

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

**Факультет біомедичної інженерії
Кафедра трансляційної медичної біоінженерії**

«На правах рукопису»
УДК 577:604:616-006

До захисту допущено
Завідувач кафедри
Олександр
БЕСАРАБ
(підпис)

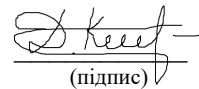
« » 20
р.

Магістерська дисертація

зі спеціальності: 163 Біомедична інженерія, ОПП «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»
на тему: Біоінженерний проект отримання моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози

Виконала: студентка 2 курсу, групи БФ-21мп

Коблевська Діана Владиславівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

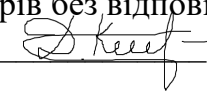

(підпис)

Науковий керівник зав.каф. ТМБ, доц., к.т.н., Бесараб О.О.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент к.т.н., доц., доц. каф. ББЕ, Жукова В.С.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Київ – 2024 року

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біомедичної інженерії
Кафедра трансляційної медичної біоінженерії**

Рівень вищої освіти: другий (магістерський)
Спеціальність: 163 – Біомедична інженерія
Освітньо-професійна програма «Регенеративна та біофармацевтична інженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

В.о.завідувача кафедри трансляційної
медичної біоінженерії

_____Олександр БЕСАРАБ
«2» листопада 2023 р.

ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студенту

Коблевській Діані Владиславівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема дисертації: Біоінженерний проект отримання моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози
науковий керівник дисертації зав.каф. ТМБ, доц., к.т.н., Бесараб О.О.
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом по університету від «6» листопада 2023 р. № 5161-с.
2. Термін подання дисертації здобувачем «10» січня 2023 р.
3. Об'єкт дослідження: гібридомна технологія виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози.
4. Предмет дослідження: розробка виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози.
5. Перелік завдань, які потрібно розробити:
 - обґрунтувати обрану технологію виробництва, розробити технологічну схему виробництва;
 - розробити та обґрунтувати схему компоновки приміщень і схему потоків сировини та матеріалів;
 - розробити систему контролю якості;
 - розробити систему оцінки виробничих ризиків та систему управління ними;
 - розробити стартап-проект та розрахувати економічні показники підприємства.

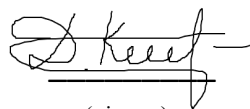
6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: 3 плакати формату А1: технологічна схема, схема компоновки приміщень, схема потоків сировини та персоналу.

7. Дата видачі завдання: «02» листопада 2023 р.

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Літературний огляд на тему МД	до 26.10.2023	
2	Обґрунтування обраної технології виробництва	до 4.11.2023	
3	Технологічна схема (креслення)	до 11.11.2023	
4	Схема компоновки приміщень (креслення)	до 16.11.2023	
5	Схема потоків сировини та персоналу (креслення)	до 17.11.2023	
6	Обґрунтування схеми компоновки приміщень та схеми потоків сировини та персоналу	до 19.11.2023	
7	Система контролю якості	до 22.11.2023	
8	Оцінка виробничих ризиків	до 24.11.2023	
9	Стартап-проект	до 28.11.2023	
10	Оформлення дисертації	до 09.01.2024	
11	Перевірка на плагіат готової дисертації	09.01.2024	

Здобувач



(підпис)

Д.В. Коблевська

(ініціали, прізвище)

Науковий керівник дисертації

(підпис)

О.Б. Бесараб

(ініціали, прізвище)

РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація за темою: “Біоінженерний проект отримання моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози”.

У магістерській дисертації міститься: 4 ілюстрації, 27 таблиць, 3 креслення, 1 додаток, опрацьовано 68 джерел. Загальний обсяг роботи становить: 118 сторінок.

Актуальність: У 2020 році виявлено 2,3 мільйони нових випадків раку молочної залози. Цей тип раку є найпоширенішим серед жінок і становить 24,5% від усіх випадків ракових захворювань. В Україні зареєстровано 18 тисяч інцидентів, 39% з яких закінчились смертю. Найчастішою причиною такої високої смертності є виявлення захворювання на пізніх стадіях або неефективна діагностика. Моноклональні антитіла, специфічні до антигенів раку молочної залози можуть стати потужним інструментом для діагностики та моніторингу процесу лікування. Така діагностика допоможе не тільки ідентифікувати наявність відповідних антигенів та підтвердити діагноз, але і визначити підтип раку, відповідно до якого призначатиметься лікування.

Метою даної дисертації є проектування виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози. В результаті планується забезпечити близько 30% населення України, що потребує діагностики раку молочної залози, продукцією та, в результаті, попередити високу смертність від захворювання в країні.

Об’єкт дослідження: гібридомна технологія виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози.

Предмет дослідження: розробка виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози.

Ключові слова: моноклональні антитіла, рак молочної залози, діагностика раку, виробництво МкАТ.

					БФ2107.23.40.001ПЗ		
Вим	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробила	Коблевська				Літ.	Лист	Листів
Перевірів	Бесараб					4	118
Реценз.					РЕФЕРАТ КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБМІ БФ-21мп		
Н. Контр.							
Затвердив							

ABSTRACT

Master's dissertation on the topic: "Bioengineering project of obtaining monoclonal antibodies specific for breast cancer antigens".

The master's dissertation contains: 4 illustrations, 27 tables, 3 drawings, 1 appendix, 68 sources are processed. The total volume of the paper is 118 pages.

Relevance: In 2020, 2.3 million new cases of breast cancer were detected. This type of cancer is the most common among women and accounts for 24.5% of all cancers. 18,000 accidents were registered in Ukraine, 39% of which lethal. The most common reason for such a high mortality rate is detection of the disease at late stages or ineffective diagnosis. Monoclonal antibodies specific for breast cancer antigens can become a serious and powerful tool for diagnosis and monitoring of the treatment process. Such diagnostics will help not only to identify the presence of relevant antigens and confirm the diagnosis, but also to detect the cancer subtype according to which the treatment will be prescribed.

The purpose of this dissertation is to design the production of monoclonal antibodies specific for breast cancer antigens. As a result, it is planned to provide about 30% of the population of Ukraine, which needs a diagnosis of breast cancer, with products and, as a result, to prevent high mortality from the disease in the country.

Research object: hybridoma technology for the production of monoclonal antibodies specific for breast cancer antigens.

Research subject: development of production of monoclonal antibodies specific for breast cancer antigens.

Key words: monoclonal antibodies, breast cancer, cancer diagnosis, MABs production.

					БФ2107.23.40.001ПЗ				
<i>Вим</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>					
<i>Розробила</i>	<i>Коблевська</i>				<i>Літ.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>		
<i>Перевірів</i>	<i>Бесараб</i>					5	118		
<i>Реценз.</i>					<i>ABSTRACT</i>				
<i>Н. Контр.</i>				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського</i> <i>ФБМІ БФ-21мп</i>					
<i>Затвердив</i>									

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ.....	9
1 Рак молочної залози.....	9
1.1 Епідеміологія та патогенез.....	9
1.2 Сучасні методи діагностики.....	12
1.3 Антигени.....	15
2 Моноклональні антитіла.....	18
2.1 Структура та функції.....	18
2.2 Методи отримання.....	20
2.3 Застосування в діагностиці раку молочної залози.....	23
3 Гібридомні технології для отримання моноклональних антитіл.....	25
4 Виробництво моноклональних антитіл в Україні та світі.....	28
Висновки до розділу 1.....	30
РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ОБРАНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА.....	33
Висновки до розділу 2.....	56
РОЗДІЛ 3. ОРГАНІЗАЦІЯ УПРАВЛІННЯ ПРОЕКТОМ: ПРОЕКТУВАННЯ, БУДІВНИЦТВО, ЗАПУСК, ЕКСПЛУАТАЦІЯ.....	57
Висновки до розділу 3.....	61
РОЗДІЛ 4. СИСТЕМА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ.....	62
Висновки до розділу 4.....	69
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА ВИРОБНИЧИХ РИЗИКІВ.....	70
Висновки до розділу 5.....	82
РОЗДІЛ 6. СТАРТАП-ПРОЄКТ.....	83
Висновки до розділу 6.....	109
ВИСНОВКИ.....	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	112

					БФ2107.23.40.001ПЗ					
					ЗМІСТ					
<i>Вим</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розробила</i>	<i>Коблевська</i>							<i>Літ.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Бесараб</i>								6	118
<i>Реценз.</i>								<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського</i>		
<i>Н. Контр.</i>					<i>ФБМІ БФ-21мп</i>					
<i>Затвердив</i>										

ВСТУП

Рак молочної залози (МЗ) є одним з найпоширеніших видів раку серед жінок у всьому світі. В Україні 44% випадків захворювання раком серед жінок припадає саме на рак цього типу. В 2020 році було зареєстровано 18 тисяч інцидентів, 39% з яких закінчились смертю [1]. Найчастішою причиною такої високої смертності є виявлення захворювання на пізніх стадіях або неефективна діагностика. Це тяжке захворювання має високу смертність і потребує ефективних методів діагностики та лікування.

Серед наявних сучасних методів діагностики присутні мамографія, магнітно-резонансна томографія, ультразвукова діагностика, позитронно-емісійна томографія, однофотонна емісійна томографія тощо. Незважаючи на популярність зазначених методів, їх ефективність обмежена, а результати діагностики майже завжди вимагають підтвердження іншими методами.

Серед методів, що додатково застосовуються для діагностики раку молочної залози, імуногістохімічний аналіз (ІГХ). ІГХ використовує реакцію антиген-антитіло для виявлення, візуалізації та обстеження антигенних білків у тканинних зразках. Імуногістохімічний аналіз дозволяє досліджувати як кількісні характеристики клітин зразка, так і якісні - форму та структуру. Такий підхід до діагностики дозволяє точніше визначати стадію та підтип раку, що безпосередньо впливає на ефективність подальшого лікування.

Моноклональні антитіла, специфічні до антигенів раку МЗ можуть стати серйозним та потужним інструментом для діагностики та моніторингу процесу лікування. Вони використовуються в якості реагентів в тест-системах при діагностиці та мають вищу чутливість, ніж інші схожі методи. Однією з найпопулярніших технологій виробництва моноклональних антитіл є гібридомна технологія, суть якої полягає в злитті В-лімфоцита імунізованої антигеном раку МЗ миші та мієломної клітини. Таким чином, відбувається отримання продуцента, який синтезує специфічні антитіла.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		7

Метою даної дисертації є проектування виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози. Готовою продукцією планується забезпечити 30% населення України, яке потребує діагностики раку молочної залози за допомогою імуногістохімічного аналізу.

Об'єкт дослідження: гібридомна технологія виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози.

Предмет дослідження: розробка виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела на тему гібридомної технології отримання моноклональних антитіл.
2. Розробити та обґрунтувати технологічну схему, схему компоновки приміщень та обладнання, схему потоків сировини та персоналу виробництва.
3. Розробити систему контролю якості виробництва.
4. Розробити систему оцінки виробничих ризиків та план управління ними.
5. Розробити стартап-проект та розрахувати економічні показники підприємства.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		8

РОЗДІЛ 1. АНАЛІЗ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1 Рак молочної залози

1.1 Епідеміологія та патогенез

За даними Міжнародного агентства з дослідження раку тільки в 2020 році було зафіксовано близько 2,3 млн нових випадків захворювання раком молочної залози. Серед жінок цей вид раку є найбільш поширеним — 24,5% всіх випадків захворювання припадає саме на нього [1]. На Європу в тому ж 2020 році припало більше півмільйона випадків.

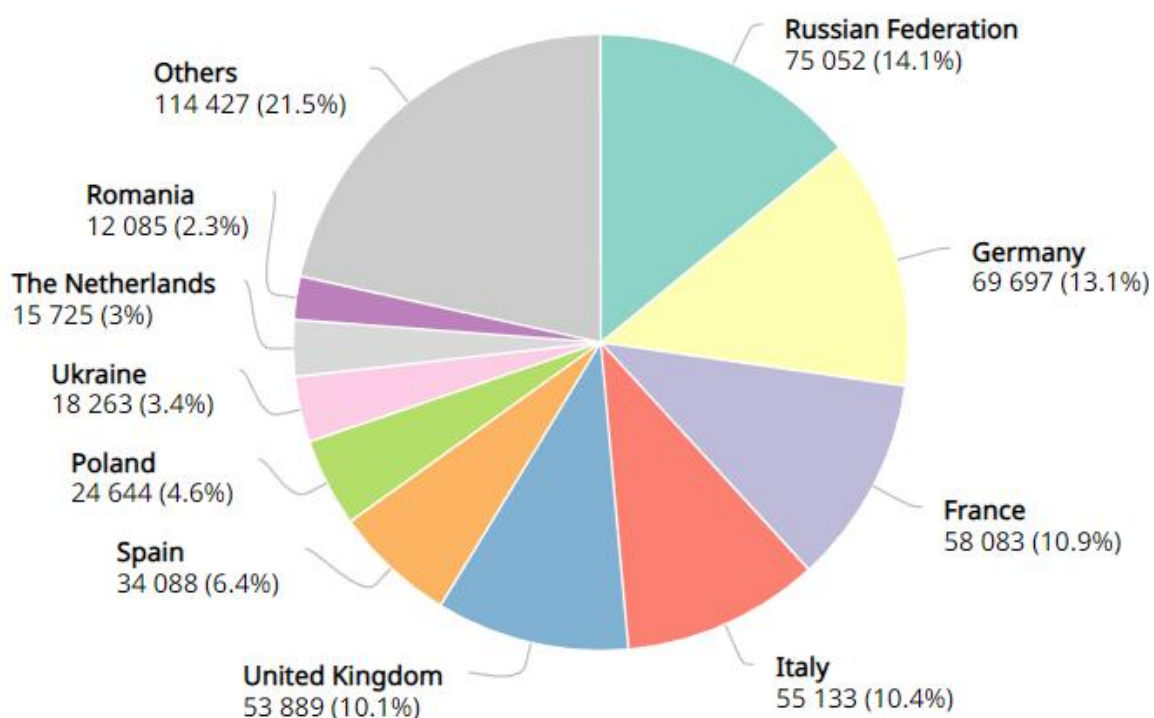


Рисунок 1. Число нових випадків жіночого раку молочної залози в європейських країнах в 2020 році [1]

Смертність має приблизно ту саму тенденцію розподілу по країнам, що і захворюваність. На 18 тисяч інцидентів в Україні приходить 7 тисяч смертей, тобто 39% від всіх діагностованих випадків [1]. Така висока смертність може бути зумовлена багатьма факторами, серед яких як

					БФ2107.23.40.001ПЗ		
Вим	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробила	Коблевська				Літ.	Лист	Листів
Перевіриє	Бесараб					9	118
Реценз.					РОЗДІЛ 1 КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБМІ БФ-21мп		
Н. Контр.							
Затвердив							

соціально-економічні фактори: недосконала система охорони здоров'я, висока вартість препаратів для лікування, брак приладів для маммографії або інших методів в лікарнях малих населених пунктів, відсутність адекватної культури турботи про себе тощо, так і патогенетичні: непомітний та/або швидкий перебіг хвороби, поява метастаз тощо.

Кількість випадків захворювання зазвичай є вищою серед жінок, які мають більший достаток, як всередині країн, так і на міжнародному рівні. Насамперед це може бути пов'язано з більшою доступністю різних методів скринінгу для жінок середнього класу достатку та вище. Понад дві третини випадків раку грудей діагностуються у жінок у віці 50 років і старше, і більшість цих випадків припадає на розвинені країни. З 1980-х до кінця 1990-х років інцидентність раку грудей зросла приблизно на 30% у західних країнах. Ймовірно, цей тренд зумовлений змінами у репродуктивних звичках та загальним збільшенням кількості проведених скринінгів [2].

Фактори ризику досить давно встановлені епідеміологічними дослідженнями і можуть бути як залежними від способу життя та набутих змін, так і незмінними вродженими. Виділяють наступні канцерогенні фактори:

- вік понад 50 років;
- раннє настання менархе;
- мутації BRCA-1, BRCA-2;
- пізні перші пологи або їх відсутність;
- куріння та надмірне вживання алкоголю;
- атипова гіперплазія тканини молочної залози;
- наявність раку молочної залози у кровних родичок;
- вживання естрогену з метою контрацепції чи лікування;
- рак або доброякісні пухлини молочної залози в анамнезі;
- високий вміст тваринних жирів та червоного м'яса та низький вміст фруктів та овочів в дієті [2,3].

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		10

Патогенез раку молочної залози частіше розглядають на рівні органу. На початку розвитку захворювання відбуваються зміни, які призводять до формування гіперплазій молочних залоз, таких як мастопатії та фіброаденоматозів [3].

В результаті дії сукупності вищезгаданих канцерогенних факторів відбувається пошкодження нормальних клітин молочної залози в протоковому епітелії. Як наслідок, це призводить до процесів регенерації, які супроводжуються проліферативними змінами. Під час проліферації виникають мутації в клітинах залоз, що призводить до отримання пухлинних характеристик деякими з них [3].

Клітина починає вважатися злоякісною з моменту, коли внаслідок мутацій вона набуває здатності до інвазивного росту. Після досягнення діаметру пухлини близько 0,5 мм, починається процес неоангіогенезу, коли пухлина проростає в судини і її клітини починають потрапляти в кровоносну систему [3].

Злоякісна пухлина молочної залози виділяє до 1 мільйона своїх клітин в кровоносну систему щодня. Приблизно 99,9% з них гинуть, однак окремі клітини потрапляють до судин паренхіматозних органів або лімфових вузлів, де імплантуються, руйнують стінки судин та виходять за їх межі. Найчастіше рак молочної залози метастазує до печінки, легень, кісток, головного мозку та лімфатичних вузлів [3].

Розрізняють три різні підтипи раку, залежно від вираженості в зразках пухлинних тканин, рецепторів естрогену чи прогестерону або білку HER2:

- ER/PgR-позитивний. Складає близько 70% всіх випадків, характеризується високою експресією естрогенових чи прогестерованих рецепторів.

- HER2-позитивний. Складає від 15% до 20% всіх випадків. Має високі рівні HER2 білку.

- Triple-negative. Складає близько 15% всіх випадків. В зразках не виражені ні естрогенові/прогестеронові рецептори, ні HER2 [4].

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		11

1.2 Сучасні методи діагностики

Серед традиційних та широко відомих методів сучасної діагностики налічується декілька основних: мамографія, ультразвукове дослідження та магнітно-резонансна томографія.

Мамографія залишається основним методом виявлення раку молочної залози. Діагностичні мамографії проводяться у жінок, у яких присутнє пальповане утворення чи інші симптоми захворювання молочної залози або записи про рак грудей за останні 5 років в анамнезі [5].

Показано, що застосування методів мамографії може знизити смертність від раку молочної залози на 19%. Однак, наряду з різними перевагами на кшталт високої точності методу, існують і деякі обмеження, пов'язані з використанням цієї техніки, такі як біль при обстеженні, хибнопозитивні результати та радіаційне опромінення, що особливо небажано для жінок до 40 років [6].

Кажучи про рентгенографічні методи обстеження, також неможливо не згадати про дуктографію, яка, по суті своїй, є різновидом мамографічного дослідження. При даному дослідженні відбувається введення контрастної речовини на основі гадолінію — рідкоземельного металу в молочні протоки залози. Штучне контрастування забезпечує ефективнішу візуалізацію при отриманні знімків. Основними причинами для проведення дуктографії є: патологічна секреція із соска, вибір оптимальної тактики лікування, уточнення результатів неконтрастної мамографії тощо [7].

Ультразвукове дослідження є ще одним методом візуалізації, який відомий як один з найпоширеніших методів діагностики та моніторингу під час терапії.

Показання для ультразвукового обстеження молочної залози включають наявність пальпованих змін в структурі чи формі молочної залози, аномалії або підозрілі зміни на мамографії, проблеми з імплантами грудей, підозрілі новоутворення, наявність мікрокальцифікацій або інших морфологічних змін

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		12

виявлених на мамографії. Також УЗД може бути проведено в якості додаткового скринінгового обстеження жінок з високим ризиком розвитку раку молочної залози, якщо вони не мають доступу до мамографії або не мають змоги провести її за певних медичних показань [5].

Використання ультразвуку має низку переваг. На відміну від мамографії метод не використовує іонізуюче випромінювання, однак все ще має непогану чутливість, що робить його потужним інструментом для діагностики пухлин молочних залоз у молодих, вагітних і годуючих жінок [6]. При цьому, однак, неможлива візуалізація протоків молочної залози, якщо їх діаметр менше 3-4 мм [7].

Магнітно-резонансна томографія молочних залоз — невід'ємна частина діагностики раку грудей. Такий спосіб обстеження особливо підходить пацієнткам з грудними імплантами та високим ризиком розвитку даного захворювання, а також може бути здійснений в будь-який день менструального циклу в виду своєї абсолютної безболісності [5,7]. МРТ також може призначатися для уточнення результатів мамографії та/або УЗД при отриманні сумнівних результатів обстеження згаданими методами, а також для чіткого та швидкого визначення стадії захворювання при початковій діагностиці.

Зазначені методи, включаючи мамографію, ультразвукове дослідження та МРТ, можуть використовуватися як ефективні інструменти для виявлення та моніторингу пацієнтів з раком молочної залози. З іншого боку, ці методи пов'язані з різними обмеженнями, такими як недостатня чутливість. За даними різних досліджень, чутливість найбільш застосовуваного методу мамографії коливається між значеннями від 58 до 100%. При цьому спостерігається тенденція зменшення значення чутливості при збільшенні вибірки досліджуваних зразків [6]. В той же час МРТ іноді не здатна виявити пухлин малого розміру.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		13

ПЕТ (позитронно-емісійна томографія) та ОФЕКТ (однофотонна емісійна комп'ютерна томографія) — технології, які також були помічені в застосуванні при діагностиці раку молочної залози. ПЕТ використовує радіоактивні ізотопи, які випускають позитрони, в той час як ОФЕКТ — ізотопи, що випускають гамма фотони Технецію чи Йоду. В одному з досліджень 2005 року було оцінено ефективність технік ПЕТ і ОФЕКТ у 15 пацієнтів з метастатичним ураженням кісток внаслідок раку молочної залози. Результати показали, що чутливість ОФЕКТ для діагностики кісткових метастаз становила 85%, а для ПЕТ — 17% [8].

Основна проблема цих методів - вони, очевидно, не підходять для первинної діагностики, оскільки розростання метастаз це процес, що відбувається на пізній, 4 стадії захворювання (див. 1.1). Застосування таких технологій буде більш доцільним при прогнозуванні перебігу метастатичного ураження та моніторингу результатів лікування.

