. У проекті для виробництва препарату ізольованої лінії стовбурових клітин з крові як посівний матеріал обрано ГСК із концентрацією після останнього пасажування 5∙103 кл / мл, сепаровані з мононуклеарної суспензії, що була виділена з периферичної крові пацієнта.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості гемопоетичних стовбурових клітин було обрано готове безсироваткове синтетичне стерильне поживне середовище PluriSTEM®, а також визначені раціональні параметри культивування: температура 37 °С, перемішування при 10 хв-1, тривалість 4 - 5 діб, концентрація СО2 на рівні 6 %.

4. Відповідно до вимог до готової форми та якості препарату було розроблено технологічну схему, що передбачає культивування в біореакторі.

5. Для культивування ГСК обрано і розраховано конструкцію біореактора об’ємом 0,01 м3 із рубашкою, еліптичною кришкою та днищем, лопатевою мішалкою та барботером. Здійснено технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

6. Розроблено апаратурну схему виробництва та креслення біореактора, автоматизацію дільниці біосинтезу.

7. Виконано економічні розрахунки технології та розроблено стартап-проєкт виробництва препарату ізольованої лінії стовбурових клітин з крові для аутотрансплантації. Продуктивність виробництва – 5025 млн ГСК (≈ 70 доз препарату) на рік, загальна собівартість 1 млн клітин – 68,85 дол., рентабельність 190 %.

8. На основі аналізу шкідливих і небезпечних факторів виробництва розроблено заходи по створенню безпечних умов праці, пожежної безпеки виробництва, знешкодження та утилізації відходів.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

99

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

Зм.

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Аркуш

100

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

Розробив

Калініченко Ю.О.

Консульт.



Керівник

Маринченко Л.В.

Затверд.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ

ЛІТЕРАТУРИ

Стадія

Аркушів

105

КПІ ім. Ігоря Сікорського

ФБТ, БМ-01 мп

1. Lin K. K., Challen G. A. and Goodell M. A. (2011) ‘Hematopoietic Stem Cell Properties, Markers, and Therapeutics’, Principles of Regenerative Medicine. Elsevier, pp. 273–284.

2. Slack, Jonathan M.W.. "stem cell". Encyclopedia Britannica, 29 Mar. 2021, [https://www.britannica.com/science/stem-cell. Accessed 6 November 2021](https://www.britannica.com/science/stem-cell.%20Accessed%206%20November%202021).

3. Atala A, Lanza R (2012-12-31). [*Handbook of Stem Cells*](https://books.google.com/books?id=wm-K_dKpjBAC&pg=RA1-PA451). Academic Press. p. 452. [ISBN](https://en.wikipedia.org/wiki/ISBN_(identifier)) [978-0-12-385943-3](https://en.wikipedia.org/wiki/Special:BookSources/978-0-12-385943-3).

4. Armitage P., Geoffrey B., Matthews J. Statistical Methods in Medical Research. 4th ed. Wiley, 2013. Web. 26 Sept. 2021.

5. Федулов А.С., Усс А.Л., Кривенко С.И. / Лечение фармакорезистентных форм рассеянного склероза с применением аутологичной трансплантации мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток // Инструкция по применению. Минск, 2010.

6. Haas S, Trumpp A, Milsom MD. Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. Cell Stem Cell. 2018 May 03;22(5):627-638

7. Servida F, Soligo D, Caneva L. Functional and morphological characterization of immunomagnetically selected CD34+ hematopoietic progenitor cells. Stem Cells. 1996 Jul;14(4):430-8.

8. Noll T, Jelinek N, Schmid S, Biselli M, Wandrey C. Cultivation of hematopoietic stem and progenitor cells: biochemical engineering aspects. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2002;74:111-28.