Трепан-біопсія та імуногістохімічний аналіз - це діагностичні інструменти, які часто йдуть пліч-о-пліч. Трепан-біопсія обов'язково застосовується при оцінці пацієнтів з сумнівними результатами або підтвердженим діагнозом після клінічного огляду та мамографії та/або УЗД. Такий метод допомагає отримати зріз тканин для гістологічного дослідження [7].

Імуногістохімія (ІГХ) використовується для виявлення та характеристики білків у клітинах та тканинах. При даному методі використовують прогностичні та діагностичні біомаркери для прогнозування протікання хвороби та діагностики відповідно [9].

ІГХ використовує реакцію антиген-антитіло для виявлення, візуалізації та обстеження антигенних білків у тканинних зразках.

Імуногістохімічний аналіз дозволяє досліджувати як кількісні характеристики клітин зразка, так і якісні — форму та структуру. Цей аналіз передбачає кроки, в яких антиген специфічно реагує з антитілом, а потім ця

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		14

реакція візуалізується і спостерігається під мікроскопом. Для візуалізації використовують два загальноприйняті методи: ферментне та флуоресцентне маркування [10].

Ферментне маркування використовує реакцію ферменту, яка призводить до видимого осадження. В цьому методі, антитіло маркується ферментом, таким як пероксидаза або алкалінова фосфатаза. Коли фермент реагує зі спеціальним субстратом, відбувається хімічна реакція, що призводить до утворення видимого осаду або забарвлення. Електронна мікроскопія допомагає визначити наявність, морфологію клітин та підрахувати їх кількість. При флуоресцентному маркуванні антитіло маркується флуорофором і реакцію антиген-антитіло можна спостерігати вже за допомогою флуоресцентної мікроскопії [10].

1.3 Антигени

Виявлення антигенів раку молочної залози може стати важливим предиктором в прогнозуванні захворювання. Серед біомаркерів раку грудей зустрічаються білки, мРНК, ферменти та мікроРНК. Найчастіше асоційованими з пухлинами цього типу раку вважають біомаркери HER2, Ki-67, ER та PgR. Також вивчаються деякі інші біомаркери, що пов'язані з раком молочної залози: CEA, MUC-1, hTERT та інші [6,11,12].

Найбільша кількість науково-медичних досліджень пов'язана з біомаркером HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). Даний біомаркер є протоонкогеном та пов'язаний з регуляцією проліферативних реакцій в молочній залозі [5].

Оцінка HER2 зазвичай здійснюється за допомогою імуногістохімічного аналізу. Аналіз експресованості біомаркера активно проводиться для діагностики раку молочної залози, незалежно від наявності метастаз в організмі, а також під час моніторингу лікування препаратами з моноклональними антитілами на кшталт Трастузумабу. Висока вираженість

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		15

HER2 не тільки пов'язана з поганими прогнозами, але і часто свідчить про стійкість пухлини до хіміотерапії [12].

Ki-67 (біомаркер клітинної проліферації) — це великий ядерний білок, який існує у двох ізоформах. Визначення рівня експресії Ki-67 відіграє важливу роль у визначенні підтипів раку грудей і є одним з критеріїв для визначення схеми хіміотерапії. Збільшена експресія Ki-67 також пов'язана з поганим прогнозом лікування і тісно пов'язана з ростом пухлини, оскільки рівень експресії Ki-67 дуже низький у нормальних тканинах грудей. Позитивна реакція тесту на виявлення Ki-67 у тканинах доволі часто пов'язана зі швидким ростом пухлини, схильністю до метастазування, високим ризиком рецидиву та високою смертністю [12].

Випадки з позитивною реакцією на Ki-67 є більш активними щодо зростання, більш агресивними щодо інвазії і характеризуються більш вираженим метастазуванням. Крім того, високий рівень експресії Ki-67 пов'язаний з частотою рецидивів та низьким загальним виживанням пацієнтів.

Рецептори жіночих статевих гормонів, естрогену (ER) та прогестерону (PgR), належать до ядерних рецепторів (NR), які представляють собою велику суперсім'ю білків-транскрипційних факторів зв'язування з ДНК. ER та PgR регулюють транскрипцію певних генів, як наслідок, контролюючи вироблення жіночих статевих гормонів [12].

Рецептори естрогену і прогестерону мають схожу структурну та функціональну організацію і відіграють важливу роль у регуляції розвитку та функціонування жіночої репродуктивної системи, зокрема молочної залози, яєчників та матки, а також необхідні для процесу овуляції. Концентрація рецепторів ER та PgR всередині клітини впливає на регуляцію взаємодії між паренхімою та стромою в молочній залозі. Зазвичай, в епітеліальних клітинах молочної залози спостерігається низький рівень експресії рецепторів естрогену та прогестерону (7-30% клітин), тоді як під час утворення пухлини спостерігається значне збільшення вираженості обох маркерів [12].

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		16

Якщо говорити щодо другорядних маркерів, то СЕА — карциноембріональний антиген, який за біохімічною природою є глікопротеїдом, його також визначають з метою діагностики. Його надмірну експресію пов'язують з утворенням метастаз багатьох видів пухлин, включаючи колоректальний, шлунковий, підшлунковий, легеневий та грудний типи раку. З іншого боку, СЕА часто продукується і в здоровому організмі в невеликих дозах. Більше того, підвищені рівні цього глікопротеїду можуть бути пов'язані з курінням, а тому іноді вказують на гіпотетичний ризик захворювання у курців, а не його фактичну наявність [11, 13].

MUC-1 — ще один глікопротеїд високоекспресований злоякісними пухлинами. Він є достатньо імуногенним для спричинення відповіді організму, однак мобілізується при цьому тільки гуморальний імунітет без виникнення клітинної відповіді. Для того, щоб її спричинити, MUC-1 може піддаватися штучному глікозилуванню. Однак, антитіла, вироблені у відповідь на модифіковані гліколізовані пептиди відрізняються від тих, що були б вироблені у відповідь на антигени *in situ*, тому як при клінічному, так і при діагностичному застосуванні, важко передбачити ефективність взаємодії такого антитіло-антигенового апарату [11].

hTERT — людська теломераза реверсивна транскриптаза, яка була виявлена у великій кількості у 85% всіх видів раку. Даний пептид та вакцини на основі мембранних білків сімейства CD - компонента системи вродженого імунітету, було використано для введення в організм пацієток з раком грудей та пацієнтів з раком простати. В результаті, більша частина пацієнтів мала імунну відповідь організму на антиген — утворення hTERT-специфічних Т-лімфоцитів. Слід зауважити, що навряд чи вибірка в даному дослідженні може вважатися репрезентативною, а тому і результати не варто розглядати як абсолютно достовірні [11].

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		17

2 Моноклональні антитіла

2.1 Структура та функції

Моноклональні антитіла специфічні до антигенів раку молочної залози переважно є імуноглобулінами IgG, які, в свою чергу, є мономерами. Антитіло складається з чотирьох глікопротеїдових ланцюгів: двох ідентичних важких ланцюгів і двох ідентичних легких ланцюгів. Важкі ланцюги мають високу молекулярну масу. Легкі ланцюги можуть бути типу каппа або лямбда і мають меншу молекулярну масу, ніж важкі ланцюги. Чотири глікопротеїдові ланцюги з'єднані між собою за допомогою дисульфідних (S-S) зв'язків та нековалентних зв'язків. Як легкі, так і важкі ланцюги мають варіабельну та сталу частини. Варіабельні частини антитіла складаються з амінокислотних послідовностей, які забезпечують специфічність антитіл. Варіабельні частини включають в себе верхній кінець "Y" молекули антитіла. Константні частини антитіла знаходяться в нижній частині "Y" молекули. Ці області мають меншу різноманітність між різними антитілами і визначають клас антитіла та його властивості [14].

На кінцях Y-подібної структури імуноглобуліну розташовано Fab фрагменти (домени), які містять антиген-зв'язуючу частину та відповідають за зв'язування епітопу антигену. В основі Y-подібної структури також розташовується частина Fc, яка забезпечує направлення біологічної активності антитіла. Цей фрагмент не має здатності до прямого зв'язування антигену, однак може взаємодіяти з рецепторами на поверхні клітин імунної системи (нейтрофіли, фагоцити, НК-клітини), що власне і забезпечує імунну відповідь та подальшу нейтралізацію чужерідних агентів [14,15].

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		18

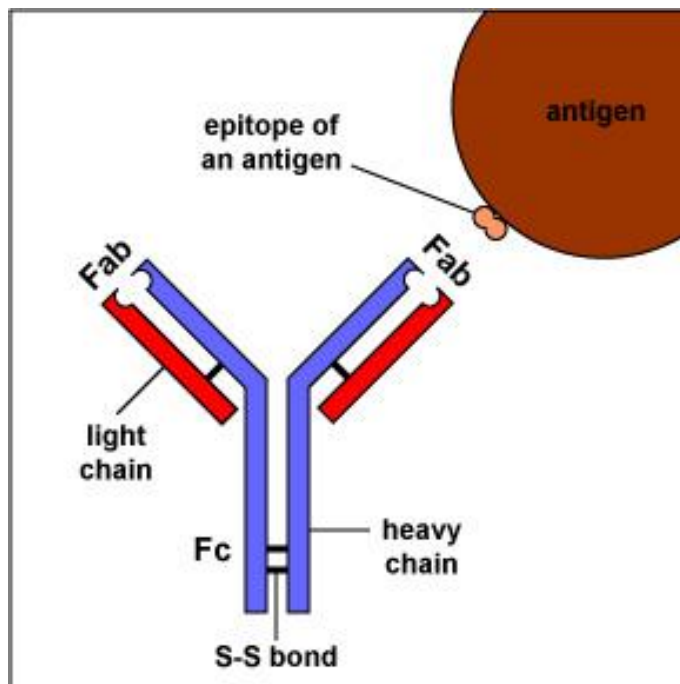


Рисунок 2. Структура антигена [14]

Додаткові S-S-зв'язки з'єднують окремі глікопротеїдові ланцюги у різних кулястих доменах. Область, в якій верхня частина "Y" приєднується до нижньої, називається шарніром. Цей шарнір є гнучким, щоб антитіло могло зв'язуватися з епітопами на антигені, розташованими на різних відстанях один від одного.

Антитіла мають кілька функцій, включаючи:

1. Сприяння очищенню організму від інфекційних агентів шляхом прив'язування до них та сприяння їх знищенню.
2. Активація комплементарної системи, яка допомагає у знищенні бактерій та інших мікроорганізмів.
3. Активація клітин імунної системи, таких як нейтрофіли та макрофаги, для боротьби з інфекційними агентами.
4. Нейтралізація токсинів та інших шкідливих речовин у організмі.
5. Регулювання власної імунної відповідності шляхом розподілу на класи (IgG, IgM, IgA тощо) та активації рецепторних систем на поверхні клітин [16].

2.2 Методи отримання

Першим та основним на даний момент методом отримання моноклональних антитіл є гібридомна технологія. Цей метод полягає в злитті двох клітин — мієломної клітини та В-лімфоцита тваринної селезінки. В-лімфоцити отримуються шляхом підшкірної чи внутрішньовенної імунізації тварин (переважно мишей) антигенами, специфічні антитіла проти яких очікується отримати в результаті. Від дочірніх клітин гібридома отримує здатність до необмеженої проліферації та продукції специфічних антитіл. Клонування та розмноження клітин-продуцентів може відбуватися декількома основними шляхами: в асцитній рідині, в культурі клітин, в ферментері [17].

Перший метод з асцитною рідиною передбачає повторне використання тварин. Створити умови, в яких тварини не будуть страждати в процесі продукції подібним методом, досить важко, а тому поступово наукова спільнота відмовляється від цього способу зважаючи на біоетичні стандарти сучасного світу.

Отримання моноклональних антитіл в культурі клітин є альтернативою для асцитного методу, оскільки не використовує тварин. Загалом моноклональні антитіла, отримані таким шляхом мають високу чистоту а умови контролю процесу біосинтезу антитіл є більш сприятливими. В той же час, шлях продукції з асцити є більш вигідним в економічному плані, оскільки вихід кінцевої продукції вище на 2-3 порядки порівняно з культурою клітин.

Поєднує переваги обох методів третій — отримання моноклональних антитіл в суспензійних культурах в ферментері. При великих масштабах виробництва використовують біореактори з повністю контрольованими умовами температури, CO₂, вологості, провітрювання, аспірацією стерильним повітрям, тощо. Часто використовуються спеціальні безсироваткові середовища, які включають всі необхідні компоненти:

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		20

амінокислоти, вітаміни, ліпіди, глюкозу, неорганічні солі та мікроелементи тощо. Зазначені особливості методу допомагають не тільки зменшити використання тварин в лабораторній практиці та отримувати достатню масу продукту, але і забезпечити дотримання всіх біобезпечкових та GMP стандартів. Повна контрольованість процесу в даному випадку також передбачає уникнення багатьох можливих ризиків.

Технологія отримання рекомбінантних моноклональних антитіл передбачає використання фагових чи дріжджових дисплеїв або дисплеїв клітинних ліній ссавців. Перший крок полягає у створенні бібліотеки антитіл, яка включає велику кількість фагів, кожен з яких містить різні гени антитіл. Процес починається з клонування геномів важких (VH) і легких (VL) ланцюгів антитіл у бактеріофаг. Потім ці модифіковані фаги використовуються для інфікування бактерій *Escherichia coli*. Внаслідок цього, в бактеріях відбувається експресія та відображення великої кількості комбінованих фрагментів важких і легких ланцюгів антитіл (тобто антитіл) [18].

Кожен фаг містить лише одну конкретну комбінацію VH і VL, тому коли всі ці модифіковані фаги використовуються разом, отримується повний набір антитіл або фрагментів антитіл. Цей набір антитіл, що представлений на поверхні бактеріофагів, утворює бібліотеку антитіл, яка містить різноманітні варіанти антитіл з різними властивостями та спроможностями взаємодіяти з мішеневими молекулами [18].

Цей процес дозволяє широкому спектру антитіл бути представленим у бібліотеці, що дозволяє вибрати ті антитіла, які мають найбільшу афінність (спроможність взаємодіяти з мішеневою молекулою) та стабільність.

У наступному кроці антиген, який є об'єктом інтересу, фіксується на поверхні твердого матеріалу, наприклад, на пластинці або мікрочіпі. Потім на цей іммобілізований антиген наноситься бібліотека антитіл, яка містить різноманітні варіанти антитіл з бібліотеки фагів [19].

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		21

У таких умовах під час процедури промивання неспецифічні фаги, які не мають афінності до іммобілізованого антигену, видаляються, тоді як специфічні фаги, які залишаються прив'язаними до іммобілізованого антигену, залишаються на поверхні. Це дозволяє виділити колекцію антитіл, які виявляють високу реактивність до цільового антигену.

Вибрані фаги, що мають специфічну взаємодію з антигеном, можуть бути повторно розмножені в бактеріях *E. coli*. Після цього можуть бути застосовані додаткові цикли відбору, що дозволяють подальше збагачення специфічних антитіл в бібліотеці. Цей процес дозволяє вибрати найкращі антитіла з високою афінністю до цільового антигену та стабільністю [19].

У кінцевому етапі обраних клонів, які взаємодіють специфічно з цільовим антигеном, розмножують та перевіряють на зв'язування з цільовим антигеном за допомогою ELISA — методу імуноферментного аналізу. Цей тест дозволяє виявити, які клони антитіл показують високу афінність до цільового антигену [19].

Далі, обрані клони можуть бути піддані додатковій перевірці шляхом сортування клітин, аналізу їх ДНК послідовності або імуноблотингу. Сортування клітин дозволяє виділити клони, які мають найбільшу афінність до цільового антигену. Аналіз ДНК послідовності дозволяє підтвердити, що отримані клони містять правильні генетичні послідовності антитіл. Імуноблотинг — це метод, який дозволяє перевірити взаємодію клонів з цільовим антигеном за допомогою спеціальних антитіл.

В кінці цього процесу, коли обрані клони пройшли всі перевірки та виявилися специфічними та високоефективними, ДНК-послідовність цих клонів може бути використана для виробництва рекомбінантних антитіл. Це означає, що генетична інформація, яка кодує специфічні антитіла, може бути використана для створення штучних копій цих антитіл у контрольованих умовах, наприклад, за допомогою клітинних ліній або систем експресії [19].

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		22

2.3 Застосування в діагностиці раку молочної залози

Гібридомна технологія отримання моноклональних антитіл є, звичайно, недосконалою і не може використовуватися в терапевтичних цілях через декілька причин, включно, з доволі високою імуногенністю для людського організму, низьким часом життя та швидким напіврозпадом деяких антитіл, а також міжвидовою відмінністю Fc доменів антитіл, через що відбувається зв'язування антитіла з антигеном, однак не відбувається формування подальшої імунної реакції організму [18].

Моноклональні антитіла, отримані за допомогою гібридомної технології при діагностиці раку молочної залози можуть використовуватися після біопсії для імуногістохімічного аналізу. ІГХ використовується для визначення наявності та кількості певних білків у зразках тканин. Це дозволяє встановити наявність рецепторів статевих гормонів, маркерів проліферації та факторів, що беруть участь у ангиогенезі та апоптозі. Досліджувані зразки тканин обстежують за допомогою мікроскопа. Таким чином може бути виявлено локалізацію пухлинних клітин в зрізі тканин, а також підраховано кількість та оцінено морфологію ракових клітин. Часто такий аналіз допомагає визначити підтип раку залежно від вираженості біомаркеру HER2, на основі чого робиться прогноз тазначається відповідне лікування [9].

ІФА з цитометрією використовується для аналізу фізичних та хімічних характеристик клітин і частинок у рідкому зразку. У дослідженнях раку метод використовується для ідентифікації та кількісного визначення різних типів клітин, включаючи ракові клітини, на основі їх розміру, форми та інших властивостей в зразках плазми крові [20]. Ця інформація може допомогти дослідникам краще зрозуміти біологію раку та розробляти нові діагностичні та лікувальні стратегії. Метод проточної цитометрії у поєднанні з імуно-ферментним аналізом використовує моноклональні антитіла для ідентифікації та кількісного визначення різних типів клітин, включаючи ракові. Для застосування в проточній цитометрії моноклональні антитіла, як

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		23

це і робиться при звичайному ІФА, маркуються флуоресцентними речовинами, так само як в імуногістохімічному аналізі. Подальші вимірювання аналогічно засновані на реакції зв'язування антитіла з антигеном. Перед безпосередньо цитометрією відбувається промивання зразків буферним чи фізіологічним розчином для видалення незв'язаних речовин. Завдяки високій афінності комплексу антиген-антитіло, після промивання залишаються тільки зв'язані речовини. Далі цитометр реєструє кількість випромінюваного в зразках світла, що генерують марковані антитіла. Таким чином встановлюється кількість конкретних антигенів в зразках за допомогою моноклональних антитіл [20].

Так, наприклад, можна визначати вираженість HER2 в зразках плазми крові пацієнток [21].

За тим самим принципом може бути проведено мікроскопічний імуофлуоресцентний аналіз з різницею лише в кінцевому способі підрахунку клітин (електронна мікроскопія).

Загалом, обидва методи подібні та характеризуються достатньо високою ефективністю, однак ІГХ має значні переваги порівняно зі звичайним ІФА, оскільки зрізи тканин є набагато інформативнішими. Так, за їх допомогою можна визначити локалізацію та отримати інформацію про морфологію ракових клітин, що дозволяє отримати додаткові дані про ступінь диференціації клітини та взаємозв'язки антигенів зі структурами тканин.

Антигенні білки можуть також бути визначені в зразках за допомогою імуоблотингу. Моноклональні антитіла використовуються для блотингу з метою підвищення специфічності та чутливості детекції білків. Вони розпізнають лише один епітоп, що дозволяє ідентифікувати конкретну область антигену. Імуоблотинг може бути проведений з використанням різних систем детекції, таких як мічення радіоактивними ізотопами, коллоїдними металами та ферментами з колориметричним або хемолюмінесцентним субстратом [22].

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		24

3 Гібридомні технології для отримання моноклональних антитіл

Отримання моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології передбачає культивування *in vitro* чи *in vivo*, або ж комбінації двох методів. Для виробництва моноклональних антитіл необхідно спочатку згенерувати гібридому-продуцента. Кроки для отримання гібридом наведені нижче (рисунок 3).

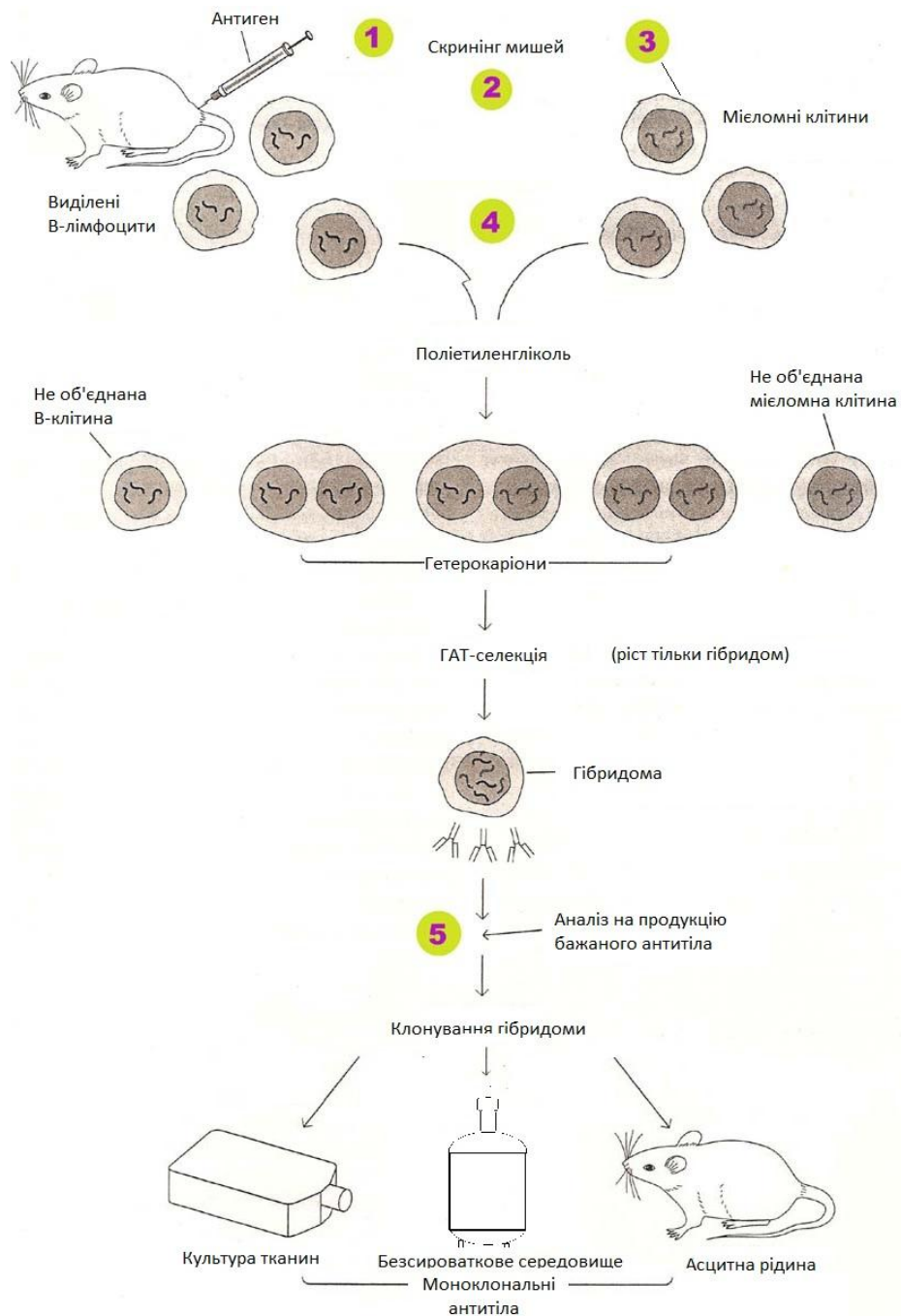


Рисунок 3. Схематичне зображення стадій виробництва МАТ за допомогою гібридомної технології [40]

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата

Для виробництва гібридом використовують тварин, зазвичай лабораторних мишей лінії Balb/c. Вихідним продуктом такого виробництва повинна стати клітинна лінія, що здатна протягом тривалого часу виробляти специфічний білок-антитіло. Пухлина з такої “безсмертної” клітинної лінії і називається гібридомою. На жаль, поки не існує ефективних методів отримання гібридом без використання тварин [23].

Існують *in vitro* техніки, що дозволяють внутрішньоклітинне виробництво фрагментів антиген-зв’язуючих антитіл, проте вони є експериментальними та мають невизначену ефективність. До появи гібридної технології дослідники могли отримувати лише поліклональні сироваткові антитіла, що вимагало великої кількості імунізованих тварин і не забезпечувало “безсмертя” клітин, що продукують антитіла, тому для отримання більшої кількості антитіл потрібно було повторно використовувати тварин.

Розробка технології гібридом стала можливістю зменшити кількість тварин, необхідних для отримання певного типу антитіл, проте зі зниженням добробуту тварин, коли застосовується метод асцити [23].

Отже, виробництво гібридом включає в себе наступні стадії:

1. Вибір мишей-донорів та їх наступна імунізація антигеном

Мишей імунізують антигеном, який готують для введення, змішуючи його з допоміжними речовинами Фрейнда або іншими. Іноді як імуногени використовують цілі клітини, цілі мембрани та мікроорганізми [23].

Майже в усіх лабораторіях для отримання специфічних антитіл використовують мишей. Загалом, імунізація мишей відбувається протягом 2-3 тижнів, залежно від протоколів в різних лабораторіях чи дослідницьких центрах. Якщо в сироватці досягається достатній титр антитіл, імунізовані тварини піддаються евтаназії, а їх селезінку вилучають як джерело В-лімфоцитів для подальшого злиття з мієломними клітинами [23].

2. Скринінг мишей

Після кількох тижнів імунізації отримують зразки крові від мишей для визначення рівня антитіл у сироватці. Рівень сироваткових антитіл

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		26

визначається різними методами, такими як імуно-ферментний аналіз (ІФА) та проточна цитометрія. В тому випадку якщо рівень антитіл достатньо високий, дозволено проводити фузію клітин. В протилежному випадку, вводиться додаткова бустерна доза антигену без ад'юванта шляхом ін'єкції інтраперитонеально, підшкірно або інтравенозно (через хвостову вену) за 3 дні до злиття, але, як мінімум, через 2 тижні після попередньої імунізації [23].

Після цього роблять евтаназію, а селезінки тварин видаляються для виробництва гібридомних клітин *in vitro*.

3. Підготовка мієломних клітин

Об'єднання клітин селезінки, які продукують антитіла, з клітинами, отриманими з безсмертного пухлинного утворення лімфоцитів (мієломи), призводить до створення гібридоми, яка здатна до необмеженої проліферації.

Мієломні клітини культивують з 8-азагуаніном, щоб забезпечити їх чутливість до гіпоксантин-аміноптерин-тимідин (ГАТ) — селективного середовища, яке використовується після злиття клітин. За тиждень до злиття клітин мієломні клітини зростають в 8-азагуаніні. Клітини повинні мати високу життєздатність та швидкий ріст. ГАТ-середовище дозволяє вижити в культурі тільки об'єднаним клітинам [23].

4. Фузія мієломних клітин з імунними клітинами селезінки

Поодинокі клітини селезінки імунізованої миші об'єднують з попередньо підготовленими мієломними клітинами. Об'єднання здійснюється шляхом спільної центрифугації відібраних клітин селезінки та мієломних клітин в поліетиленгліколі (ПЕГ), речовині, що сприяє злиттю мембран клітин. Як зазначено в попередній стадії, лише злиті клітини будуть рости в спеціальному середовищі відбору. Клітини потім розподіляються на 96-луночні планшети, що містять фідерні клітини, отримані з солевого перитонеального промивання мишей. Вважається, що фідерні клітини забезпечують фактори росту, які сприяють зростанню гібридомних клітин. Також використовуються комерційні препарати, що підтримують ріст клітин

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		27

культури та містять фактори росту, які можна використовувати замість фідерних клітин, отриманих з мишей. Іноді в якості фідерних клітин використовують макрофаги, отримані з кісткового мозку миші [23].

5. Одержання культуральної рідини або асцити, що містить антитіла, та виділення антитіл

Після фузії та культивуванні в ГАТ залишаються гібридами, які перевіряються на предмет синтезу специфічних антитіл. Таким чином обирається одна найбільш вдала та ефективна гібридома, з якої необхідно виростити життєздатну популяцію гібридом-продуцентів [23]. Зазвичай одержання масової культури проводиться наступними методами [17]:

1. У культурі тканин.
2. В організмі мишей або щурів (в асцитах).
3. У ферментерах.

Найкращим серед наведених способів є перший, оскільки при такому методі виділені імуноглобуліни мають високу чистоту, а умови контролю процесу біосинтезу антитіл є більш сприятливими.

В той же час, титр моноклональних антитіл в асцитній рідині перевищує ту кількість, що міститься в культуральному середовищі, на 2-3 порядки [17].

Асцитна пухлина — це злоякісна пухлина черевної порожнини мишей у вигляді клітин, які знаходяться у зависі внутрішньочеревної рідини. При застосуванні подібної технології отримання моноклональних антитіл доводиться повторно використовувати тварин, що протирічить одній із сучасних цілей наукового товариства. Тим паче, що забезпечити добробут тваринам в подібних умовах — досить важка задача.

Таким чином, при великих масштабах виробництва моноклональних антитіл застосовується третій метод — вирощування гібридом у суспензійних культурах (у ферментерах).

4 Виробництво моноклональних антитіл в Україні та світі

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		28

На світовому ринку галузь виробництва моноклональних антитіл широко представлена компаніями-гігантами, які окрім моноклональних тіл виробляють безліч інших препаратів. Серед таких компаній - світові лідери фармацевтики: Pfizer, Johnson & Johnson, Roche, Merck & Co., AbbVie, Novartis, Bristol Myers Squibb, AstraZeneca та інші. Фармацевтичний ринок майже порівну поділений між європейськими та американськими компаніями [26].

За компаніями Johnson & Johnson, Molecular Partners та Bristol-Myers Squibb налічується найбільша кількість патентів, так чи інакше пов'язаних з виробництвом моноклональних антитіл ракових антигенів, в період з 2010 по 2021. Прикладом подібного препарату є DARZALEX (Даратумумаб), що використовується з терапевтичною метою для лікування раку кісткового мозку [27]. Моноклональні антитіла Даратумумабу спрямовані проти антигену CD38, так само як і іншого препарату Sarclisa (Ізатуксімаб) виробництва Sanofi [28,29].

Слід зауважити, що вищезгадані препарати не використовуються в діагностичних цілях, оскільки моноклональні антитіла, що в них застосовують, є гуманізованими або химерними. Реагенти, використовувані для імуногістохімічного аналізу, виробляє багато компаній: Avantor, NeoBiotecnologies, ThermoFisher Scientific та інші. І хоча згадані виробники випускають специфічні до рецепторів ER та PgR моноклональні антитіла, вони не призначені для діагностики, а застосовуються лише з метою досліджень [30-32].

Компанії GenomeMe, BioGenex та Roche виготовляють специфічні до прогестеронових та естрогенових рецепторів моноклональні антитіла, які застосовуються для *in vitro* діагностики, в тому числі й імуногістохімічного аналізу [33,34]. Важко сказати, яку долю на світовому ринку займає конкретна продукція вказаних компаній, однак Roche, на відміну від перших двох, менше спеціалізується на виробництві продуктів для діагностики раку молочної залози.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		29

В Україні також підтверджена присутність декількох компаній, що так чи інакше займаються діяльністю пов'язаною з виробництвом моноклональних антитіл. Найбільш відомими є Діапроф-мед, ВІПРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ, Хема, БІОФАРМА перші три з яких локалізуються в Києві, а четверта — в Білій Церкві. Жодна з цих компаній не займається виготовленням моноклональних антитіл специфічних до ER/PgR білків [35-38].

Висновки до розділу 1

За даними Міжнародного агентства з дослідження раку, у 2020 році виявлено приблизно 2,3 мільйона нових випадків раку молочної залози. Цей тип раку є найпоширенішим серед жінок і становить 24,5% від усіх випадків ракових захворювань. Україна не виняток - тут зареєстровано 18 тисяч інцидентів, 39% з яких закінчились смертю. Фактори ризику можуть мати як вроджену, так і набуту природу. Серед найбільш поширених факторів ризику: раннє настання менархе, пізні перші пологи або їх відсутність, вік понад 50 років, атипова гіперплазія тканини молочної залози, наявність раку молочної залози у кровних родичок, мутації BRCA-1, BRCA-2, рак або доброякісні пухлини молочної залози в анамнезі, куріння та надмірне вживання алкоголю, вживання естрогену з метою контрацепції чи лікування, високий вміст тваринних жирів та червоного м'яса та низький вміст фруктів та овочів в дієті.

При діагностиці розрізняють три підтипи раку молочної залози, в залежності від вираженості білків в зразках тканин: ER/PgR-позитивний, HER2-позитивний, Triple-негативний. Перший підтип є найбільш розповсюдженим, його інцидентність складає 80% від всіх випадків.

Сучасні методи діагностики зазвичай використовуються в комплексі один з одним. При ретельних обстеженнях рекомендується використовувати пальпативний огляд пацієток, візуалізаційні способи - мамографію, МРТ, УЗД, а також відбір зразків тканин - біопсію.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		30

В дослідженнях, які робляться на основі зразків, відібраних на біопсії проводиться ідентифікації антигенів раку молочної залози. Такі антигени в більшості своїй представлені білками, серед яких: HER2, Ki-67, ER, PgR, CEA, MUC-1, hTERT та багато інших.

Моноклональні антитіла специфічні до представлених антигенів раку молочної залози переважно є імуноглобулінами G. Їх структура представлена двома легкими та двома важкими ланцюгами, які з'єднані між собою дисульфідними зв'язками Y-подібним шляхом. На кожному з легких та важких ланцюгів розрізняють Fab та Fc домени. Перший відповідає за розпізнавання та зв'язування антитіла з антигеном та є варіабельним, оскільки визначає специфічність конкретного антитіла. Домен Fc є сталим та визначає характеристики антитіл конкретного виду, а також відповідає за забезпечення імунної відповіді на антиген, взаємодіючи з рецепторами на поверхні клітин імунної системи. Основними функціями моноклональних антитіл, як і будь-яких інших, є очищення організму від чужерідних агентів шляхом зв'язування з ними та сприяння їх знищенню.

Основним методом отримання моноклональних антитіл є гібридомна технологія. Отримання кінцевого продукту при застосуванні даної технології можливо в трьох основних системах: асцита, культура клітин та ферментер. Остання система вирізняється вигідним поєднанням переваг перших двох, а саме - високий вихід продукту та відсутність необхідності використання тварин. Основні, кроки які включає гібридомна технологія отримання моноклональних антитіл - це: імунізація тварин, культивування *in vivo*, евтаназія та виділення В-лімфоцитів з селезінки, фузія клітин мієломної лінії з В-лімфоцитами, ГАТ-селекція, культивування гібридомних клітин, клонування, виділення та очищення моноклональних антитіл.

Якщо говорити про діагностичне використання моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози, то найчастіше вони використовуються в методах імуногістохімічного та імуно-ферментного аналізів, а також імуноблотингу. ІГХ має переваги порівняно з іншими

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		31

методами, оскільки при дослідженні використовуються зрізи тканин, а не плазма крові. Такий аналіз допомагає не тільки ідентифікувати та визначити кількість певних антигенів, але і дослідити їх морфологію та локалізацію в тканині. Імуногістохімічний аналіз часто направлений на детермінацію HER2, ER та PgR-рецепторних білків, що забезпечує визначення підтипу раку молочної залози, подальший прогноз та назначення відповідного лікування. При цьому враховується ризик стосовно результатів, базованих лише на ІГХ, а тому моноклональні антитіла для діагностики використовуються лише як один із інструментів, що застосовуються паралельно з іншими, а не окремо від них [39].

Серед фармацевтичних компаній, що займаються виробництвом моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози для тестів *in vitro* - GenomeMe, BioGenex та Roche. Наразі невідомо, який відсоток ринку покриває їх продукція. В Україні три компанії — Діапроф-мед, ВІТРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ, БІОФАРМА — займаються випуском продукції, що включає і моноклональні антитіла, однак жодна з цих компаній не виробляє такі, що були б специфічними до антигенів будь-яких онкологічних захворювань, включно з раком молочної залози.

Таким чином, для подальшої роботи вважається доцільним обрати проєктування виробництва моноклональних антитіл специфічних до рецепторів ER та PgR за допомогою гібридної технології для діагностики раку молочної залози за допомогою імуногістохімічного аналізу. Результатом проєктування повинно стати виробництво, здатне забезпечити 30% населення України, що має потребу в імуногістохімічному аналізі при діагностиці раку молочної залози.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		32

РОЗДІЛ 2. ОБҐРУНТУВАННЯ ОБРАНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА

Розроблену технологічну схему виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози наведено у графічній частині даної роботи, креслення №1. Технологічна схема описує отримання моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології. Отримані моноклональні антитіла планується використовувати для діагностики раку молочної залози за технологією, яка, в свою чергу, є набагато чуттєвішою, ніж будь-які інші тести, та допомагає визначати наявність пухлин на ранніх стадіях захворювання. Гібридомна технологія отримання моноклональних антитіл заснована на злитті двох клітин — В-лімфоцита та мієломної клітини. В-лімфоцит, вилучений із селезінки миші після її імунізації антигеном раку молочної залози, надає новоутвореній дочірній клітині можливість синтезу специфічних антитіл, в той час як мієломна клітина, отримана з готової замороженої клітинної лінії, передає гібридомі можливість необмеженої проліферації. Утворена після фузії дочірня клітина-продуцент синтезує моноклональні антитіла. Культура гібридом після культивування піддається імуно-ферментному аналізу, а також дослідженню за допомогою електронної мікроскопії, в результаті чого визначаються найбільш продуктивні гібридоми, які клонуються. Потім, після повторних скринінгів ІФА, збирається та очищається культуральна рідина з синтезованими моноклональними антитілами. Моноклональні антитіла фасуються в флакони та на них наноситься відповідне маркування. На останній стадії виробництва відбувається утилізація відходів.

Основний технологічний процес складається з двох частин - створення продуцента та власне отримання моноклональних антитіл. На технологічній

					БФ2107.23.40.001ПЗ		
<i>Вим</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробила</i>	<i>Коблевська</i>				<i>Літ.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Бесараб</i>					33	118
<i>Реценз.</i>					<i>РОЗДІЛ 2</i> <i>КПІ ім. Ігоря Сікорського</i> <i>ФБМІ БФ-21мп</i>		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затвердив</i>							

схемі ці два процеси розділено умовною позначкою “Кінець технологічного процесу I/Початок технологічного процесу II”. Технологічному процесу I відповідають такі стадії виробництва: ДР6 Пре-процесінг, ТП7 Імунізація мишей, ТП8 Фузія міеломних клітин та В-лімфоцитів, ТП9 Селекція гібридом, ТП10 Культивування гібридомних клітин, ТП11 Скринінг культури отриманих клітин, ТП12 Культивування гібридом, що продукують необхідні моноклональні антитіла. До Технологічного процесу II належать ТП13 Виділення та очищення моноклональних антитіл та ТП14 Пост-процесінг.

Стадії виробництва:

ДР 1 Санітарна підготовка виробництва

ДР1.1 Підготовка дезинфікуючих та миючих розчинів

ДР1.1.1 Підготовка дезинфікуючих розчинів

Закупівля розчинів Вінсепт та АХД-2000 для первинної та щоденної обробки робочих поверхонь приміщення в кількості 5 літрів кожного.

Перелік контрольних точок:

Кт1.1.1.1 Кількість дезинфікуючих засобів.

Кт1.1.1.2 Відповідність дезинфікуючих засобів

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та хімічний.

ДР1.1.2 Підготовка миючих розчинів

Закупівля миючого лужного безпінного засобу SUPRA Б/П PRIMATERRA для миття інших поверхонь приміщення в кількості 13 літрів. Закупівля компонентів та приготування 2% мильно-содового розчину.

Перелік контрольних точок:

Кт1.1.2.1 Кількість миючих засобів

Кт1.1.2.2 Відповідність миючих засобів

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		34

ДР1.2 Підготовка персоналу

Відповідно до статті 17 ЗУ «Про охорону праці» - працівники мають проходити попередній (під час прийняття на роботу) і періодичні медичні огляди. Працівники, які не пройшли медичне обстеження не допускаються до роботи.

Усі працівники повинні мати належну кваліфікацію та підготовку, а також, згідно із принципами GMP, постійно підвищувати кваліфікацію та якість роботи [46]. Навчання працівників може мати різний обсяг і характер залежно від початкового рівня підготовки, посади, обов'язків та завдань. За різновидом заняття поділяються:

Вступні заняття - для працівників, які тільки розпочинають роботу. Мета - ознайомлення з усіма вимогами, питаннями охорони праці забезпечення належної якості [46].

Посадові заняття - для ознайомлення співробітників із засадами GMP, що стосуються їх посади. Мають відбуватися регулярно, один раз на квартал, а у разі використання нового обладнання чи методу роботи - щоразу [46].

Спеціальні заняття - для працівників, які виконують певну вузькоспеціалізовану роботу. Наприкінці проводиться індивідуальне оцінювання знань кожного з працівників. Оцінка включає аналіз теоретичних знань та практичних навичок. До роботи допускаються тільки ті працівники, що склали тестування не менше ніж на 95 балів зі 100 можливих [46].

Перелік контрольних точок:

Кт1.2.1 Професійні знання персоналу

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

ДР2 Підготовка виробничих приміщень та комунікацій

Цей етап включає перевірку справності техніки, меблів та допоміжних конструкцій виробничих приміщень.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		35

ДР2.1 Підготовка посуду та інструментів

ДР2.1.1 Мийка та дезінфекція посуду та інструментів

Спочатку посуд та інструменти ретельно очищають від залишків попередньої роботи, включаючи залишки клітин та білкових матеріалів.

Далі вони проходять мийку в розчині Вінсепт, який забезпечує чистоту. Після мийки посуд та інструменти дезінфікують в розчині АХД-2000.

Після дезінфекції посуд та інструменти повинні бути ретельно промиті водою для видалення залишків розчинів та забезпечення чистоти.

ДР2.1.2 Стерилізація посуду та інструментів

Стерилізація медичних виробів — це процес знищення на виробках медичного призначення всіх видів мікроорганізмів на будь-якій стадії розвитку [41].

На сьогодні порядок проведення усіх етапів стерилізації медичних виробів врегульовано Державними санітарними нормами та правилами «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я», що затверджені наказом МОЗ від 11.08.2014 № 552 [41].

Обладнання та механізми, залучені до процесу знезараження, необхідно розмістити таким чином, щоб усе чітко відповідало технологічному процесу та звело до мінімуму ймовірність помилки під час стерилізації. Окрім того, знезараження за правилами дасть змогу уникнути перехресної контамінації інструментарію [41].

Вироби зі скла, порцеляну, металу, допоміжні матеріали (фільтрувальний папір, пергамент тощо) стерилізують при 120 °С протягом 45 хв при тиску 0,11 МПа. Ефективність стерилізації визначається за допомогою біологічних індикаторів з *Bacillus subtilis*. Повна відсутність мікроорганізмів та їх спор після стерилізації свідчить про її успіх.

Перелік контрольних точок:

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		36

Кт2.1.2.1 Температура стерилізації

Кт2.1.2.2 Тиск стерилізації

Кт2.1.2.3 Час стерилізації

Кт2.1.2.4 Ефективність стерилізації

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ДР2.2 Підготовка обладнання

ДР2.2.1 Мийка та дезінфекція обладнання

На початку стадії обладнання ретельно очищається від залишків попередніх етапів виробництва та бруду. Після цього обладнання занурюється в розчин АХД-2000.

ДР2.2.2 Стерилізація обладнання

Ємності, які використовують відповідно до видів стерилізації, повинні відповідати вимогам наведеним в табл.1 нижче. Режим стерилізації наступний: $t = 132^{\circ}\text{C}$, $t = 20 \text{ хв}$, $p = 0,2 \text{ МПа}$. Ефективність стерилізації визначається за допомогою біологічних індикаторів з *Bacillus subtilis*. Повна відсутність мікроорганізмів та їх спор після стерилізації свідчить про її успіх.