9. Broxmeyer H.E., Srour E.F., Hangoc G. et al. High efficiency recovery of hemato-poietic progenitor cells with extensive proliferative and ex vivo expansion activity and of hematopoietic stem cells with NOD/SCID mouse repopulation ability from human cord blood stored frozen for 15 years. Proc Nail Acad Sci USA 2002;00:645–50.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

101

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

10. Eaves, C.J. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality / C.J. Eaves // Blood. – 2015. – V. 125. – № 17. – P. 2605–2613.

11. Среда для экспансии гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников Miitenyi Biotec StemMACS HSC Expansion Media XF. URL: <https://www.ld.ru/cell-technologies/item-240114.html>

12. Dybedal I., Jacobsen S. E. Transforming growth factor beta (TGF-beta), a potent inhibitor of erythropoiesis: neutralizing TGF-beta antibodies show erythropoietin as a potent stimulator of murine burst-forming unit erythroid colony formation in the absence of a burst-promoting activity. – 1995.

13. McAdams T. A., Miller W. M., Papoutsakis E. T. Hematopoietic cell culture therapies (Part I): cell culture considerations //Trends in biotechnology. – 1996. – Т. 14. – №. 9. – С. 341-349.

14. Meissner P. et al. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells //Cytotechnology. – 1999. – Т. 30. – №. 1. – С. 227-234.

15. LaIuppa J. A. et al. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells //Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials. – 1997. – Т. 36. – №. 3. – С. 347-359.

16. De León A., Mayani H., Ramírez O. T. Design, characterization and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions //Cell Culture Engineering VI. – Springer, Dordrecht, 1998. – С. 127-138.

17.  Ito K, Suda T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2014;15:243–256.

18. Yadav P, Vats R, Bano A, Bhardwaj R. Hematopoietic Stem Cells Culture, Expansion and Differentiation: An Insight into Variable and Available Media. Int J Stem Cells. 2020;13(3):326-334.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

102

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

19. Bruns I, Cadeddu RP, Brueckmann I. Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.*2012;120:2620–2630.

 20. Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med.*2000;192:1281–1288.

21. Соловьева В.В. Выделение, культивирование и биохимический анализ первичных клеток человека: учеб. пособие / В.В. Соловьева, Л.Г. Тазетдинова, А.А. Ризванов. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2018. – 114 с.

22. Способ получения криоконсервированных мононуклеарных клеток: пат. 2743816 РФ: 2743816C1 / Васильева В.А., Камельских Д.В., Капранов Н.М. [и др.] // 26.02.2021, бюл. № 6.

23. Kekarainen T., Mannelin S., Laine J. *et al.* Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biol* **7,**30 (2006).

24. Кондрачук А.Н., Стельмаченок И.С., Воропаев Е.В., Николаев В.И. / Сравнительный анализ методов выделения гемопоэтических стволовых клеток (CD34+). / Проблемы здоровья и экологии. 2007;(2):85-93.

25. Айзенштадт А.А., Багаева В.В., Хрупина А.С. и соавт. Современные проблемы культивирования гематопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для трансплантации в онкогематологии и их решение // Вестник СЗГМУ им. И.И.Мечникова. 2012; №4(15): 12-18

26. Chatterjee I. Induced pluripotent stem (iPS) cell culture methods and induction of differentiation into endothelial cells / Chatterjee I., Li F., Kohler E., Rehman J., Malik A., Wary K // Methods in Molecular Biology – 2016. – V. 1357.

27. Сидоров Ю.І., Влезло Р.Й., Новіков В.П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. В 3 томах. – Львів: Видавництво Національного університету «Львівська політехніка», 2004. – 252с.

28. Stem cell culture media and methods of enhancing cell survival: pat. ЕР14767366 / EP2970894A4 / B. D. Rezner / 04.01.2017, The Official Journal of the European Patent Office, №12/82.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

103

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

29. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. Am J Hematol. 2007;82(6):463-472.

30. Donaldson С., Armitage W.J., Denning-Kendall P.A. Optimal Cryopreservation of human umbilical cord blood // Bone Marrow Transplant. -2006.- Vol.18, N.4.- P.725-731.