Таблиця 1

Вимоги до ємностей для стерилізації обладнання [41]

Обладнання	Вимоги
Контейнери для транспортування медичних інструментів	Справне, очищене, марковане
Кришки ємностей, залучених в технологічному процесі знезараження інструментарію	Щільно прилягає
Етикетки на ємностях, залучених в технологічному процесі знезараження інструментарію	Надійно приклеєні до кожної ємності. Містять інформацію про назву дезінфікуючого засобу, концентрацію, дату виготовлення, кінцевий термін придатності деззасобу.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		37

Етикетки на контейнерах та стерилізаційних коробках (біксах) з медичним інструментарієм	Надійно прикріплені до поверхні. Містять відомості про структурний підрозділ, якому належить контейнер, його вміст, дату стерилізації.
---	--

Перелік контрольних точок:

Кт2.2.2.1 Температура стерилізації

Кт2.2.2.2 Час стерилізації

Кт2.2.2.3 Тиск стерилізації

Кт2.2.2.4 Ефективність стерилізації

Кт2.2.2.5 Справність обладнання

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: мікробіологічний та технологічний.

ДР2.3 Прибирання приміщень

Пропонується наступний алгоритм профілактичного прибирання робочих приміщень:

1. Одягти спецодяг для прибирання (халат, шапочку, фартух, рукавички, капці).
2. Приготувати 2% мильно-содовий розчин (100.0 мила, 100.0 соди). Нанести миючу речовину на всі поверхні, що обробляються. Змити його водою.
3. Нанести робочий розчин дезінфектанту.
4. Змити чистою водою.
5. Збиральний інвентар піддати дезінфекції: ганчірку, ганчір'я замочити в дезрозчині в окремих ємностях, прополоскати, висушити.
6. Зняти використаний спец. одяг.
7. Провести гігієнічну антисептику рук.
8. Одягти чистий спецодяг.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		38

9. Увімкнути бактерицидну лампу на 30 хвилин, провітрити 15 хвилин.

Для контролю асептичності поверхонь використовуються чашки Петрі з агарозним трипто-соєвим середовищем зі *Staphylococcus aureus*, які виставляються на тестову робочу поверхню на 4 години. Після цього відбувається їх інкубація протягом 24 годин при температурі 36°C, а після оцінюється ріст мікроорганізмів методом електронної мікроскопії. Якщо число росту складає менше 1 колонії на 25см², поверхня вважається асептичною.

Перелік контрольних точок:

Кт2.3.1 Асептичність робочих поверхонь

Тип ризику даної Кт хімічний, мікробіологічний та технологічний.

ДР3 Підготовка повітря

ДР3.1 Забір повітря

Повітрозбірник повітря ззовні має розташовуватись на висоті не менше ніж 0,5 м від горизонтальної поверхні (криші чи землі), щоб запобігти засмічення листям чи снігом. В межах 8 м від забірника мають бути відсутні будь які потенційні джерела забрудненого повітря (сміттєзбірники, паркувальний майданчик, тощо). Решітки, що захищають повітрозабірники, повинні бути захищені від птахів і гризунів, відходи яких можуть порушити правильну роботу системи HVAC, сприяти росту мікробів і викликати захворювання людей. Вхідні камери повинні бути доступні для огляду та очищення. Певна ділянка впускної камери має бути похилою, щоб волога стікала назовні або в дренаж. Параметри повітря наступні: h = 20 м, t = 20 °C, W = 60-90%.

Перелік контрольних точок:

Кт3.1.1 Висота забору повітря

Кт3.1.2 Температура повітря

Кт3.1.3 Вологість повітря

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		39

ДР3.2 Попередня очистка повітря

Попередня очистка повітря має на меті вловлювання значної кількості механічних часток, пилу, волосся та пилку, попереднім фільтром з ефективністю очистки на рівні 10-20 %. Це дозволяє продовжити термін використання більш дорогих основних фільтрів та пошкоджень компресійного обладнання. Також, даний фільтр за рахунок використання активованого вугілля, фільтрує леткі органічні сполуки - гази та молекули запаху.

На дану стадію надходить повітря як з внутрішніх приміщень для повторного очищення і використання (рециркуляція) так і повітря ззовні, об'єм надходження якого контролюється автоматично за інформацією датчиків вуглекислого газу (контрольована вентиляція - demand controlled ventilation DCV) [42].

Параметри повітря наступні: $d = 5-10$ мкм, $E = 80\%$.

Перелік контрольних точок:

Кт3.2.1 Розмір часток у повітрі

Кт3.2.2 Ефективність очищення повітря

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

ДР3.3 Стабілізація термодинамічних показників повітря

На даному етапі основною метою є доведення повітря до оптимальної вологості та температури. Відповідно, повітря проходить через теплообмінник який залежно від необхідності або охолоджує, або нагріває його. Для стабілізації потоку повітря задіюється ресивер, що згладжує пульсації тиску при роботі компресійного обладнання. Зволоження повітря відбувається за допомогою форсунок, що розпилюють вологу.

Параметри повітря наступні: $t = 28^{\circ}\text{C}$, $W = 60\%$.

Перелік контрольних точок:

Кт3.3.1 Температура повітря

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		40

Кт3.3.2 Вологість повітря

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

ДР3.4 Стерилізація повітря головним фільтром

Стерилізація повітря відбувається у вискоефективному повітряному фільтрі HEPA (High Efficiency Particulate Air), який призначений для тонкої очистки, зі ступенем очистки понад 99 %. HEPA-фільтри вловлюють пилок, бруд, пил, бактерії (0,2-2,0 мкм), віруси (0,02-0,3 мкм), і субмікронний рідкий аерозоль (0,02-0,5 мкм). Також здатний вловлювати підлоговий пил, який містить бактерії, клостридії та бацили. При експлуатації фільтрів необхідне їх постійне обслуговування та вчасна стерилізація чи оновлення.

Кінцеві параметри повітря наступні: $E = 99,9\%$.

Перелік контрольних точок:

Кт3.4.1 Ефективність очищення повітря

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

ДР4 Підготовка води

ДР4.1 Дистиляція

Проводиться за допомогою лабораторного дистилятора. Загальне органічне забруднення (ТОС - загальний органічний вуглець) наприкінці дистиляції не повинно складати більше 0,5 ч/млн. Загальне неорганічне забруднення (TDS) - 0,05 ч/млн та менше.

Перелік контрольних точок:

Кт4.1.1 Загальне органічне забруднення

Кт4.1.2 Загальне неорганічне забруднення

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: мікробіологічний, технологічний.

ДР4.2 Ультрафільтрація

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		41

Проводиться за допомогою ультрафільтраційної капілярної мембрани Raifil UF 11. Забруднення бактеріями та іншими мікроорганізмами (TVC) повинно становити менше 10 КУО/мл.

Перелік контрольних точок:

Кт4.2.1 Забруднення бактеріями та іншими мікроорганізмами

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: мікробіологічний.

ДР5 Огляд та налаштування обладнання

ДР5.1 Налаштування інкубатора

ДР5.2 Налаштування центрифуги та хроматографа

ДР5.3 Налаштування інвертованого мікроскопу

Перелік контрольних точок:

Кт5.1 Справність обладнання

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

ДР6 Пре-процесінг

ДР6.1 Приготування поживних середовищ

Для подальшого культивування гібридомних клітин знадобляться наступні розчини:

- Поживне середовище А: RPMI 1640 з L-глутаміном +10% FBS +Пеніцилін (100 од/мл)/Стрептоміцин (100 мг/л).
- Поживне середовище А+: RPMI 1640 з L-глутаміном +10% FBS +Пеніцилін (100 од/мл)/Стрептоміцин (100 мг/л) +Ultroser G (1%).
- Поживне середовище В: RPMI 1640 з L-глутаміном + Пеніцилін (100 од/мл)/Стрептоміцин (100 мг/л) [43].

Перелік контрольних точок:

Кт6.1.1 Пропорції речовин в поживних середовищах

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		42

ДР6.2 Підготовка поживних середовищ

Забір з матеріалів складу наступних розчинів:

- ПЕГ (поліетиленгліколь).
- Поживні середовища А, А+, В.
- FBS.
- Ultrosor G.
- ГАТ (гіпоксантин-аміноптерин-тимідин).
- Безсироваткове поживне середовище Hybry-Max.

Стерилізація поживних розчинів 20 хвилин при температурі 120°C та тиску 0,11 МПа.

Перелік контрольних точок:

Кт6.2.2.1 Відповідність забраних матеріалів

Кт6.2.2.2 Температура стерилізації

Кт6.2.2.3 Тиск стерилізації

Кт6.2.2.4 Час стерилізації

Кт6.2.2.5 Ефективність стерилізації

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний, мікробіологічний.

ДР6.3 Підготовка антигенного розчину

Перенесення антигенів за допомогою стерильної піпетки до колби.

Внесення до колби 10 мл речовин, зазначених нижче:

Поживне середовище А:

RPMI 1640 з L-глутаміном +10% FBS +Пеніцилін (100 од/мл)/Стрептоміцин (100 мг/л)

Проведення центрифугування з такими параметрами: 300 g, 5 хв.

Перенесення відцентрифугованих клітин до іншої, маленької пробірки (25см²), що містить свіже Поживне середовище А (вміст середовища вище).

Помістити злегка привідкриту пробірку до інкубатору.

Перелік контрольних точок:

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		43

Кт6.3.1 Час центрифугування

Кт6.3.2 Швидкість центрифугування

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП7 Імунізація мишей

Імунізація мишей антигеном полягає у введенні антигену в організм миші з метою викликати імунну відповідь. Використовуються самки мишей штаму Balb/c у віці 6-8 тижнів [43]. Проводиться оцінка розміру та розвитку частин тіла миші. Розміри тіла, що відповідають вказаному віку наступні:

- Довжина тіла: близько 10-12 см.
- Вага тіла: близько 20-30 г.
- Довжина хвоста: близько 8-10 см.
- Довжина передніх і задніх лап: близько 2-3 см.

Миші повинні бути вирощені в спеціальних умовах та вільні від специфічних патогенів (SPF). Проводиться скринінг за допомогою ІФА на наступні патогени: хантавірус; лімфоцитарний хориоменінгіт; реовірус типу 3; мишачий респіровірус; вірус екстремелії; к-вірус; вірус ПЛДГ (підвищення лактатдегідрогенази); мишачий аденовірус; мишачий цитомегаловірус; вірус мишачого енцефаломієліту; вірус мишачого гепатиту; мишачий ротавірус; вірус мишачої пневмонії; ретровірус; поліомавірус; тимічний вірус. В результаті негативного тесту на ці патогени стан здоров'я мишей признається задовільним.

Антиген розчиняють у фізіологічному розчині та підшкірно вводять 0,2 мл.

Після введення антигену, імунна система миші розпізнає його як чужерідний агент та розпочинає виробляти специфічні антитіла проти нього.

Перелік контрольних точок:

Кт7.1 Довжина тіла мишей

Кт7.2 Вага тіла мишей

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		44

Кт7.3 Довжина хвоста мишей

Кт7.4 Довжина передніх і задніх лап мишей

Кт7.5 Стать мишей

Кт7.6 Стан здоров'я мишей

Кт7.7 Об'єм підшкірної ін'єкції

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП7.1 Культивування клітин *in vivo*

Через 2-3 тижні після імунізації необхідно розпочати проби крові мишей для оцінки концентрації антитіл за допомогою ІФА. Нормативне значення концентрації для переходу на наступний етап виробничого процесу складає 5-10 мг/мл.

Перелік контрольних точок:

Кт7.1.1 Концентрація антитіл

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП7.2 Евтаназія мишей

Для евтаназії миші вводиться пентобарбітал.

В Україні евтаназія лабораторних тварин, включаючи мишей, регулюється Законом України "Про захист тварин від жорстокого поводження". Згідно з цим законом, евтаназія може проводитись тільки з метою забезпечення здоров'я людей або інших тварин [44].

При проведенні евтаназії мишей необхідно дотримуватись принципів гуманного поводження з тваринами, а саме:

1. Забезпечення максимально можливого комфорту і відсутності страждань для тварини під час процедури евтаназії.
2. Використання найбільш ефективних і швидких методів евтаназії.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		45

3. Проведення евтаназії тільки кваліфікованими фахівцями з дотриманням всіх необхідних заходів безпеки для тварин та людей.
4. Забезпечення належного контролю за процесом евтаназії та виконанням всіх вимог законодавства щодо захисту тварин [45].

Перелік контрольних точок:

Кт7.2.1 Відповідність препарату для евтаназії

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: хімічний, технологічний та мікробіологічний.

ТП7.3 Виділення антитілоутворюючих клітин

Виділення селезінки миші та занурення її в стерильний посуд, що містить 5 мл Поживного середовища А. Промивання селезінки в Поживному середовищі А за допомогою стерильного пінцету в чашці Петрі. Виділення клітин з селезінки за допомогою стерильних щипців. Переміщення клітинної суспензії в пробірку на 15 мл. Підрахунок клітин мієломи та селезінки. Необхідне співвідношення - 1 клітина мієломи на кожні 10 клітин селезінки.

Перелік контрольних точок:

Кт7.3.1 Співвідношення клітин мієломи та селезінки

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ДР6.4 Підготовка матеріалів для злиття

ДР6.4.1 Підготовка клітин мієломної лінії

Розморожування клітин мієломи кісткового мозку людини в водяній ванні. Рекомендується проводити за таким протоколом:

Вийняти зразок з посудини Дьюара і перенести його в лабораторію при збереженні в замороженому стані.

Швидко поставити зразок на 37°C водяну баню та залишити на 1-2 хвилини.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		46

Після того, як зразок розморожений, його потрібно промити, щоб видалити домішки, які можуть завадити подальшим етапам обробки клітин.

Далі, клітини збирають шляхом центрифугування (500g, 10 хв, 5-8°C) і розбавляють у середовищі RPMI-1640.

Перелік контрольних точок:

Кт6.4.1.1 Температура водяної бані

Кт6.4.1.2 Час розморозки мієломної тканини

Кт6.4.1.3 Час центрифугування

Кт6.4.1.4 Швидкість центрифугування

Кт6.4.1.5 Температура центрифугування

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП8 Фузія мієломних клітин та В-лімфоцитів

Центрифугування клітин селезінки (конічна пробірка 15 мл), і клітин мієломи (конічна пробірка 50 мл) при таких параметрах: 300 g протягом 10 хвилин.

Дуже обережно вилити супернатант з обох пробірок і обережно ресуспендувати осад у 10 мл середовища В.

Ресуспендувати клітини мієломи та селезінки в одній пробірці в 50 мл та потім центрифугувати при таких параметрах: 300 g протягом 5 хвилин. Дуже обережно злити якомога більше супернатанту та знову ресуспендувати, легко постукуючи пробіркою по столу [43]. Поставити пробірку на водяну баню, після чого додати зазначені нижче розчини зазначеним способом:

- Додати 1.2 мл ПЕГ крапля за краплею протягом однієї хвилини, обережно перемішуючи кожні кілька крапель.
- Додати 1 мл Поживного середовища В крапля за краплею протягом однієї хвилини, обережно перемішуючи кожні кілька крапель.
- Далі додати 2 мл Поживного середовища В крапля за краплею протягом двох хвилин, обережно перемішуючи кожні кілька крапель.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		118

- Далі додати 4 мл Поживного середовища В крапля за краплею протягом чотирьох хвилин, обережно перемішуючи кожні кілька крапель.
- В кінці додати 8 мл Поживного середовища А.

Центрифугувати пробірку при наступних параметрах: 300 g протягом 5 хвилин.

Дуже обережно злити супернатант і ресуспендувати клітинний осад протягом 1 хвилини з 10 мл середовища А+. Для цього додати кілька мл середовища, щоб почати розщеплювати осад. Помістити 10 мл ресуспендованої суміші фузії в 190 мл теплому середовища А+. Кінцевий обсяг повинен скласти 200 мл [43].

Помістити 1 мл цієї суспензії в кожну лунку восьми 24-лункових (2 мл) планшетів. Залишити в інкубаторі на 24 години.

Перелік контрольних точок:

Кт8.1 Параметри швидкості та часу центрифугування

Кт8.1.1 Параметри окремого центрифугування клітин селезінки та мієломи

Кт8.1.2 Параметри центрифугування клітин мієломи та селезінки в одній пробірці

Кт8.1.3 Параметри центрифугування клітин мієломи та селезінки після додавання ПЕГ та поживних середовищ В та А

Кт8.1.4 Асептичність

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: мікробіологічний та технологічний.

ТП9 Селекція гібридом

Додати 8 мл ГАТ в 200 мл середовища А+. Селекція відбувається шляхом додавання в кожну лунку кожного планшета по 1 мл цієї суміші. Таким чином, мієломні клітини, які не злились з клітинами селезінки під час процесу фузії, втратять можливість подальшої проліферації через нездатність

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		48

засвоювати гіпоксантин, а клітини, які злились, продовжать розмножуватися [43].

Кт9.1 Кількісний склад робочої суміші

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП10 Культивування гібридомних клітин

Залишити клітинний розчин в інкубаторі на 24 години. Додати 8 мл Поживного середовища А+.

Залишити в інкубаторі на 7-10 днів з заміною поживного середовища на нове кожні 2 дні. Налаштування інкубатора наступні: $t = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{CO}_2 = 5\%$, $h = 95\%$.

Швидкість обертання вентилятора в інкубаторі повинна складати 60-80 об/хв.

Перелік контрольних точок:

Кт10.1 Час інкубації

Кт10.2 Температура інкубації

Кт10.3 Концентрація вуглекислого газу

Кт10.4 Швидкість обертання вентилятора

Кт10.5 Частота заміни поживного середовища

Кт10.6 Вологість інкубації

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП11 Скринінг культури отриманих клітин

Відбір гібридомної клітини, що продукує необхідні моноклональні антитіла. Скринінг відбувається за допомогою імуно-ферментного аналізу. Таким чином відбирається найбільш продуктивна клітина, яка продукує найбільшу кількість антитіл раку молочної залози та має життєздатність не менше 95%. Для визначення життєздатності застосовується забарвлення ціаном, а також дослідження за допомогою електронної мікроскопії, де

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		49

проводиться аналіз цілісності мембран та порівняння морфологічних ознак з типовими зразками вдалих гібридомних клітин.

Перелік контрольних точок:

Кт11.1 Кількість колоній гібридомних клітин

Кт11.2 Здатність продукції антитіл раку молочної залози

Кт11.3 Життєздатність гібридомних клітин

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: мікробіологічний та технологічний.

ТП12 Культивування гібридом, що продукують необхідні моноклональні антитіла

Культивування гібридами, що продукує необхідні моноклональні антитіла, відбувається в міні-біореакторі Techfors (30 л).

Для вирощування гібридом у суспензійних культурах дуже важливим є застосування спеціальних безсироваткових середовищ. Для клонування використовується середовище Huby-Max, що не має сироватки і білків. Усього в середовищі міститься 82 компоненти (22 амінокислоти, 12 вітамінів, 27 неорганічних речовин і 21 - решта сполук) [57].

Обрані в минулій стадії гібридомні клітини поміщають в середовище Huby-Max на 10-15 днів при наступних параметрах біореактора: $t = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,8-7,2$, $h = 80\%$.

Перелік контрольних точок:

Кт12.1 Температура культивування

Кт12.2 pH культивування

Кт12.3 Вологість культивування

Кт12.4 Час культивування

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП13 Виділення та очищення моноклональних антитіл

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		50

Виділення та очищення моноклональних антитіл з гібридомної клітини проводиться за допомогою афінної хроматографії, яка базується на специфічному зв'язуванні антитіла з певними речовинами (лігандами) на стаціонарній фазі.

ТП13.1 Підготовка матеріалу

Проводиться центрифугування клітинної маси гібридомних клітин з такими параметрами: $g = 1000$ об/хв, $t = 15$ хв, $t = 4-8^{\circ}\text{C}$.

Перелік контрольних точок:

КТ13.1.1 Швидкість центрифугування

КТ13.1.2 Час центрифугування

КТ13.1.3 Температура центрифугування

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП13.2 Збагачення антитіл

Отриману клітинну суспензію піддають першому етапу очищення з метою збагачення антитіл. Для цього використовуються спеціальні колонки зі стаціонарною фазою, які містять агарозні сорбенти, виготовлені з матеріалів, що містять ліганди, що специфічно зв'язуються з антитілами. Культура клітин проходить через колонку з сорбентом, де моноклональні антитіла зв'язуються з ним, а решта компонентів видаляються.

ТП13.3 Елюція антитіл.

Після збагачення антитіл клітинна суспензія піддається другому етапу очищення, щоб отримати більш чисті моноклональні антитіла. Для цього використовується метод елюції зі стаціонарної фази за допомогою розчинів змінної концентрації солей. Конкретне значення швидкості протікання елюента визначається експериментально під час оптимізації умов елюції.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		51

Проте, зазвичай швидкість протікання елюента відповідно до рекомендацій може коливатися від 0,5 до 2 мл/хв для колонок діаметром 1-2 см.

Перелік контрольних точок:

КТ13.3.1 Швидкість протікання елюента

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: мікробіологічний та технологічний.

ТП13.4 Контроль якості очищення

Після очищення антитіл на афінній колонці виконуються наступні контрольні дії:

Визначення концентрації антитіл за допомогою спектрофотометрії на довжині хвилі $\lambda = 280$ нм. Рекомендоване нормативне значення концентрації антитіл складає 8-10 мг/мл.

Визначення пікової чистоти антитіл методом гель-фільтрації. Для цього проводять розмірну хроматографію антитіл на Sephacryl S-200, після чого визначають пікову чистоту за допомогою спектрофотометрії на довжині хвилі 280 нм. Визначення пікової чистоти допомагає оцінити чистоту антитіл в клітинному розчині. Нормативне значення чистоти, яке очікується після очищення, складає не менше 95%. Отриманий пік на графіку повинний складатися з одного компонента, зворотня ситуація свідчить про те, що препарат забруднений і необхідно провести повторну очистку.

Перелік контрольних точок:

КТ13.4.1 Концентрація антитіл

КТ13.4.2 Чистота антитіл

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ТП14 Пост-процесінг

ТП14.1 Стерилізація продукції

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		52

Стерилізація готової продукції шляхом фільтрації через фільтр Durapore (PVDF) (розмір пор - 0,1 мікрон) в системі вакуумної фільтрації.

Перелік контрольних точок:

Кт14.1.1 Температура стерилізації

Кт14.1.2 Тиск стерилізації

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний, мікробіологічний.

ПМ16 Пакування, маркування та зберігання готової продукції

ПМ16.1 Пакування

Для пакування використовуються темні скляні флакони об'ємом по 60 мл з пластиковими кришками.

Флакони мають бути чистими та не містити слідів дефектів або пошкоджень. Для запобігання руйнування антитіл в результаті дії світла, флакони мають бути виготовлені з темного скла.

Для забезпечення стабільності антитіл під час транспортування використовуються охолоджувальні елементи, які розміщуються в пластикових контейнерах разом з флаконами.

Перелік контрольних точок:

Кт16.1.1 Цілісність флаконів

Кт16.1.2 Асептичність флаконів

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: мікробіологічний, технологічний.

ПМ16.2 Маркування

Маркування відбувається за допомогою термотрансферного принтера вбудованого в лінію автоматичного пакування. Написи наносяться безпосередньо на етикетку на флаконі. При маркуванні наноситься наступна інформація:

- Назва медичного виробу;

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		53

- об'єм та концентрація моноклональних антитіл на мг.
- номер серії медичного виробу;
- дата закінчення терміну придатності;
- найменування виробника.

Перелік контрольних точок:

Кт16.3.1 Видимість маркування

Кт16.3.2 Наявність всіх написів

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

ТП15 Контроль якості

Після стерилізації відбувається відбір зразків готової продукції та їх наступний посів на триптозо-соєве поживне середовище. Культивування відбувається протягом 2-3 днів в інкубаторі при температурі 35°C в чашках Петрі. Наприкінці відбувається дослідження матеріалу за допомогою електронної мікроскопії, де оцінюється наявність росту мікроорганізмів. Якщо ріст відсутній - стерилізація була успішною.

Оскільки стерилізаційні фільтри мають деяку білок-зв'язуючу властивість, також рекомендується проводити повторний ІФА для визначення концентрації антитіл в клітинному розчині. Нормативне значення повинно становити не менше 8мг/мл.

Перелік контрольних точок:

Кт15.1 Асептичність продукту

Кт15.2 Концентрація антитіл в продукті

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний та мікробіологічний.

ПМ16.3 Зберігання готової продукції

Зберігання готової продукції на складах при температурі 2-8°C в темному місці (не більше 50 лк). При транспортуванні зберігання в

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		54

пластикових контейнерах з охолоджувальними елементами при тих самих температурах.

Перелік контрольних точок:

Кт16.3.1 Температура зберігання

Кт16.3.2 Освітленість в приміщенні для зберігання

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

ЗВ17 Знешкодження відходів

ЗВ17.1 Утилізація біологічних відходів

Для утилізації біологічних відходів використовується автоклавування при наступних параметрах: $t = 135^{\circ}\text{C}$, $t = 60$ хв. Перед цим відбувається попереднє вимочування інструментів, посуду та обладнання в дезінфекційному розчині.

Список контрольних точок:

Кт17.1.1 Час автоклавування

Кт17.1.2 Температура автоклавування

Кт17.1.3 Ефективність автоклавування

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний, мікробіологічний.

ПВ18 Перероблення промислових відходів

Матеріали та речовини, що можуть бути повторно використані, підлягають роздільному збору та подальшій переробці відповідними організаціями. Окремо відбувається сортування картону та паперу (коробки від надходження сировини та матеріалів тощо), пластику, елементів живлення. При накопиченні достатньої кількості відходів, відповідальна особа організовує їх вивезення попередньо обраною для переробки профільною організацією.

Список контрольних точок:

Кт18.1 Вивезення відходів для переробки

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		55

Ризики на даній стадії можуть нести такий характер: технологічний.

Висновки до розділу 2

Розроблено технологічну схему виробництва моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології. В якості способу культивування клонів гібридом було обрано культивування в суспензійних культурах.

Процес виробництва було розбито на два окремі технологічні процеси. Технологічний процес I включає ті стадії та підстадії виробництва, що стосуються отримання продуцента, а технологічний процес II - всі стадії та підстадії, що стосуються безпосередньо продукції моноклональних антитіл. До технологічного процесу I належать стадії виробництва ДР1-ТП12, а до технологічного процесу II - ТП13-ПВ18.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		56

РОЗДІЛ 3. ОРГАНІЗАЦІЯ УПРАВЛІННЯ ПРОЕКТОМ: ПРОЕКТУВАННЯ, БУДІВНИЦТВО, ЗАПУСК, ЕКСПЛУАТАЦІЯ

Для обґрунтування організації робіт на підприємстві був використаний Додаток 2 Виробництво біологічних діючих речовин та біологічних лікарських препаратів СТ-Н МОЗУ 424.0:2016 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика».

Відповідно до цього документу при роботі з живими клітинами, що є стійкими у виробничому середовищі, необхідно використовувати спеціально призначені виробничі зони [46].

Виробництво було розподілено за цехами на наступні основні приміщення:

- 0, 1, 2 - приміщення для підготовки персоналу;
- 3 - склад сировини;
- 4 - цех підготовки матеріалів;
- 5 - лабораторія культивування *in vivo*;
- 6 - лабораторія культивування *in vitro*;
- 7 - цех виділення та очищення;
- 8 - цех стерилізації продукції;
- 9 - цех контролю якості;
- 10 - цех пакування та маркування;
- 11 - цех зберігання готової продукції.

Всі приміщення в будівлі виробництва розташовано послідовно, за годинниковою стрілкою. В сусідніх приміщеннях 4 та 5 процеси відбуваються одночасно, оскільки мають здебільшого підготовчий характер, передуючи основному процесу виготовлення моноклональних антитіл. В інших приміщеннях процеси відбуваються строго один за одним відповідно

					БФ2107.23.40.001ПЗ		
Вим	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробила	Коблевська				Літ.	Лист	Листів
Перевірів	Бесараб					57	118
Реценз.					РОЗДІЛ 3 КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБМІ БФ-21мп		
Н. Контр.							
Затвердив							

до технологічної схеми.

Виробництво обладнане чотирма точками входу/виходу, з яких дві призначені для персоналу (одна в приміщенні 0, а інша - в кінці коридору), тоді як інші дві слугують для вивантаження сировини та завантаження готової продукції (відповідно, одна розташована в приміщенні 3, а інша - в приміщенні 11). Для оцінки чистоти приміщень використовувалися перші чотири класи - А, В, С, D.

Загалом в зоні А знаходиться 3 з 12 виробничих приміщень: цех підготовки матеріалів, лабораторія культивування *in vitro* та лабораторія культивування *in vivo*. Необхідність чистоти класу А в цих кімнатах обумовлена високою значимістю процесів, що протікають в них, та високим ризиком мікробіологічної загрози продукованого матеріалу. Доступ персоналу до даних приміщень забезпечений, однак обмежений. Дані приміщення організовані в ламінарних боксах, вхід до яких здійснюється з повітряних шлюзів 2А (коридор) та 3А (склад сировини). Заради економії місця та забезпечення мінімального контакту оточуючого середовища з персоналом в приміщеннях класу А встановлено автоматичні двері-слайдери.

До зони В потрапило 5 приміщень: одне з приміщень підготовки персоналу, цех виділення та очищення, цех стерилізації продукції, цех контролю якості та цех пакування та маркування. В цих кімнатах відбуваються доволі важливі процеси, які, натомість, несуть меншу загрозу контамінації продукції. З невиробничих приміщень до зони класу В було віднесено повітряні шлюзи 2А та 3А.

До зони С було розподілено 3 приміщення, серед яких: одне з приміщень підготовки персоналу, склад сировини та склад готової продукції. В приміщеннях цього класу все ще зберігається достатній рівень чистоти, хоча і значно менший, оскільки процеси, що відбуваються тут, не є критичними для виробництва.

До зони D було віднесено 1 приміщення - перше з приміщень підготовки персоналу.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		58

Обладнання

Загалом обладнання виробництва налічує 39 одиниць, з яких:

- 4 шафи для зберігання пакувальних матеріалів;
- 8 посудин Дьюара;
- 6 інкубаторів;
- 1 флуориметр;
- 1 міні-біореактор;
- 4 мікроскопи;
- 2 хроматографи;
- 2 спектрофотометри;
- 1 фасувально-пакувальний апарат;
- 1 маркувальний апарат;
- 6 центрифуг;
- 2 автоклави;
- 1 система вакуумної фільтрації.

До складу сировини (приміщення 3) належать 4 шафи та 8 посудин Дьюара. До цеху підготовки матеріалів (приміщення 4) належать 1 автоклав та 1 центрифуга. До лабораторії культивування *in vivo* (приміщення 5) належать 2 інкубатори, 1 центрифуга та 1 флуориметр. До лабораторії культивування *in vitro* (приміщення 6) належать 2 центрифуги, 3 інкубатори, 2 мікроскопи та 1 міні-біореактор. До цеху виділення та очищення (приміщення 7) належать 2 центрифуги, 2 хроматографи та 2 спектрофотометри. До цеху стерилізації продукції (приміщення 8) належать 1 автоклав та 1 система вакуумної фільтрації. До цеху контролю якості продукції (приміщення 9) належать 1 інкубатор та 2 мікроскопи. Цех пакування та маркування (приміщення 10) обладнаний 1 фасувально-пакувальним та 1 маркувальним апаратом. Серед невказаного на схемі обладнання - шафи в приміщенні 11, на складі сировини, в кількості 25 штук.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		59

Обґрунтування потоків персоналу

Потоки персоналу на схемі виробництва позначено зеленою стрілочкою.

Персонал потрапляє до робочої зони виробництва через приміщення 0, 1 та 2. В приміщенні 0 персонал залишає верхній одяг, взуття та особисті речі. В приміщенні 1 встановлено рукомийники, де персонал обробляє руки миючими та дезінфікуючими засобами. Той персонал, що працює в зонах класу С, одягає халат та рукавички в цьому приміщенні та виходить через вихід зліва чи справа, в залежності від того, на якому зі складів працює. В приміщенні 2 необхідно одягнути захисний одяг - халати, маски, окуляри, стерильні рукавички та змінне взуття тим, хто працює в зонах класу А та В. Далі розподілення персоналу відбувається згідно з цехом (лабораторією), в якому (якій) вони працюють. В кінці робочого дня весь персонал, що працює в зонах А та В, може вийти через вихід в кінці коридору або повернутися через приміщення 1 за особистими речами в приміщення 0. Персонал, що працює на складах, в зонах С, залишає робочі місця через приміщення 1.

Вхід до приміщень класу А здійснюється строго за протоколами безпеки через повітряні шлюзи 2А та 3А. Доставка необхідних матеріалів чи сировин також може здійснюватися персоналом при прямому переходженні з одного ламінарного боксу до іншого - з приміщень 4 та 5 до приміщення 6 та з приміщення 5 до приміщення 4 за необхідності потрапити на робоче місце.

Обґрунтування потоків сировини

Завантаження сировини відбувається через боковий вхід приміщення 3. Далі згідно з протоколом виробництва сировина доставляється через повітряний шлюз 3А до приміщень 4, де відбувається підготовка поживних середовищ та мієломних клітин, та 5, де відбувається підготовка антигену раку молочної залози, імунізація мишей та культивування *in vivo*, включно з етапами скринінгу сироватки мишачої крові. Готові поживні середовища, мієломні клітини та В-лімфоцити вилучені з мишачої селезінки

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		60

транспортуються до приміщення 6, де відбувається злиття клітин, відбір найбільш життєздатних гібридом та їх подальше культивування. Після цього клітинна суспензія доставляється в приміщення 7 для виділення та очищення клітин з суспензії. В приміщенні 8 продукція та пакувальні матеріали зі складу сировин стерилізуються. Відбувається відбір проб продукції в приміщенні 9 і, якщо результати проб відповідають встановленим стандартам, то простерилізовані продукція та пакувальні матеріали прямують до пакувально-маркувального цеху 10, а згодом на склад зберігання готової продукції 11. Вивантаження продукту здійснюють через вихід складу 11.

Висновки до розділу 3

Розроблено схему компоновки приміщень виробництва моноклональних антитіл. Всі приміщення на виробництві розташовано за годинниковою стрілкою відповідно до послідовності виробничого процесу. Виробництво включає всього 12 приміщень, 3 з яких віднесені до класу чистоти А, 5 - класу В, 3 - класу С та 1 - класу D. Устаткування, яким обладнане виробництво, налічує 39 одиниць, і представлене на схемі компоновки приміщень. Також була спроектована схема потоків сировини та персоналу виробництва. Основні потоки на виробництві відбуваються за годинниковою стрілкою — так як проходить виробничий процес.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		61

РОЗДІЛ 4. СИСТЕМА КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Для забезпечення якості готової продукції необхідною умовою є контроль якості вихідної сировини, матеріалів, напівпродуктів і готової продукції. Параметри контролю для оцінки якості сировини, матеріалів та напівпродуктів та НТД, що їх регламентують, наведені у табл.2 [47].

Таблиця 2

Параметри контролю для оцінки якості

Найменування	НТД, що регламентує показник якості	Показник для перевірки	Нормативне значення
1. Сировина			
RPMI 1640 з L-глутаміном	СТ МОЗУ 42-1.0:2005 «Фармацевтична продукція. Система стандартизації. Основні положення»	Бактеріальні ендотоксини Осмоляльність рН SP2 токсичність Стерильність	0.001 - 0.500 МО/мл 265 - 300 мОсмоль/кг H ₂ O 7.00 - 7.40 80.00 - 200.00 Так
FBS	СТ-Н МОЗУ 42-01-2003 Лікарські засоби. Технологічний процес.	Бактеріальні ендотоксини Ріст Фільтрація Білку загалом Гемоглобін Мікоплазма рН Осмоляльність Стерильність	≤10 МО/мл Так Так 3-5 г/дл ≤25 мг/дл Так 6.9-7.8 280-340 мОсмоль/кг H ₂ O Так

					БФ2107.23.40.001ПЗ		
Вим	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробила	Коблевська				Літ.	Лист	Листів
Перевірів	Бесараб					62	118
Реценз.					РОЗДІЛ 4 КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБМІ БФ-21мп		
Н. Контр.							
Затвердив							

Продовження таблиці 2

Пеніцилін/С трептопідин	СТ МОЗУ 42-1.0:2005 «Фармацевтична продукція. Система стандартизації. Основні положення»	Осмоляльність рН Стерильність	280–340 мОсмоль/кг Н20 4.0 - 7.0 Так
Ultroser G	СТ-Н МОЗУ 42-01- 2003 Лікарські засоби. Технологічний процес.	Бактеріальні ендотоксини Ріст Фільтрація Білку загалом Гемоглобін Мікоплазма рН Осмоляльність Стерильність	≤10 МО/мл Так Так 15–25 г/дл ≤25 мг/дл Так 6.9–7.8 280–340 мОсмоль/кг Н20 Так
ГАТ(Гіпоксат ин, Аміноптерин, Тимідин)	СТ-Н МОЗУ 42-01- 2003 Лікарські засоби. Технологічний процес.	Бактерії рН Токсичність Стерильність	Ні 9.00 - 12.00 Задовільна Так
Поліетилен гліколь, 1500	Regulation (ЕС) №1272/2008	Колір Запах Точка горіння рН Тиск пари Стерильність	Білий Без запаху > 250 °С 5.0-7.0 > 0.01 мм.рт.ст. Так

Продовження таблиці 2

Вода очищена	Монограф ія ДФУ 2.0, 2016. Т.2. С. 129	Сухий залишок Нітрати Алюміній Важкі метали Бактеріальні ендотоксини Хлориди Сульфати Амонію солі Кальцій і магній	≤ 1 мг ≤ 0,00002% ≤ 0,000001% ≤ 0,00001% < 0,25 МО/мл немає змін у розчині немає змін у розчині ≤ 0,00002% Чисте синє забарвлення
Нубру-Мах	Документ ація виробника продукту	рН Осмоляльність Амінокислоти Вітаміни Сполуки Неорг. реч. Стерильність	7,0 -7,4 280-310 мОсм/кг 22 12 21 27 Так

2. Матеріали			
Скляні флакони	Документація виробника продукту	Матеріал Герметичність Чистота Об'єм Товщина скла	Темне нейтральне скло Так <5% домішок 60 мл 4-5 мм
Піпетки, чашки Петрі, колби	ДСТУ ISO 11138-1:2003 «Стерилізація виробів медичної призначеності. Загальні вимоги»	Стерильність	Так
3. Напівпродукти			
Миші лінії Balb/c	Згідно виробничого регламенту	Вага Вік Стать Довжина тіла Довжина хвоста Довжина кінцівок Наявність патогенів Концентрація антитіл раку молочної залози	20-30 г 6-8 тижнів Жіноча 10-12 см 8-10 см 2-3 см SPF 5мг/мл
Антигенний розчин	Згідно виробничого регламенту	Вміст Розчинник Об'єм	RPMI 1640 з L-глутаміном +10% FBS +Пеніцилін (100 од/мл)/Стрептоміцин (100 мг/л) Фізіологічний розчин 0,2 мл

Продовження таблиці 2

Клітини мієломи та селезінки	Згідно виробничого регламенту	Співвідношення	1:10
Культура гібридомних клітин	Згідно виробничого регламенту	Життєздатність	95% і більше
Очищені моноклональні антитіла	Згідно виробничого регламенту	Концентрація антитіл Чистота Стерильність	8-10 мг/мл 95% і більше Так, відсутність росту будь-яких сторонніх мікроорганізмів

Рекомендації по контролю якості на проміжних етапах виробництва:*Персонал*

Персонал – приймає безпосередню участь у більшості процесів виробництва і постійно стикається з усіма його складовими. Тому, щоб як забезпечити чистоту та безпеку кінцевого продукту від забруднення персоналом, так і захист самого персоналу, мають застосовуватися певні регламенти роботи, такі як: необхідна кваліфікація та практичний досвід роботи, дотримання гігієнічних правил і одягу персоналу, періодичний контроль знань персоналу за допомогою тестів з подальшим оцінюванням [48]. Складовою частиною санітарної підготовки є підготовка персоналу, як можливого джерела контамінації, при цьому персонал проходить навчання та контроль знань стосовно особливостей технологічного процесу. Основою підготовки персоналу є навчання тому як забезпечити біобезпеку при роботі -

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		66

підготовка рук, одягу, рукавичок, правильне користування дезинфікуючими засобами та обладнанням [48].

Сировина

Якісна сировина є основою подальшої якості напівготового, а потім і готового продукту виробництва. Рекомендується чітко дотримання вказаних в табл.2 показників при закупівлі сировини. Допустима закупівля тільки сертифікованих продуктів з усією наявною та дійсною відповідною сертифікацією, необхідними підписами та штампами. При закупці також необхідно обов'язково звертати увагу на наявність документації, що підтверджує попереднє проведення потрібних тестувань сировини - на стерильність, концентрацію білка, наявність бактеріального ендотоксину тощо та порівнювати вказані значення з показниками із наведеної вище таблиці. Особливо необхідно звертати увагу на характеристики білих мишей. Це повинна бути ізольована колонія, спеціально вирощена вільною від наступних специфічних патогенів: хантавірус; лімфоцитарний хориоменінгіт; реовірус типу 3; мишачий респіровірус; вірус ектромелії; к-вірус; вірус ПЛДГ (підвищення лактатдегідрогенази); мишачий аденовірус; мишачий цитомегаловірус; вірус мишачого енцефаломієліту; вірус мишачого гепатиту; мишачий ротавірус; вірус мишачої пневмонії; ретровірус; поліомавірус; тимічний вірус. Для контролю після закупівлі необхідно провести ІФА на визначення всіх вказаних патогенів.

Матеріали

Матеріали виробництва - важлива складова, яка робить дійсним або полегшує процес виробництва, тому має бути тільки високоякісною та відповідати всім вимогам наведеним в таблиці. Весь використовуваний інструментарій та посуд - скляний, керамічний, металевий - піддається попередній стерилізації в автоклаві в регламентованих виробничим процесом режимах перед та після кожного використання. Фізичні показники матеріалу для пакування мають повністю співпадати зі вказаними задля уникнення псування продукту. Флакони повинні бути чистими, біонейтральними, мати

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		67

мінімальну кількість домішок в складі, а також забезпечувати герметичність при закупорці.

Напівпродукти

Напівпродукт - це стадія сировини, що передує готовому продукту. При контролі якості на цьому етапі дуже важливо порівнювати отримані при застосованому методі контролю показники з тими, що вказані в таблиці.

Миші перед забранням біоматеріалу піддаються лабораторним тестам, націленим на отримання інформації про їх вагу, вік, загальний фізичний стан, а особливо - імунні показники (наявність конкретних антигенів в достатній кількості).

Таблиця 3

Контроль якості готової продукції

Показник, що перевіряється	Метод контролю	Нормативне значення показника
Концентрація антитіл	ІФА	Не менше 8мг/мл
Стерильність	Бактеріальний посів	Відсутність росту мікроорганізмів
Ступінь очистки МАТ	Розмірна хроматографія (гель-фільтрація), спектрофотометрія	Вміст домішок не більше 5%.

Оскільки стерилізаційні фільтри мають деяку білок-зв'язуючу властивість, також рекомендується проводити повторний ІФА для контролю концентрації антитіл в клітинному розчині. Нормативне значення повинно становити не менше 8мг/мл.

Після стерилізації відбувається відбір зразків готової продукції та їх наступний посів на триптозо-соєве поживне середовище. Наприкінці відбувається дослідження матеріалу за допомогою електронної мікроскопії, де оцінюється наявність росту мікроорганізмів. Якщо ріст відсутній - стерилізація була успішною.

Перевірка ступеню очистки моноклональних антитіл проводиться методом гель-фільтрації, після чого визначається пікова чистота за допомогою спектрофотометрії на довжині хвилі 280 нм. Визначення пікової чистоти допомагає оцінити чистоту антитіл в клітинному розчині. Нормативне значення чистоти, яке очікується після очищення, складає не менше 95% (тобто вміст домішок 5% та менше).

Висновки до розділу 4

Розроблено систему оцінки якості сировини, матеріалів, напівпродуктів та готової продукції виробництва. Складено та представлено таблицю з наведеними нормативними значеннями показників окремих складових продукції. Також наведено загальні рекомендації щодо контролю якості компонентів та знань персоналу.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		69

РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА ВИРОБНИЧИХ РИЗИКІВ

Виробництво моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози відноситься до виробництв стерильних лікарських засобів, а також таких, де відбувається виробництво в асептичних умовах [46]. Забезпечення належної якості лікарських засобів є обов'язковою складовою фармацевтичного виробництва. Тому створення надійної і налагодженої системи забезпечення якості і управління якістю є особливо важливими складовими виробничого процесу. Отримання якісної та ефективної продукції забезпечується дотриманням системи GMP та фармацевтичної системи якості з введенням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок (Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP) [49].