31. [Державні санітарно-протиепідемічні правила й норми щодо поводження з медичними відходами, затверджені наказом Міністерства охорони здоров’я](https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0959-15#Text) від 8 червня 2015 року. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0959>

32. Наказ МОН «Про затвердження Порядку проведення клінічних випробувань тканинних і клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань й унесення змін до Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань, затвердженого наказом Міністерства охорони здоров'я України від 13.02.2006 N 66, зареєстрованого в Міністерстві юстиції України 10.03.2006 за N 252/12126».

33. Van der Meer D, Barthorpe S, Yang W, et al. Cell Model Passports-a hub for clinical, genetic and functional datasets of preclinical cancer models. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1): D923-D929. doi:10.1093/nar/gky872

34. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов: В 8 кн./ Под. ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн. 4. Автоматизация биотехнологических исследований / Д.В. Зудин, В.М. Кантере, Г.А. Угодчиков. – М.: Высш. шк., 1987. – 112 с.

35. Ферментаторы с подводом энергии газовой фазой: методические рекомендации по проведению практических занятий по дисциплине «Оборудование биотехнологических производств» для студентов направления подготовки 19.03.01 «Биотехнология» (профиль – Биотехнология) очной формы обучения / И.Н. Павлов, Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2018. – 14 с.

36. Процеси та обладнання хімічної технології. [текст]: підручник/ Корнієнко Я.М., Лукач Ю.Ю., Мікульонок І.О. та ін. – Київ: НТУУ «КПІ», 2011. -Ч.1-416с.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

104

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

37. Ружинська Л.І. Проектування реакторів біотехнологічних та фармацевтичних виробництв. Навч. посібник/ Укладачі: Л.І. Ружинська, І.А. Буртна, В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибецький – К.: НТУУ «КПІ», 2014 – 130 с.

38. Гапонов К.П. Процессы и аппараты микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. – 240 с.

39. Учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности «Машины и аппараты химических производств и предприятий строительных материалов» / И.В. Доманский, В.П. Исаков, Г.М. Островский, А.С. Решанов, В.Н. Соколов. // Под общ. ред. В.Н. Соколова. - 2-е изд., перераб. и доп. - СПб.: Политехника, 1992. - 327 с.

40. Колосков С. П. «Оборудование ферментной промышлености» Москва, Пищевая промышленность, 1969. - 383 с.

41. Калунянц К. А., Голгер Л. И., Еллашов В. Е. / Оборудование микробиологических производств // – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.

42. Иоффе И.Л. Проектирование процессов и аппаратов химической технологии: Учебник для техникумов. – Л.: Химия, 1991. – 352 с.

43. ГОСТ Р ЕН 12297-2012. Биотехнология. Оборудование. Методы контроля приспособленности к стерилизации.

44. Мосичев М.С. Общая технология микробиологических производств. Легкая и пищевая промышленость. М., 1982. - 264 с.

45. ДСТУ Б А.3.2-6:2009. Система стандартів безпеки праці. Роботи з теплової ізоляції обладнання і трубопроводів. Вимоги безпеки.

46. ДСТУ ГОСТ 12.0.230:2008. Система стандартів безпеки праці. Системи управління охороною праці. Загальні вимоги.

47. ДСТУ 8828:2019. Пожежна безпека. Загальні положення.

48. ГОСТ 12.1.005-88. ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

49. Стабников В.Н. Проектирование процессов и аппаратов пищевых производств. К.: Высшая школа, 1982. - 199 с.

Зм.

*НТУУ «КПІ», ФБТ,*

*І-51*

Арк.

№ докум.

Підпис

Дата

Арк.

105

*ДП 0108.00.000 ПЗ*

50. ОСТ 26.260.14-2001. Сосуды и аппараты, работающие под давлением. Газовые и жидкостные методы контроля герметичности.

51. Остриков, А.Н. Процессы и аппараты пищевых производств: учебное пособие / А.Н. Остриков; под ред. А. Н. Острикова. — Санкт-Петербург: ГИОРД, 2012. — 616 с.