Основними принципами HACCP є:

- аналіз небезпечних факторів;
- визначення критичних контрольних точок;
- встановлення критичних меж;
- створення системи моніторингу;
- встановлення коригуючих дій;
- встановлення процедури перевірки;
- встановлення процедури реєстрації даних.

Основну увагу при аналізі системи якості необхідно приділити аналізу мікробіологічного ризику протягом всього життєвого циклу лікарського засобу. Кожна зі стадій виробництва в асептичних умовах вимагає валідації і ретельного контролю. В асептичних процесах висока ймовірність помилок, які можуть привести до випуску неякісного продукту. Будь-яка ручна або механізована операція з попередньо стерилізованим лікарським препаратом або первинними пакувальними матеріалами до або під час асептичного

					БФ2107.23.40.001ПЗ			
Вим	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила	Коблевська				РОЗДІЛ 5	Літ.	Лист	Листів
Перевірів	Бесараб						70	118
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Н. Контр.						ФБМІ БФ-21мп		
Затвердив								

компонування несе ризик контамінації і тому повинна бути об'єктом ретельного аналізу і контролю. Для забезпечення стерильності готового продукту у виробництві повинні використовуватися системи та обладнання, що пройшли кваліфікацію, відповідним чином навчений і кваліфікований персонал, контрольоване навколишнє середовище і повністю документовані і валідовані технологічні процеси [49].

Проаналізувавши схему виробництва можна визначити наступні ККТ:

- санітарна підготовка виробництва, що включає підготовку дезинфікуючих та миючих розчинів та підготовку персоналу, підготовку посуду та інструментів, підготовку обладнання та прибирання приміщень, підготовку повітря, підготовку води, огляд та налаштування обладнання - на цих стадіях може виникнути ризик хімічного та мікробіологічного ураження та ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 1);

- пре-процесінг, що включає приготування поживних середовищ, підготовку антигенного розчину, підготовку матеріалів для злиття, підготовку клітин мієломної лінії та підготовку поживних середовищ - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 2);

- імунізація мишей, що включає культивування клітин *in vivo*, евтаназію мишей та виділення антитілоутворюючих клітин - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, ризик відхилення в проведенні технологічного процесу, а також ризик хімічного ураження (очікуваний ризик R 3);

- фузія мієломних клітин та В-лімфоцитів - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 4);

- селекція гібридом - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 5);

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		71

- культивування гібридомних клітин - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 6);

- скринінг культури отриманих клітин - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 7);

- культивування гібридом, що продукують необхідні моноклональні антитіла - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 8);

- виділення та очищення моноклональних антитіл, що включає підготовку матеріалу, елюцію антитіл та контроль якості очищення - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 9);

- пост-процесінг, що включає стерилізацію продукції - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 10);

- контроль якості - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 11);

- пакування, маркування та зберігання готової продукції - на цих стадіях може виникнути ризик мікробіологічної контамінації, а також ризик відхилення в проведенні технологічного процесу (очікуваний ризик R 12).

Для ефективного управління вищезгаданими ризиками необхідно спочатку розробити матрицю ризиків, яка допоможе зрозуміти, які з ризиків є найбільш імовірними та мають найбільші наслідки для виробництва. Методом експертної оцінки за 3-х бальною шкалою визначалась імовірність та тяжкість наслідків кожного з ризиків. Опитувальник для експерта представлено в додатку А.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		72

Таблиця 4

Імовірність ризику

Бали	Ступінь	Діапазони вірогідності
1	Низький	0,0001 - 0,00001
2	Середній	0,01 - 0,0001
3	Високий	>0,01

Таблиця 5

Тяжкість наслідків

Бали	Ступінь	Наслідки для продукції та виробництва
1	Незначний	Завдання несуттєвих збитків виробництву, без впливу на якість продукції
2	Помірний	Завдання помірних збитків виробництву, погіршення показників концентрації моноклональних антитіл, локалізована контамінація сировини/напівпродуктів/готової продукції
3	Значний	Завдання значних збитків виробництву, дуже низька концентрація моноклональних антитіл та/або повна контамінація сировини/напівпродуктів/готової продукції

Оцінка ризиків проводилась за формулою:

$$R = P * S,$$

де R – ризик, в балах;

P – вірогідність виникнення небезпеки, в балах;

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		73

S – серйозність наслідків дії небезпеки, в балах.

Таким чином, було складено матрицю класифікації ризиків, за якою і проводилась оцінка кожного з ризиків експертами (табл.6).

Таблиця 6

Матриця класифікації ризиків на виробництві

		Тяжкість наслідків		
		Ступінь	Незначний 1	Помірний 2
Імовірність наслідків	Низький 1	1	2	3
	Середній 2	2	4	6
	Високий 3	3	6	9

Так, згідно з даною таблицею, ризики можна умовно розділити на декілька категорій:

Таблиця 7

Критерії впровадження заходів та управління ризиками

Рівень ризику	Бальна оцінка	Вживані заходи
Мінімальний	1-2	Заходи не потребуються. Проведення періодичного контролю рівня ризику.
Поміrkований	3-4	Заходи вживаються протягом 1 календарного місяця. Проведення постійного контролю.
Максимальний	6-9	Заходи вживаються негайно. Використання наявних інструкцій щодо усунення ризиків або термінова розробка плану заходів для їх мінімізації.

Такий розподіл ризиків необхідний для швидкого визначення рівня ризику та відповідної реакції на цей ризик. Мінімальний ризик не потребує жодних заходів, натомість рекомендується періодично моніторити загальний рівень ризику, щоб в разі його зростання до поміrkованого чи максимального, швидко зреагувати. При визначення ризику як поміrkованого заходи

вживаються протягом одного місяця, а також встановлюється постійний контроль ризикованої ситуації. При максимальному рівні ризику заходи вживаються негайно, з моменту його виявлення. Для мінімізації ризиків необхідно застосовувати інструкцію, спеціально розроблену під конкретну ситуацію. В разі, коли інструкція відсутня, проводиться негайна розробка плану заходів, покликаних зупинити ризиковану ситуацію та ліквідувати її наслідки.

На основі експертних оцінок було складено матрицю ризиків на виробництві (табл.8).

Таблиця 8

Матриця ризиків на виробництві

		Якісні рівні тяжкості		
		Незначний	Помірний	Значний
Якісні рівні вірогідності	низький		R2, R7, R10	R12
	середній		R1, R4, R6, R8, R11	R3, R9
	високий		R5	

Як видно з матриці ризиків, найбільш критичними точками є імунізація мишей, селекція гібридом та виділення та очищення моноклональних антитіл; найменш критичними - пре-процесінг, скринінг культури отриманих клітин та пост-процесінг. 9 з 12-ти ризиків були охарактеризовані помірним якісним рівнем тяжкості і тільки 3 значним. Якісний рівень вірогідності 7-ми з 12-ти ризиків було визначено як середній. Лише один ризик був охарактеризований, як той, що має високий рівень вірогідності. Загалом, згідно з матрицею ризиків, тільки 3 ризики R5, R3 та R9 потребують негайного усунення. Відповідно, R1, R4, R6, R8, R11 та R12 можуть бути усунені протягом місяця, а R2, R7, R10 потребують лише регулярного контролю. Для ризиків, що

потребують негайного усунення, рекомендується заздалегідь розробити плани дій.

Однією з ефективних стратегій подолання труднощів є превентивний підхід, що полягає в систематичному виявленні та аналізі можливих ризиків з метою їх передбачення та запобігання. На промисловому підприємстві доцільно встановити контрольні точки для постійного моніторингу важливих параметрів процесів з метою попередити ризик.

Нижче наведено табл.9 з контрольними точками та параметрами контролювання та їх нормативними значеннями під час кожної із стадій та/або підстадій технологічного процесу для забезпечення вироблення якісної та безпечної продукції.

Таблиця 9

Контрольні точки під час стадій та підстадій виробництва

Стадія та підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметру	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
ДР6 Пре-процесінг ДР6.1 Приготування поживних середовищ ДР6.2 Підготовка поживних середовищ	Ктб.1.1	Пропорції речовин в поживних середовищах	Відповідно виробничому регламенту	Візуально, мануально, шкали на піпетках та посуді	Кожну операцію
ДР6.3 Підготовка антигенного розчину ДР6.4 Підготовка матеріалів для злиття ДР6.4.1 Підготовка клітин мієломної лінії	Ктб.2.2.1	Відповідність забраних матеріалів	Відповідно виробничому регламенту	Візуально	Кожну операцію
	Ктб.2.2.2	Температура стерилізації	120°C	Вбудований термометр	Кожну операцію
	Ктб.2.2.3	Тиск стерилізації	0,11 МПа	Вбудований манометр	Кожну операцію

Продовження таблиці 9

	Кт6.2.2.4	Час стерилізації	20 хв	Вбудований таймер	Кожну операцію
	Кмб6.2.2.5	Ефективність стерилізації	Відсутність м/о та їх спор	Біологічний індикатор	Кожну операцію
	Кт6.3.1	Час центрифугування	5 хв	Вбудований таймер	Кожну операцію
	Кт6.3.2	Швидкість центрифугування	300 g	Вбудований регулятор швидкості	Кожну операцію
	Кт6.4.1.1	Температура водяної бані	37°C	Термометр	Кожну операцію
	Кт6.4.1.2	Час розморозки мієломної тканини	1-2 хв	Годинник	Кожну операцію
	Кт6.4.1.3	Час центрифугування	10 хв	Вбудований таймер	Кожну операцію
	Кт6.4.1.4	Швидкість центрифугування	500g	Вбудований регулятор швидкості	Кожну операцію
	Кт6.4.1.5	Температура центрифугування	5-8°C	Вбудований термометр	Кожну операцію

Продовження таблиці 9

ТП7 Імунізація мишей ТП7.1 Культивування клітин <i>in vivo</i> ТП7.2 Евтаназія мишей ТП7.3 Виділення антитілоутворюючих клітин	Кт7.1	Довжина тіла мишей	10-12 см	Рулетка	Кожну операцію
	Кт7.2	Вага тіла мишей	20-30 г	Ваги	Кожну операцію
	Кт7.3	Довжина хвоста мишей	8-10 см	Рулетка	Кожну операцію
	Кт7.4	Довжина передніх і задніх лап мишей	2-3 см	Рулетка	Кожну операцію
	Кт7.5	Стать мишей	Жіноча	Візуально	Кожну операцію
	Кмб7.6	Стан здоров'я мишей	SPF	Перевірка документації постачальника, ІФА	Кожну операцію
	Кт7.7	Об'єм підшкірної ін'єкції	0,2 мл	Візуально, мануально, шкала на шприці	Кожну операцію
	Кт7.1.1	Концентрація антитіл	5-10 мг/мл	ІФА	Кожну операцію
	Кт7.2.1	Відповідність препарату для евтаназії	Пентобарбітал	Візуально	Кожну операцію
	Кт7.3.1	Співвідношення клітин мієломи та селезінки	1:10	Електронна мікроскопія	Кожну операцію

Продовження таблиці 9

ТП8 Фузія мієломних клітин та В-лімфоцитів	Кт8.1.1	Параметри окремого центрифугування клітин селезінки та мієломи	300 g, 10 хв	Вбудовани й таймер, вбудовани й регулятор швидкості	Кожну операцію
	Кт8.1.2	Параметри центрифугування клітин мієломи та селезінки в одній пробірці	300 g, 5 хв	Вбудовани й таймер, вбудовани й регулятор швидкості	Кожну операцію
	Кт8.1.3	Параметри центрифугування клітин мієломи та селезінки після додавання ПЕГ та поживних середовищ В та А	300 g, 5 хв	Вбудовани й таймер, вбудовани й регулятор швидкості	Кожну операцію
ТП10 Культивування гібридомних клітин	Кт10.1	Час інкубації	7-10 днів	Вбудовани й таймер	Кожну операцію
	Кт10.2	Температура інкубації	37°C	Вбудовани й термометр	Кожну операцію
	Кт10.3	Концентрація вуглекислого газу	5%	Вбудовани й газоаналізатор	Кожну операцію

Продовження таблиці 9

		Кт10.4	Швидкість обертання вентилятора	60-80 об/хв	Вбудовані й регулятор	Кожну операцію
		Кт10.5	Частота заміни поживного середовища	Кожні 2 дні	Таймер	Кожні 2 дні
		Кт10.6	Вологість інкубації	95%	Вбудовані й гігрометр	Кожну операцію
ТП11 культури клітин	Скринінг отриманих	Кмб11.1	Кількість колоній гібридомних клітин	0,5-1 колонія на см ²	Електронна мікроскопія	Кожну операцію
		Кт11.2	Здатність продукції антитіл раку молочної залози	Так	ІФА	Кожну операцію
		Кт11.3	Життєздатність гібридомних клітин	95%	Електронна мікроскопія	Кожну операцію
ТП12 культури гібридом, що продукують необхідні моноклональні антитіла	Культивування	Кт12.1	Температура культивування	37°C	Вбудовані й термометр	Кожну операцію
		Кт12.2	pH культивування	6,8-7,2	Вбудовані й pH-метр	Кожну операцію
		Кт12.3	Вологість культивування	h = 80%	Вбудовані й гігрометр	Кожну операцію
		Кт12.4	Час культивування	10-15 днів	Вбудовані й таймер	Кожну операцію

Продовження таблиці 9

ТП13 Виділення та очищення моноклональних антитіл	Кт13.1.1	Швидкість центрифугування	1000 об/хв	Вбудований регулятор швидкості	Кожну операцію
ТП13.1 Підготовка матеріалу	Кт13.1.2	Час центрифугування	15хв	Вбудований таймер	Кожну операцію
ТП13.3 Елюція антитіл	Кт13.1.3	Температура центрифугування	4-8°C	Вбудований термометр	Кожну операцію
ТП13.4 Контроль якості очищення		Швидкість протікання елюента	0,5-2 мл/хв	Вбудований потокомір	Кожну операцію
		Концентрація антитіл	8-10 мг/мл	Спектрофотометрія	Кожну операцію
		Чистота антитіл	95%	Гель-фільтрація, спектрофотометрія	Кожну операцію
ТП14 Пост-процесінг	Кт14.1.1	Температура стерилізації	60°C	Вбудований термометр	Кожну операцію
ТП14.1 Стерилізація продукції	Кт14.1.2	Тиск стерилізації	-15 кПа	Вбудований манометр	Кожну операцію

Висновки до розділу 5

Проведено аналіз ризиків на виробництві методом експертного опитування. Розроблено систему оцінки та керування ризиками. Визначено, що найбільш ризикованими стадіями є імунізація мишей, селекція гібридом та виділення та очищення моноклональних антитіл. Для основних стадій виробництва (ДР6 - ТП14) встановлено контрольні точки.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		82

РОЗДІЛ 6. СТАРТАП-ПРОЄКТ

Метою стартапу є запуск виробництва моноклональних антитіл. Об'єкт дослідження в даному стартапі це моноклональні антитіла чутливі до антигенів раку молочної залози. В Міжнародній класифікації товарів та послуг продукт в контексті його запланованого застосування належить до класу 5 - Фармацевтичні, медичні та ветеринарні препарати - реактиви діагностичних біомаркерів на медичні потреби під номером 050443 [65].

Цінність даного продукту для суспільства є беззаперечною, оскільки безпосередньо сприяє:

- збільшенню точності діагностики раку молочної залози та виявленню захворювання на ранніх стадіях, що сприяє ефективному лікуванню;
- можливості проводити моніторинг та корекцію терапії під час процесу лікування;
- скороченню часу та затрат на терапію завдяки вчасному виявленню захворювання;
- розробці ефективних персоналізованих методів лікування;
- боротьбі із захворюванням і покращенню рівня життя окремих індивідів та суспільства вцілому;
- зменшенню економічного тиску на систему охорони здоров'я.

Гранична корисність товару визначається як суспільна цінність, яку споживач втратить при відмові від цього товару [66]. Гранична корисність продукovanого товару охоплює аспект здоров'я та економічний аспект. Тобто, відмовляючись від товару, кінцевий споживач втрачає якість життя (зокрема здоров'я), яка могла би бути здобута при не відмові від цього товару, а часто і саме життя, а також несе фінансові збитки, залучаючи пізніше на лікування значніші кошти, аніж за умови споживання товару. Зважаючи на те, що

					БФ2107.23.40.001ПЗ		
Вим	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розробила	Коблевська				Літ.	Лист	Листів
Перевірів	Бесараб					83	118
Реценз.					РОЗДІЛ 6 КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБМІ БФ-21мп		
Н. Контр.							
Затвердив							

стартап розрахований на B2B2C модель підприємництва, можна виокремити і економічний аспект для бізнесів - лабораторій, які могли б надавати послуги кінцевим споживачам із залученням моноклональних антитіл. Згаданий аспект полягає у втраті можливостей потенційного отримання прибутку.

Зовнішнє та зовнішнє оперативне середовища, до факторів яких належать політика, демографія, економіка, географія, культура і науково-технічний прогрес; конкуренти, постачальники, посередники і споживачі відповідно, опосередковано та прямо впливають на підприємство [66]. Для ефективного контролю та управління підприємством проводиться аналіз потенційних загроз та можливостей. Нижче наведено таблиці аналізу факторів зовнішнього середовища та зовнішнього оперативного середовища.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		84

Аналіз факторів зовнішнього середовища

Фактор	Загрози	Можливості
Політика 1. Збройна агресія в бік України 2. Зовнішня політика 3. Нестабільність законодавчої бази 4. Державна політика з підтримки підприємництва	1.1 Загроза безпеці та цілісності інфраструктури 1.2 Загроза безпеці персоналу 1.3 Завдання збитків імпорту та експорту, розірвання логістичних ланцюгів 1.4 Зміна пріоритетності витрати коштів кінцевих споживачів, втрати у споживчому запиті 2.1 Загроза імпорту та експорту через блокування пропускних пунктів на кордоні із західними країнами, потенційне впровадження системи дозволів для перевізників 3.1 Складність відслідковування постійних змін в законодавстві 3.2 Складність ведення звітної документації [67]	1.1 Розширення ділових операцій в більш захищені регіони або регіони, що не зазнають військової агресії 1.2 Розширення асортименту 1.3 Встановлення нових та/або резервних партнерств 2.1 Пошук принципово нових способів імпорту та експорту, реорганізація логістики 4.1 Бюджетні та донорські програми для підтримки бізнесу [68] 4.2 Спрощене ведення бізнесу через впровадження онлайн-сервісів 4.3 Доступність інформаційних ресурсів 4.4 Зменшення тиску контролюючих органів 4.5 Можливість отримання консультацій в центрах підприємництва [67]

<p>Економіка</p> <p>1. Податкове навантаження</p> <p>2. Інфляція</p> <p>3. Стан кредитування</p> <p>4. Доступність ресурсів</p>	<p>Неокупність та збитки підприємства</p> <p>2.1 Збільшення витрат на обладнання та сировину</p> <p>3.1 Збільшення фінансового навантаження</p> <p>4.1 Значні витрати на імпортоване обладнання та матеріали [67]</p> <p>4.2 Недостатня кількість енергоресурсів та їх дороговизна</p> <p>4.3 Додаткові витрати на альтернативні джерела енергії через можливе збройне ураження об'єктів цивільної інфраструктури</p>	
<p>Демографія</p> <p>1. Міграція та мобілізація працездатного населення</p> <p>2. Інвалідизація чи смерть населення в результаті збройного конфлікту</p> <p>3. Зменшення рівня народжуваності</p> <p>4. Підвищення рівня безробіття</p> <p>5. Зростання рівня соціальних потреб населення</p>	<p>1.1-3.1 Зменшення кількості потенційного кваліфікованого людського ресурсу</p> <p>1.2-3.2 Зменшення кількості потенційних споживачів</p> <p>4.1 Зменшення кількості платоспроможного населення</p> <p>5.1 Необхідність збільшення рівня заробітної плати</p>	

Продовження таблиці 10

<p>Культура</p> <p>1. Стигматизація в суспільстві, сором при проходженні процедур, що стосуються дослідження здоров'я молочних залоз</p> <p>2. Сексизм та несерйозне чи упереджене ставлення до проблем жінок з боку лікарів</p> <p>3. Впровадження в суспільство феміністичних ідей та ідеї турботи про себе</p>	<p>1.1-1.2 Зменшення кількості потенційних споживачів</p>	<p>2.1 Збільшення кількості потенційних споживачів</p>
<p>Науково-технічний прогрес</p> <p>1. Розвиток ІТ-технологій</p> <p>2. Нове та сучасне обладнання</p> <p>3. Винаходження нових і більш ефективних та/або дешевих способів скринінгу</p>	<p>3.1 Втрата попиту на продукований товар</p>	<p>1.1 Ефективніша робота щодо залучення партнерів і споживачів, більші можливості для імпорту продукту, попереднє моделювання та тестування систем і методів без значної витрати коштів.</p> <p>1.1-2.1 Автоматизація процесів, більша точність та швидкість виробництва, зменшення кількості помилок внаслідок людського фактору</p>

Аналіз факторів зовнішнього оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Конкуренти	1.1 Широкий асортимент товарів та послуг	1.1 Не виробляють моноклональних антитіл
1. Діапроф-мед	1.2 На ринку 25 років	специфічних до антигенів раку МЗ
2. ВІПРОТЕСТ	2.1 На ринку більше 25 років	1.2 Слабкий маркетинг
3. БІОФАРМА	2.2 Інноваційність	1.3 Дороговизна продукції
4. Хема	2.3 Висока якість продукції	1.4 Посередня якість
	3.1 На ринку більше 125 років	1.5 Брак інформації для потенційних споживачів
	3.2 Сучасні стратегії маркетингу	2.1 Не виробляють моноклональні антитіла
	3.3 Експорт в 20+ країн світу	2.2 Висока вартість продукції
	3.4 Сучасні технології	2.3 Застарілі стратегії маркетингу
	3.5 Висока якість продукції	2.4 Брак інформації для потенційних споживачів
		3.1 Висока вартість продукції
		3.2 Брак інформації для потенційних споживачів
		3.3 Вузкий асортимент продукції
		3.4 Не виробляють моноклональні антитіла

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата

Продовження таблиці 11

<p>Постачальники</p> <p>1. БІОМОДЕЛЬСЕРВІС</p> <p>2. MICROmed</p> <p>3. Labstar</p> <p>4. Unilab</p> <p>5. Thermo Fisher Scientific</p> <p>6. Spectrolab</p> <p>7. Steinberg Systems</p> <p>8. Bimedix</p> <p>9. Лабораторний маркет</p> <p>10. PACKHOUSE MACHINERY</p> <p>11. Tissue Array</p> <p>12. Київтеплоенерго</p> <p>13. Київводоканал</p>	<p>1.1 Наявна необхідна продукція та документи</p> <p>2.1 Наявна необхідна продукція</p> <p>2.2 Підтверджена висока якість продукції</p> <p>2.3 Задовільна ціна продукції</p> <p>2.4 Наявна вся необхідна інформація про ціни та для комунікації</p> <p>3.1 Наявна необхідна продукція</p> <p>3.2 Задовільна ціна продукції</p> <p>3.3 Висока якість продукції</p> <p>4.3 Наявна необхідна продукція</p> <p>4.4 Швидка доставка</p> <p>5.1 Висока якість продукції</p> <p>5.2 Наявна необхідна документація</p> <p>6.1 Задовільні ціни</p> <p>6.2 Висока якість та специфічність продукції</p>	<p>1.1 Брак інформації про ціни</p> <p>1.2 Брак нормальної комунікації</p> <p>4.3 Брак інформації про ціни</p> <p>5.1-6.1 Додаткові витрати на доставку</p> <p>5.2-6.2 Довготривала доставка</p>
<p>Посередники</p> <p>1. Vau</p> <p>2. Автотрансгарант</p> <p>3. Fondy</p>	<p>1.1 Висока якість та ефективність</p> <p>1.2 Сучасний підхід до вирішення проблем</p> <p>2.1 Задовільна якість</p> <p>2.2 Низька ціна</p> <p>3.1 Задовільна ціна</p> <p>3.2 Швидкість</p> <p>3.3 Зручність</p>	<p>1.1 Висока вартість</p>

Продовження таблиці 11

<p>Споживачі</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nikolab 2. Esculab 3. CSDlab 4. Dila 5. Unilab 	<p>Високий рівень технічної компетенції, швидко налагоджувана співпраця з постачальниками, задовільна ціна продажу продукції, низька вартість доставки</p>	
--	--	--

На підставі аналізу факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ було визначено ключові фактори успіху підприємства та його конкурентів. Було обрано 4 основних фактори успіху - категорій, по яким проводилось порівняння створюваного проекту з основними його конкурентами. Якість продукції, доступність ціни, брендова репутація та ексклюзивність продукції оцінювались по шкалі від 1 до 5 на підставі проаналізованої інформації.

Таблиця 12

Оцінка характеристики за методом Шонфільда

Характеристика	Коефіцієнт вагомості характеристики	Оцінка характеристик			
		Наша продукція	Конкурент-1	Конкурент-2	Конкурент-3
Якість продукції	0,3	5	3	5	5
Доступність ціни	0,3	4	3	3	2
Ексклюзивність продукції	0,3	5	3	3	4
Брендова репутація	0,1	4	2	3	5

Далі проводиться бальна оцінка кожної характеристики з урахуванням коефіцієнтів вагомості для кожного з конкурентних виробництв та нашого виробництва.

Таблиця 13

Бальна оцінка характеристик

Характеристика	Бальна оцінка характеристик			
	Наша продукція	Конкурент-1	Конкурент-2	Конкурент-3
Якість продукції	1,5	0,9	1,5	1,5
Доступність ціни	1,2	0,9	0,9	0,6

Ексклюзивність продукції	1,5	0,9	0,9	1,2
Брендова репутація	0,4	0,2	0,3	0,5

Нижче представлено діаграму, яка наочно відображає порівняння ключових факторів успіху нашого проекту та прямих конкурентів.

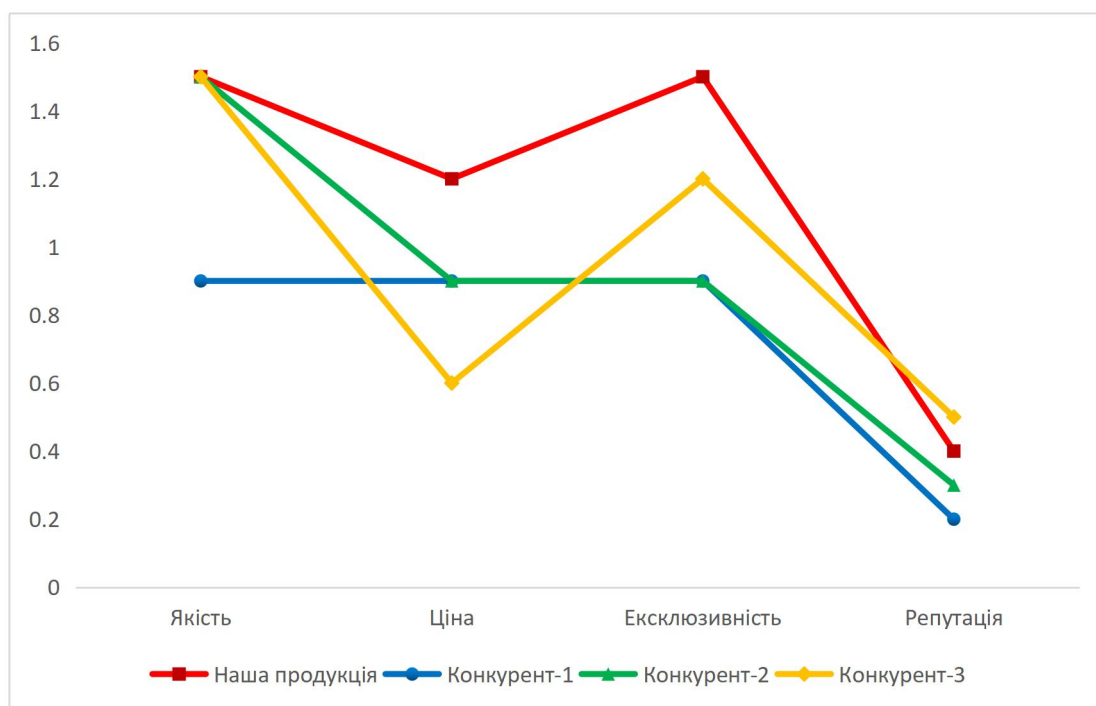


Рисунок 4. Графік порівняння характеристик бізнесів

Отже, ключовими факторами успіху проекту є ціна та ексклюзивність продукції. Більше того, продукція не поступається якістю своїм конкурентам, а іноді її переважає її.

На основі спостережень було складено паспорт потенційного клієнта бізнесу.

Таблиця 14

Основні групи потенційних споживачів

Категорія споживачів	Потреби, що задовольняє продукція
Приватні/державні лабораторії	Надання послуг з імуногістохімічних досліджень в області раку молочної залози
Наукові товариства, інститути	Проведення досліджень в області онкологічних захворювань
Виробники тест-систем	Виробництво чи покращення тест-систем

Таблиця 15

Запл. обсяг	Лютий 2024	Березень 2024	Квітень 2024	Травень 2024	Червень 2024	Липень 2024	Серпень 2024	Вересень 2024	Жовтень 2024	Листопад 2024	Грудень 2024	Січень 2025
	100	110	120	130	150	170	200	230	270	280	320	351

Таблиця 16

Паспорт потенційного клієнта

Характеристика	значення	примітки
Організаційно-правова форма	Приватна/державна/некомерційна лабораторія; ТОВ, АТ	
Класифікація	Малий/середній обсяг виробництва	
Розташування	Великі міста України - Київ, Львів, Дніпро, Одеса тощо.	
Вид продукту, який потрібен даному споживачеві	Моноклональні антитіла чутливі до антигенів раку молочної залози	
Призначення придбаної розробки	Для досліджень та тестувань в галузі діагностики раку молочної залози	Здебільшого, імуногістохімічний аналіз

Продовження таблиці 16

Кваліфікація персоналу підприємства	Службовці, спеціалісти та керівники	Менеджери відділу досліджень, біотехнологи, керівництво лабораторії
Потенційний обсяг споживання розробки	6-7 літрів	*100-130 флаконів по 60 мл
Хто приймає рішення про придбання розробки	Представник лабораторії, який відповідає за закупівлю матеріалів	Узагальнена характеристика працівника: висока кваліфікація в галузі медицини або науки, досвід у лабораторних дослідженнях.

Розрахунок ціни за різними методами ціноутворення.

Витратний метод. Для розрахунку витратним методом необхідно знати очікувану собівартість товару.

Очікувана собівартість товару - це сума всіх витрат, пов'язаних з виробництвом одиниці товару. Цей розрахунок включає в себе витрати на сировину, працю, енергію, амортизацію обладнання та інші витрати.

$$\text{Очікувана собівартість} = \frac{B1+B2+B3+B4}{\text{Кількість вироблених одиниць}}$$

де B1 - вартість сировини, матеріалів, ресурсів;

B2 - вартість праці;

B3 - амортизація обладнання;

B4 - інші витрати.

Необхідно розрахувати показники B1-B4.

В таблицях нижче представлено розрахунки забезпеченості проекту основними (B3), оборотними (B1) засобами та трудовими ресурсами (B2).

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		94

Забезпеченість проекту основними засобами

Місце ОЗ у технологічному процесі	Назва ОЗ та кількість одиниць	Повна початкова вартість ОЗ, грн	Плановий період експлуатації ОЗ	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування придбання
Зберігання замороженої мієломної тканини	Посудина Дьюара (8 шт)	10 360	20 років	Spectrolab	Власні заощадження, позика, гранти, інвестиції, програми підтримки малих бізнесів
Культивування клітин на різних етапах виробничого процесу	Інкубатор (6 шт)	17512	10 років	Steinberg Systems	
Визначення концентрації антитіл в крові мишей	Флуориметр (1 шт)	22526	10 років	Bimedis	
Культивування гібридом	Біореактор (1 шт)	734650	22 роки	Unilab	
Скринінг та контроль якості продукції	Мікроскоп (4 шт)	23898	15 років	MICROmed	
Очищення моноклональних антитіл	Хроматограф (2 шт)	188034	17 років	THERMO FISHER SCIENTIFIC	
Контроль якості очищення моноклональних антитіл	Спектрофотометр (2 шт)	75000	15 років	Лабораторний маркет	
Фасування та пакування продукції	Фасувально-пакувальний апарат (1 шт)	124 000	18 років	PACKHOUSE MACHINERY	

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
------	------	----------	--------	------

БФ2107.23.40.001ПЗ

Лист

95

Продовження таблиці 17

Маркування продукції	Маркувальний апарат (1 шт)	63000	10 років	PACKHOUSE MACHINERY	
Стерилізація посуду, інструментів, матеріалів	Автоклав (2 шт)	74800	20 років	Spectrolab	
Центрифугування зразків на різних етапах виробничого процесу	Центрифуга (6 шт)	9387	10 років	MICROmed	
Стерилізація готової продукції	Система вакуумної фільтрації (1 шт)	74100	18 років	Термолаб	
Всього: 1 987 575 грн					
Амортизація: 73 437 грн					

Таблиця 18

Забезпеченість проекту оборотними фондами

Група ОбФ	Назва	Норма витрат на рік	Ціна, грн/од	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Сировина і матеріали	Сировина				
	RPMI 1640 з L-глутаміном	5 шт	815 грн	Thermo Fisher Scientific	Гранти, інвестиції
	Пеніцилін-стрептоміцин	3,5 шт	1053 грн		
	Ultrosor G	4 шт	15234 грн		

Продовження таблиці 18

	ПЕГ	1 шт	1646 грн		
	ГАТ	5 шт	2069 грн		
	FBS	0,5 шт	12716 грн		
	Hybry-Max	6 шт	6358 грн		
	Загалом: 125 194 грн				
	Матеріали				
	Скляні флакони	2431 шт	12,5 грн	Labstar, MICROmed	Гранти, інвестиції
	Піпетки	500 шт	0,68 грн		
	Чашки Петрі	350 шт	50 грн		
	Колби	400 шт	56 грн		
	Загалом: 40 240 грн				
Електроенергія, водопостачання і водовідведення	Електроенергія	124,4 МВт-год	2706 грн	Київтеплоенерго, Київводоканал	Гранти, прибуток, одержаний від попередньої діяльності
	Водопостачання	3100 куб.м	15 грн грн		
	Водовідведення	4127 куб.м	20 грн		
	Загалом: 465 666 грн				

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
------	------	----------	--------	------

БФ2107.23.40.001ПЗ

Лист

97

Продовження таблиці 18

Напівфбарикати	Напівфабрикати				
	Мієломна тканина	7 шт	17000 грн	TissueArray	Гранти, інвестиції
	Миші лінії Balb/c	560	50 грн	БіоМодельСервіс	
	Загалом: 147 000 грн				
Всього: 631 635					

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата

БФ2107.23.40.001ПЗ

Лист

98

Забезпеченість проекту трудовими ресурсами

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність за списком на посаді	Кваліфікаційні вимоги	Плановий рівень Заробітної плати, грн	Джерело фінансування ФОП
Робочі основні	Біотехнолог	6	Висока	18000	Прибуток, одержаний від попередньої діяльності
Робочі допоміжні	Лаборант-біотехнолог	2	Висока	10000	
	Електрик	1	Середня	10000	
	Прибиральник	3	Низька	7000	
Спеціалісти	Аналітик-біохімік	2	Висока	12000	
	Спеціаліст з контролю якості	2	Висока	15000	
Молодший персонал обслуговування	Асистент з виробництва	4	Висока	10000	
	Оператор з технічного обслуговування	2	Висока	10000	
Керівники	Директор виробництва	1	Висока	30000	
	Директор відділу маркетингу	1	Висока	25000	
	Фінансовий директор	1	Висока	25000	
Всього	Осіб на посаді	Плановані видатки на оплату праці, грн			
	25	353 000			

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
------	------	----------	--------	------

На основі розрахунків можна вирахувати собівартість продукту:

$$\text{Очікувана собівартість (C)} = \frac{B1+B2+B3+B4}{\text{Кількість вироблених одиниць}} =$$

$$\frac{(631\,635+353\,000+73\,437)+45\%}{2431} = 631 \text{ грн.}$$

Ціна на товар розраховується за витратним методом:

$$Ц = C + \text{фіксований відсоток прибутку (від собівартості) [грн/од]},$$

де Ц – прогнозована ціна товару, грн/од,

C – розрахована очікувана собівартість товару, грн/од.

Таким чином:

$$Ц = 631 + 0,3*631 = 820 \text{ грн/од.}$$

Інший метод розрахунку ціни - метод на основі поточних цін або конкурентний метод. Непрямі аналоги товарів у різних конкурентів коштують 1210 грн/од та 1240 грн/од. Середній показник ціни складає 1225 грн. Оскільки цей метод розрахунку вважається оптимальним для стартап-проектів, то приймаємо ціну продукту за 1225 грн/од.

Таблиця 20

Проектні ціни продажу діагностичних моноклональних антитіл

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналог 1		Аналог 2	
	Кількість, од.	Ціна, грн/од	Кількість, од.	Ціна, грн/од	Кількість, од.	Ціна, грн/од
Діагностичні моноклональні антитіла чутливі до антигенів раку молочної залози	100	1225	500	1210	300	1240

Для будь-якого бізнесу необхідно знати час виходу в нуль.

Розрахунок точки беззбитковості проводиться за наступною формулою:

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		100

Точка беззбитковості (ТБЗ) = постійні витрати/(ціна - собівартість за од. продукції)

Постійні витрати - $353\,000 \cdot 12 + 73\,437 = 4\,309\,437$

Змінні витрати - $631\,635 + 394\,682 = 1\,026\,317$

ТБЗ = $4\,309\,437 / (1225 - 631) = 7254$ од.

ТБЗ у грошовому еквіваленті (виручка) = $7254 \cdot 1425 = 10\,336\,950$ грн.

Як видно з розрахунків, для того, щоби вийти в нуль, необхідно виготовити 7254 одиниць продукції за рік, а прибуток почне надходити після продажі продукції на суму 10 336 950 грн.

Таблиця 21

Техніко-економічні показники проекту

Показники	Одиниця виміру	Умовне позначення, формула розрахунку
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	од	$V=2431$
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком	Осіб	$Ч_{сп}=25$
3. у тому числі - основних - допоміжних - інженерно-технічного персоналу	Осіб	25
4. Середньорічний виробіток робітника	од/особу	$ППс.р.=$ $V/Ч_{сп}=2431/25=97$
5. Капіталовкладення у проект: всього Грн. $K= ОФ+ОбК$	Грн.	$K = ОФ+ОбК=$ $= 1\,987\,575 + 631\,635 =$ $= 2\,619\,210$
6. Повна собівартість :	Грн. Грн./од	$C=A+ОбК =$ $= 73\,437 + 631\,635 = 705\,072$ $C=631$

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		101

Продовження таблиці 21

7. Відносний прибуток	грн/од	$P = \frac{C}{C} = 1225 - 631 = 594$
8. Рентабельність	%	$R = \left(\frac{P}{C}\right) \times 100 = \frac{594}{631} \times 100 = 94,1$
9. Період повернення капіталовкладень	років	$T_{пов} = \frac{K}{(P \cdot V)} = \frac{2\,619\,210}{(594 \cdot 2431)} = 1,8$
10. Фондовіддача виробничих фондів	Грн./грн	$\Phi B = \frac{(C \cdot V)}{O\Phi} = \frac{(1225 \cdot 2431)}{1\,987\,575} = 1,5$
11. Фондоємкість	грн/грн	$\Phi C = \frac{1}{\Phi B} = \frac{1}{1,5} = 0,6$
12. Продуктивність праці	грн/особу	$\Pi\Pi = \frac{V}{(C_{сп} \cdot T)} = \frac{2431}{(25 \cdot 1)} = 97,2$
13. Коефіцієнт економічної ефективності		$E = \frac{P \cdot V}{K} = \frac{594 \cdot 2431}{2\,619\,210} = 0,55$

Таблиця 22

Концепція бізнес-моделі проекту

Ключові партнери: <i>MICROmed</i> <i>Labstar</i> <i>Unilab</i> <i>Nikolab</i> <i>Esculab</i> <i>CSDlab</i> <i>Dila</i> <i>Unilab</i>	Місце у ланцюжку цінності: <i>Операції, маркетинг та збут</i>	Ключові фактори успіху: <i>Ціна, ексклюзивність, якість</i>	Групи споживачів: <i>Приватні/державні лабораторії, наукові товариства, інститути, виробники тест-систем</i>	Проблеми споживачів, що вирішує розробка: <i>Рання діагностика раку молочної залози, моніторинг терапії, наукові дослідження, виробництво тест-систем</i>
	Ключові ресурси: <i>Трудові ресурси, сировина та матеріали, електроенергія</i>		Канали збуту: <i>Оптові продажі, тендери та конкурси, виставки і конференції</i>	
Структура собівартості <i>Змінні витрати: 1 026 317</i> <i>Постійні витрати: 4 309 437</i>		Очікувані потоки доходу <i>2 997 975 грн за перший рік виробництва</i>		

Карта бізнес-процесів виконання стартап-проекту

Стадія реалізації стартап-проекту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Орієнтовна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат, грн
Розробка ідеї стартапу	Розробка та впровадження проектно-технічної документації	Трудові ресурси	5 місяців	75 000
Реалізація ідеї	Вибір та придбання обладнання, укладання угод з постачальниками сировини та матеріалів, проведення будівельних робіт.	Трудові ресурси	6 місяці	4 000 000
Впровадження у виробництво	Рекрутинг персоналу, встановлення обладнання, пошук посередників	Трудові ресурси	3 місяці	600 000
Масова реалізація	Запуск, досягнення бажаної потужності, пошук посередників, реклама	Трудові ресурси, сировина, матеріали, електроенергія	10 місяців	10 000 000

Ризики інноваційної розробки

Назва процесу / стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Розробка та впровадження проектно-технічної документації	Помилки у проектно-технічній документації	Недотримання строків під час розробки документації
Реалізація ідеї	Вибір та придбання обладнання, укладання угод з постачальниками сировини та матеріалів, проведення будівельних робіт.	Довготривала та/або дороговартісна доставка	Помилки в укладених договорах з постачальниками
Впровадження у виробництво	Рекрутинг персоналу, встановлення обладнання, пошук посередників	Нестача кваліфікованих кадрів, неправильно встановлене обладнання, непрогнозовані ринкові зміни	Неефективне управління проектом, Внутрішні конфлікти
Масова реалізація	Запуск, досягнення бажаної потужності, пошук посередників, реклама	Додаткові витрати на дороговартісні послуги посередників, нестача коштів	Передчасний вихід обладнання з ладу в результаті неправильного його використання або непередбачуваного навантаження

Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
Демографічний ризик, R1	Нестача кваліфікованих кадрів	Високий	Високий
Політико-законодавчий ризик, R2	Непередбачувані зміни в економіці	Високий	Високий
Податковий ризик, R3	Зростання податків для підприємців	Середній	Високий
Транспортний ризик, R4	Тривала затримка поставки сировин та/або матеріалів	Середній	Високий
Інфляційний ризик, R5	Підвищення цін на сировини, матеріали, послуги з-за кордону	Середній	Середній
Управлінський ризик, R6	Неефективне управління виробництвом	Низький	Високий

Матриця оцінки ризиків представлена нижче:

Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат		За ймовірністю настання ризиків		
Критерій ризику	Числове значення	Низька імовірність	Середня імовірність	Висока імовірність
		1	2	3
Високий рівень впливу	3	R6 3*	R3, R4 6*	R1, R2 9*
Середній рівень впливу	2	2*	R5 4*	6*
Низький рівень впливу	1	1*	2*	3*

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		105

Як видно з таблиці, найзначнішими ризиками є R1, R2, R3 та R4. Інші ризики потрапили в жовту зону. Таким чином, доцільно буде зробити план заходів управління цими ризиками (табл.27).

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		106

План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання/ застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Нестача кваліфікованих кадрів	Передача ризику: Укладення договорів з фахівцями та компаніями, які спеціалізуються на наданні послуг у сфері найму та управління персоналом.	Директор відділу маркетингу	Впровадження у виробництво та масова реалізація	Забезпечення високої якості роботи завдяки спеціалістам із необхідними навичками. Зменшення часу, необхідного для пошуку та відбору кваліфікованих кадрів.
Непередбачувані зміни в економіці	Попередження (скорочення) ризику: Стратегічне планування діяльності, аналіз та моніторинг економічного середовища, прогнозування можливих змін та розробка планів адаптації.	Фінансовий директор	Реалізація ідеї, впровадження у виробництво та масова реалізація.	Адаптація до змін в економіці завчасно та зменшення негативного впливу. Збільшення конкурентоспроможності завдяки швидкій реакції на ринкові тенденції.

Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
------	------	----------	--------	------

Продовження таблиці 27

Зростання податків для підприємців	Передача ризику (Страхування): Укладення страхових договорів, які покривають можливі фінансові втрати внаслідок зростання податків.	Фінансовий директор	Масова реалізація	Зменшення фінансових втрат завдяки страховим виплатам при зростанні податків. Забезпечення фінансової стабільності підприємства в умовах фіскального тиску.
Тривала затримка поставки сировини та/або матеріалів	Попередження (скорочення) ризику: Укладення договорів з надійними постачальниками, резервування сировини на складі, аналіз альтернативних джерел постачання.	Директор виробництва	Впровадження у виробництво	Забезпечення стабільного виробництва завдяки своєчасним поставкам. Зниження ризику перерв у виробництві та збереження репутації серед клієнтів.
Підвищення цін на сировину, матеріали, послуги з-за кордону	Передача ризику (Лізинг): Лізинг обладнання та матеріалів від постачальників із фіксованими цінами на тривалий період.	Директор виробництва	Масова реалізація	Зниження фінансового тиску завдяки фіксованим цінам на лізинговане обладнання та матеріали. Забезпечення конкурентоспроможності завдяки стабільним витратам.
Неефективне управління виробництвом	Попередження (скорочення) ризику: Впровадження систем ефективного управління виробництвом, навчання персоналу, проведення аудитів та аналізу ефективності.	Директор виробництва	Впровадження у виробництво та масова реалізація	Підвищення ефективності виробництва через впровадження систем ефективного управління. Зменшення витрат та вдосконалення виробничих процесів.

Висновки до розділу 6

На основі аналізу факторів зовнішнього та зовнішнього оперативного середовищ визначено основних конкурентів проекту: Діапроф-мед, ВІПРОТЕСТ, БІОФАРМА та Хема. За методом Шонфільда визначено ключові фактори успіху проекту - ціна та ексклюзивність продукції. Розроблено паспорт потенційного споживача та розраховано очікувану собівартість одиниці продукції, яка склала 631 грн. Конкурентним методом визначено ціну реалізації продукції, вона склала 1225 грн/од. Точка безбитковості склала 7254 одиниць продукції за рік, що в грошовому еквіваленті відповідає 10 336 950 грн. Також розраховано техніко-економічні показники проекту, зокрема, період повернення капіталовкладень, який становить 1,8 років та рентабельність проекту, яка становить 94,1%. Розроблено систему оцінки ризиків стартап-проекту та план заходів з управління цими ризиками.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		109

ВИСНОВКИ

Магістерська дисертація присвячена проектуванню виробництва моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної залози.

На основі аналізу літературних джерел було встановлено оптимальний алгоритм отримання моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології. Було також досліджено основні нюанси самої гібридомної технології, моноклональних антитіл та методів діагностики раку МЗ.

Розроблено та обґрунтовано технологічну схему виробництва. Показано, що вона відповідає вимогам та в перспективі може забезпечити кількість продукції, здатної задовольнити потреби 30% споживачів у країні.

Спроектвана схема компоновки та обладнання приміщень, а також схема потоків сировини та персоналу. Доведено відповідність обох схем стандартам GMP та внутрішньому регламенту виробництва.

Розроблено систему оцінки якості виробництва, яка включає перевірку сировини, матеріалів, напівпродуктів і готової продукції та професійних якостей персоналу. Ефективність системи була визнана на основі внутрішніх експертних оцінок, які підтвердили високий рівень відповідності стандартам.

Розроблено систему оцінки виробничих ризиків. На основі методу експертної оцінки складено матрицю ризиків та розроблено план управління ними, в залежності від впливу ризику на виробництво. Встановлено контрольні точки під час стадій та підстадій виробництва та розроблено систему контролю для попередження ризикованих ситуацій. На основі проведеного аналізу, система визнана гнучкою та функціональною.

Розроблено стартап-проект. Визначено ключові фактори успіху проекту - ціна, ексклюзивність та якість продукції. Розроблено паспорт потенційного споживача продукції та розраховано основні економічні

					БФ2107.23.40.001ПЗ			
Вим	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розробила	Коблевська				Висновки	Літ.	Лист	Листів
Перевірів	Бесараб						110	118
Реценз.						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Н. Контр.						ФБМІ БФ-21мп		
Затвердив								

показники. Показано, що собівартість одиниці продукції склала 631 грн, а ціна реалізації - 1225 грн, точка безбитковості - 7254 од. (10 336 950 грн в грошовому еквіваленті), період окупності склав - 1,8 роки, а рентабельність - 94,1%. Також було проведено оцінку ризиків інноваційної розробки та складено план управління ними.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		111

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cancer today. Global Cancer Observatory. URL: <https://gco.iarc.fr>.
2. Coughlin S. S. Epidemiology of breast cancer in women. Breast cancer metastasis and drug resistance. 2019. P. 9–29. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31456177/>.
3. Бондаренко І., Завізгон В., Асєєв О. Рак молочної залози. Дніпро : Дніпропетр. держ. мед. акад., 2011. 58 с.
4. Waks A. G., Winer E. P. Breast cancer treatment. Jama. 2019. Vol. 321, no. 3. P. 288. URL: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323> (date of access: 08.01.2024).
5. Shah R. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. World journal of clinical oncology. 2014. Vol. 5, no. 3. P. 283. URL: <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.283> (date of access: 08.01.2024).
6. Breast cancer diagnosis: imaging techniques and biochemical markers / S. H. Jafari et al. Journal of cellular physiology. 2018. Vol. 233, no. 7. P. 5200–5213. URL: <https://doi.org/10.1002/jcp.26379> (date of access: 08.01.2024).
7. Аліна Олександрівна К. Місце мамографії при ранній діагностиці раку молочної залози : дис. ... канд. мед. наук. Суми, 2018.
8. Comparison of FDG PET and SPECT for detection of bone metastases in breast cancer / T. Uematsu et al. American journal of roentgenology. 2005. Vol. 184, no. 4. P. 1266–1273. URL: <https://doi.org/10.2214/ajr.184.4.01841266> (date of access: 08.01.2024).
9. Zaha D. C. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. World journal of clinical oncology. 2016. Vol. 5, no. 3. P. 382. URL: <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.382> (date of access: 08.01.2024).

					БФ2107.23.40.001ПЗ		
<i>Вим</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>			
<i>Розробила</i>	<i>Коблевська</i>				<i>Літ.</i>	<i>Лист</i>	<i>Листів</i>
<i>Перевірила</i>	<i>Бесараб</i>					112	118
<i>Реценз.</i>					<i>Список використаної літератури</i> <i>КПІ ім. Ігоря Сікорського</i> <i>ФБМІ БФ-21мп</i>		
<i>Н. Контр.</i>							
<i>Затвердив</i>							

10. Ozawa H. Principles and basics of immunohistochemistry. *Folia pharmacologica japonica*. 2019. Vol. 154, no. 4. P. 156–164. URL: <https://doi.org/10.1254/fpj.154.156> (date of access: 08.01.2024).
11. Criscitiello C. Tumor-Associated antigens in breast cancer. *Breast care*. 2012. Vol. 7, no. 4. P. 262–266. URL: <https://doi.org/10.1159/000342164> (date of access: 08.01.2024).
12. Monoclonal antibodies for immunohistochemical diagnosis of breast cancer / A. Turgimbayeva et al. *The open biotechnology journal*. 2021. Vol. 15, no. 1. P. 157–163. URL: <https://doi.org/10.2174/1874070702115010157> (date of access: 08.01.2024).
13. Sajid K., Chaouachi K., Mahmood R. Hookah smoking and cancer: carcinoembryonic antigen (CEA) levels in exclusive/ever hookah smokers. *Harm reduction journal*. 2008. Vol. 5, no. 1. P. 19. URL: <https://doi.org/10.1186/1477-7517-5-19> (date of access: 08.01.2024).
14. Вершигора А. Ю., Пастер Є. У., Колибо Д. В. Імунологія. Київ : Вища шк., 2005. 599 с.
15. Kaiser G. *Microbiology*. Cantonsville : LibreTexts, 2023. 698 p.
16. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases / L. L. Lu et al. *Nature reviews immunology*. 2017. Vol. 18, no. 1. P. 46–61. URL: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.106> (date of access: 08.01.2024).
17. Герасименко В. Біотехнологія. Київ : Фірма "ІНКОС", 2006. 647 с.
18. Recombinant monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis / E. N. Pina et al. *Biochemistry (moscow)*. 2018. Vol. 83, no. 1. P. 1–12. URL: <https://doi.org/10.1134/s0006297918010017> (date of access: 08.01.2024).
19. Paduano F. *Antibodies*. Antibodies.com | Antibodies, Proteins, and ELISA Kits. URL: <https://www.antibodies.com/recombinant-antibodies> (date of access: 08.01.2024).
20. Bariogic B., Raber M., Schumann J. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer research*. 1983. No. 43. P. 3982–3997.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		113

21. ELISA assay employing epitope-specific monoclonal antibodies to quantify circulating HER2 with potential application in monitoring cancer patients undergoing therapy with trastuzumab / V. Agnolon et al. Scientific reports. 2020. Vol. 10, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59630-y> (date of access: 08.01.2024).
22. Fowler S. J. Use of monoclonal antibodies for western blotting with enhanced chemiluminescent detection. Methods in molecular biology. 1995. P. 115–127.
23. National Research Council (US) Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. Monoclonal antibody production. Washington : National Academies Press, 1999. 57 p.
24. Immunohistochemical markers for distinguishing metastatic breast carcinoma from other common malignancies: update and revisit / Q. Ding et al. Seminars in diagnostic pathology. 2022. URL: <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2022.04.002> (date of access: 08.01.2024).
25. Nivolumab versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma / R. J. Motzer et al. New england journal of medicine. 2015. Vol. 373, no. 19. P. 1803–1813. URL: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1510665> (date of access: 08.01.2024).
26. Dunleavy K. The top 20 pharma companies by 2022 revenue. <https://www.fiercepharma.com/pharma/top-20-pharma-companies-2022-revenue>. URL: <https://www.fiercepharma.com/pharma/top-20-pharma-companies-2022-revenue>.
27. Monoclonal antibodies: the greatest resource to treat multiple myeloma / F. De Luca et al. International journal of molecular sciences. 2023. Vol. 24, no. 4. P. 3136. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24043136> (date of access: 08.01.2024).
28. Sanofi. Summary of product characteristics - sarclisa. Sanofi, 2020. 41 p.
29. Sanofi. Sanofi : FDA approves Sarclisa® (isatuximab-irfc) for patients with relapsed refractory multiple myeloma. Sanofi: global healthcare and pharmaceutical company. URL: <https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2020/2020-03-02-18-51-16-1993727> (date of access: 08.01.2024).

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		114

30. Progesterone receptor monoclonal antibody (alpha PR6) (MA1-411). Thermo Fisher Scientific - DE. URL: <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Progesterone-Receptor-Antibody-clone-Alpha-PR6-Monoclonal/MA1-411> (date of access: 08.01.2024).
31. Anti-PGR rabbit monoclonal antibody [clone: SP42]. VWR. URL: <https://ie.vwr.com/store/product/15674431/anti-pgr-rabbit-monoclonal-antibody-clone-sp42> (date of access: 08.01.2024).
32. Progesterone receptor (marker of progestin dependence) antibody - clone PR484 | 5241. NeoBiotechnologies. URL: <https://www.neobiotechnologies.com/product/progesterone-receptor-marker-of-progestin-dependence/> (date of access: 08.01.2024).
33. CONFIRM anti-progesterone receptor (PR) (1E2) rabbit monoclonal primary antibody. Diagnostics.Roche. URL: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/lab/progesterone-receptor-1e2-confirm-rtd000801.html> (date of access: 08.01.2024).
34. Progesterone receptor antibody. GenomeMe Inc. URL: <https://www.genomeme.ca/docs/datasheets/Progesterone%20Receptor%20IHC%20751%20CE%20Mouse.pdf> (date of access: 08.01.2024).
35. Список компаній - Антитіла моноклональні і поліклональні - Україна. Kompas. URL: <https://ua.kompass.com/a/антитіла-моноклональні-і-поліклональні/2309009/>.
36. DiaProph Med. Catalog. Діапроф-Мед. URL: <https://www.diaproph.com/catalog> (date of access: 08.01.2024).
37. Vitrotest. Антитіла. Vitrotest. URL: <https://vitrotest.ua/monoklonal-nii-antitiila.html> (дата звернення: 08.01.2024).
38. Biopharma. Препарати. Biopharma. URL: <https://biopharma.ua/ru/preparati>.
39. Costa R. L. B., Czerniecki B. J. Clinical development of immunotherapies for HER2+ breast cancer: a review of HER2-directed monoclonal antibodies and

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		115

- beyond. *Npj breast cancer*. 2020. Vol. 6, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41523-020-0153-3> (date of access: 08.01.2024).
40. Chiliza T. E. Antibody phage-displayed libraries derived from chicken immunoglobulin genes a source of highly specific diagnostic antibodies / : dissertation. 2008. URL: <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-07012008-080736/> (date of access: 08.01.2024).
41. Стерилізація медичних виробів та інструментів - методи, режими. Медична справа. URL: <https://medplatforma.com.ua/article/412-qqq-16-metodi-sterilzats-virobv-medichnogo-priznachennya>. (дата звернення: 08.01.2024).
42. Мандрика А. С. Енергоефективні технології. Суми : Сум. держ. ун-т, 2021. 330 с.
43. Hybridoma production protocol. euromabnet. EuroMAbNet: European Monoclonal Antibodies Network. URL: <https://www.euromabnet.com/protocols/hybridoma.php> (date of access: 08.01.2024).
44. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України від 21.02.2006 р. № 3447-IV : станом на 6 листоп. 2023 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text> (дата звернення: 08.01.2024).
45. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 2 / В. Close et al. *Laboratory animals*. 1997. Vol. 31, no. 1. P. 1–32. URL: <https://doi.org/10.1258/002367797780600297> (date of access: 08.01.2024).
46. Виробництво стерильних лікарських засобів. Good Manufacturing Practice. URL: <https://gmpua.com/World/Ukraine/GMPGuide2013/index3.html>.
47. Андреева Г. Т., Нагорна Н. О., Смойловська Г. П. Фармацевтична технологія. Запоріжжя : Запорізьс. держ. мед. ун-т, 2016. 72 с.
48. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів / уклад.: В. Поводзинський, В. Шибецький. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. 251 с.

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		116

49. Фармацевтична технологія : навч. посіб. / Г. П. СМОЙЛОВСЬКА та ін. Запоріжжя : ЗДМУ, 2017. 97 с.
50. Sogut I., Hatipoglu I., Serhatli M. Cryopreservation of spleen and lymph nodes as a source of mononuclear cells to be used for the development of monoclonal antibody producing hybridoma cells. *Cryo letters*. 2011. P. 266–274.
51. Liddell J. Immunization of mice for monoclonal antibody production. *Encyclopedia of life sciences*. 2002. P. 1–6.
52. Protocol for monoclonal antibody production. 2014.
53. Castro B. A. Monoclonal antibodies technology. protocols. Cuba.
54. Ward P., VandeBerg J., Clegg M. Monoclonal antibody production. National academy press. 1999. P. 1–46.
55. Goding J. Monoclonal antibodies: principles and practice. London : ACADEMIC PRESS LIMITED, 1996. 485 p.
56. Production and application of monoclonal antibody : конспект лекцій. INVERTIS UNIVERSITY BAREILLY, 2018.
57. Герасименко В. Біотехнологія. Київ : Фірма "ІНКОС", 2006. 647 с.
58. Impacts on product quality attributes of monoclonal antibodies produced in CHO cell bioreactor cultures during intentional mycoplasma contamination events / E. J. Fratz-Berilla et al. *Biotechnology and bioengineering*. 2020. Vol. 117, no. 9. P. 2802–2815. URL: <https://doi.org/10.1002/bit.27436> (date of access: 08.01.2024).
59. Breast cancer diagnosis: imaging techniques and biochemical markers / S. H. Jafari et al. *Journal of cellular physiology*. 2018. Vol. 233, no. 7. P. 5200–5213. URL: <https://doi.org/10.1002/jcp.26379> (date of access: 08.01.2024).
60. Zaha D. C. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World journal of clinical oncology*. 2016. Vol. 5, no. 3. P. 382. URL: <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.382> (date of access: 08.01.2024).
61. Criscitiello C. Tumor-Associated antigens in breast cancer. *Breast care*. 2012. Vol. 7, no. 4. P. 262–266. URL: <https://doi.org/10.1159/000342164> (date of access: 08.01.2024).

					БФ2107.23.40.001ПЗ	Лист
Изм.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата		117

62. Monoclonal antibodies for immunohistochemical diagnosis of breast cancer / A. Turgimbayeva et al. The open biotechnology journal. 2021. Vol. 15, no. 1. P. 157–163. URL: <https://doi.org/10.2174/1874070702115010157> (date of access: 08.01.2024).
63. Kaiser G. Microbiology. Cantonsville : LibreTexts, 2023. 698 p.
64. Immunohistochemical markers for distinguishing metastatic breast carcinoma from other common malignancies: update and revisit / Q. Ding et al. Seminars in diagnostic pathology. 2022. URL: <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2022.04.002> (date of access: 08.01.2024).
65. МКТП (12-2024). МКТП (12-2024). URL: <https://nice.nipo.gov.ua/class/good/5?page=25&per=15>. (дата звернення: 08.01.2024).
66. Магістерська дисертація за освітньо-професійною програмою: виконання, оформлення та захист : навч. посіб. / І. М. Астрелін та ін. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2019. 131 с.
67. Тесленок І. М., Перетокіна-Пічхая Н. В. Оцінка впливу факторів бізнес-середовища на підприємство сфери послуг з індивідуального пошиття одягу. Ефективна економіка. 2019. С. 1–6.
68. Які існують програми фінансової підтримки бізнесу?. Дія.Бізнес. URL: <https://business.diia.gov.ua/handbook/finansovij-menedzment/aki-isnuut-programi-finansovoi-pidtrimki-biznesu>.

**Опитувальник експерта для оцінки ризиків на виробництві
моноклональних антитіл специфічних до антигенів раку молочної
залози**

Ризик R1. Санітарна підготовка виробництва.

В результаті неправильного зберігання дезінфікуючих речовин або невірною їх співвідношення може виникнути ризик **хімічного** ураження при їх вдиханні або попаданні на шкіру чи слизові оболонки. **Мікробіологічне** ураження може виникнути в результаті недостатньої ефективності дезінфекції. Можливі відхилення в проведенні **технологічного** процесу через неправильне налаштування обладнання або несвоєчасний його огляд.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R2. Пре-процесінг.

Ризик **мікробіологічної** контамінації може виникнути в результаті недотримання правил асептики при роботі з антигенним розчином та матеріалами для фузії, а також при неправильних режимах стерилізації поживних середовищ. Ризик **технологічного** характеру пов'язаний з недотриманням параметрів центрифугування, пропорцій при приготуванні поживних середовищ та параметрів розморозки м'якшої тканини.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R3. Імунізація мишей.

Потенційний **мікробіологічний** ризик може бути спричинений неправильними умовами утримання лабораторних тварин і, як результат, їх контамінації, недотриманням правил асептики та антисептики при процесах імунізації та евтаназії. **Технологічні** ризики пов'язані з тими самими процесами і можуть виникнути в результаті введення неправильних доз імунізаційного розчину та препарату для евтаназії. **Хімічний ризик** можливий при недотриманні протоколу евтаназії і, як результат, попаданням препарату в організм людини.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R4. Фузія мієломних клітин та В-лімфоцитів.

Виникнення **мікробіологічних** ризиків в даному випадку може бути пов'язано з недотриманням правил асептики та антисептики при проведенні процедур. Ризики **технологічного** характеру можливі в результаті неправильних параметрів центрифугування.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R5. Селекція гібридом.

На цьому етапі можливий **технологічний** ризик, який може бути спричинений неправильними пропорціями доданих для селекції розчинів та поживних середовищ. Причиною **мікробіологічного** ризику може бути недотримання правил асептики при проведенні процесу селекції.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R6. Культивування гібридомних клітин.

Ризик у відхиленні **технологічного** процесу може існувати через неправильні параметри інкубації та частоту заміни поживного середовища, що також може стати причиною **мікробіологічної** контамінації, особливо при умові недотримання правил асептики.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R7. Скринінг культури отриманих клітин.

Технологічний ризик пов'язується з недотриманням методик електронної мікроскопії та ІФА. Ризик **мікробіологічної** контамінації присутній через можливі несанітарні умови аналізу.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R8. Культивування гібридом, що продукують необхідні моноклональні антитіла.

Можливі **технологічні** ризики при неправильно встановлених параметрах культивування в ферментері. Антисанітарні умови обладнання можуть призвести до **мікробіологічної** контамінації.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R9. Виділення та очищення моноклональних антитіл.

Технологічні ризики пов'язано з неправильними параметрами центрифугування при виділенні клітин з клітинної маси, неправильною технікою проведення хроматографії при очищенні та технікою спектрофотометрії та гель-фільтрації при контролі якості очищення.

Мікробіологічні ризики можуть виникати в результаті недотримання правил санітарної обробки обладнання, яке використовується в процесах вказаних вище.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R10. Пост-процесінг.

Мікробіологічні та технологічні ризики виникають в результаті недотримання режимів стерилізації готової продукції.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R11. Контроль якості.

Технологічні ризики виникають при неправильній техніці посіву відібраних зразків продукції та неправильно виконаній та/чи інтерпретованій електронній мікроскопії, що досліджує посіви зразків. **Мікробіологічне** ураження виникає в результаті недотримання умов асептики при роботі з посівним матеріалом та його культивуванні.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Ризик R12. Пакування, маркування та зберігання готової продукції.

Ризики **технологічного** характеру здебільшого можуть бути пов'язані з недотриманням алгоритмів та санітарних норм при фасуванні, неправильним, нечітким нанесенням написів на упаковку та нерегламентованим зберіганням продукції на складі. Ризики **мікробіологічної** контамінації виникають в результаті недостатньої дезінфекції устаткування та флаконів при фасуванні, пошкодження упаковки при пакуванні, маркуванні та зберіганні продукції.

У кожному рядку виберіть лише один варіант.

	Незначні наслідки	Помірні наслідки	Значні наслідки
Низька імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Середня імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Висока імовірність	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>