

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет медико-фармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«УДОСКОНАЛЕННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ
ГЕПАРИНУ»**

Виконав: здобувач вищої освіти групи БТ622(3,10д)
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Біотехнологія
Богдан БЕЗРУК

Керівник: Професор закладу вищої освіти кафедри
біотехнології, д.фарм.н, проф. Наталя ХОХЛЕНКОВА

Рецензент: Начальник сектору технологічних досліджень
відділу фармацевтичної розробки ТОВ «БІОЛІК ФАРМА»
к.фарм.н., с.н.с. Лариса СІДЕНКО

Харків – 2026 рік

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці технології біотехнологічного виробництва субстанції гепарину натрію з використанням штаму *Escherichia coli* K5. Обґрунтовано доцільність переходу від традиційної технології екстракції гепарину з тваринної сировини до мікробного синтезу гепарозану. Визначено оптимальний склад гліцерин-вмісного поживного середовища та параметри процесу ферментації, що забезпечують високий вихід цільового продукту. Виконано продуктивний розрахунок та складено матеріальний баланс на промислову серію об'ємом 10 м³ культуральної рідини. Розроблено технологічну схему виробництва. Здійснено вибір основного технологічного обладнання. Визначено критичні точки контролю якості процесу та проведено екологічну оцінку технології з рекомендаціями щодо поводження з відходами.

Ключові слова: епарин, гепарозан, *Escherichia coli* K5, біотехнологічне виробництво, ферментація, матеріальний баланс, субстанція.

ANNOTATION

The qualification work is devoted to the development of a technology for the biotechnological production of heparin sodium substance using the *Escherichia coli* K5 strain. The feasibility of transitioning from the traditional extraction of heparin from animal raw materials to the microbial synthesis of heparosan has been substantiated. The optimal composition of a chemically defined glycerol-based culture medium and the parameters of the fermentation process ensuring a high yield of the target product have been determined. A product calculation has been performed and a material balance has been compiled for an industrial batch with a volume of 10 m³ of culture broth. A technological scheme for the production has been developed. The selection of the main technological equipment has been carried out. Critical quality control points of the process have been identified, and an environmental assessment of the technology with recommendations for waste management has been conducted.

Keywords: heparin, heparosan, *Escherichia coli* K5, biotechnological production, fermentation, material balance, active pharmaceutical ingredient.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	6
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	20
2.1 Характеристика готового продукту.....	20
2.2 Характеристика біологічного об'єкту.....	23
2.3 Характеристика сировини.....	25
2.4 Біосинтез цільового продукту.....	30
3 Технологічна частина.....	33
3.1 Розрахунок матеріального балансу.....	33
3.2 Розрахунок і вибір технологічного обладнання	39
3.3 Опис технологічного процесу.....	46
3.4 Схеми виробництва.....	55
3.5 Критичні параметри виробництва	57
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	59
Висновок.....	61
Список використаної літератури.....	63
Додатки.....	68

					<i>162.01.01.00 000 ПЗ</i>			
<i>Змн..</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Удосконалення виробництва субстанції гепарину Пояснювальна записка</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>	<i>Безрук</i>					2	70	
<i>Перевірив</i>	<i>Хохленкова</i>							
<i>Рецензент.</i>						<i>НФаУ</i>		
<i>Затвердив</i>	<i>Хохленкова</i>					<i>Кафедра біотехнології</i>		

ВСТУП

Актуальність теми. Гепарин залишається одним із найбільш затребуваних антикоагулянтів у сучасній медицині. Він широко застосовується при профілактиці та лікуванні тромбозів, у кардіохірургії, гемодіалізі, а також у військовій медицині при наданні допомоги пораненим. Незважаючи на появу низькомолекулярних гепаринів та синтетичних аналогів, нефракціонований гепарин зберігає своє ключове значення в клінічній практиці, особливо в умовах, що потребують швидкого та контрольованого антикоагулянтного ефекту.

Традиційне виробництво гепарину базується на екстракції з тваринної сировини - переважно зі слизової оболонки кишківника свиней. Такий підхід має низку суттєвих недоліків: ризик передачі пріонних інфекцій, залежність від епідеміологічної ситуації в тваринництві (зокрема, спалахи африканської чуми свиней), можливість фальсифікації сировини (як це сталося під час скандалу з надсульфатованим хондроїтин сульфатом у 2008 році), а також високі логістичні ризики через зосередження виробництва сировини в окремих країнах. У контексті України ці проблеми посилюються необхідністю імпортозаміщення критично важливих лікарських засобів та забезпечення національної лікарської безпеки.

Біотехнологічне виробництво гепарину на основі мікробного синтезу гепарозану з подальшою ензиматичною модифікацією є перспективним напрямком, що дозволяє уникнути більшості ризиків, притаманних тваринному виробництву. Використання штаму *Escherichia coli* K5 як продуцента гепарозану дає можливість контролювати якість продукту на молекулярному рівні, забезпечувати відтворюваність процесу та зменшувати залежність від зовнішніх постачальників сировини. Організація такого виробництва на базі вітчизняного фармацевтичного підприємства, наприклад

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		3

ТОВ «Фармацевтична фірма «Дарниця», є актуальним завданням, що відповідає стратегії розвитку фармацевтичної промисловості України та курсу на імпортозаміщення високотехнологічних лікарських засобів.

Мета роботи - обґрунтування та розробка технологічної схеми біотехнологічного виробництва субстанції гепарину натрію з використанням штаму *Escherichia coli* K5.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні завдання:

1. Провести аналіз науково-технічної літератури щодо біологічних особливостей штаму *Escherichia coli* K5 та механізмів біосинтезу гепарозану.
2. Обґрунтувати склад поживного середовища та параметри процесу ферментації, що забезпечують високий вихід гепарозану.
3. Виконати розрахунок матеріального балансу виробництва на промислову серію.
4. Здійснити вибір та розрахунок основного і допоміжного технологічного обладнання.
5. Розробити технологічну та апаратурну схеми виробництва.
6. Визначити критичні точки контролю якості процесу та готового продукту.
7. Провести екологічну оцінку запропонованої технології та розробити рекомендації щодо поводження з відходами виробництва.

Об'єктом роботи є технологічний процес біотехнологічного виробництва субстанції гепарину натрію, що включає стадії приготування середовища, ферментації, виділення, очищення та сушіння гепарозану.

Предметом роботи є параметри біосинтезу гепарозану штамом *E. coli* K5, матеріальний баланс процесу, склад технологічного обладнання та система контролю якості виробництва.

Методи. У роботі використано аналітичні, системні, розрахункові та графічні методи дослідження. При обґрунтуванні параметрів ферментації та

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		4

складу середовища застосовано методи аналізу науково-технічної літератури та патентної інформації. Матеріальний баланс складено з використанням методів продуктового розрахунку біотехнологічних виробництв. Вибір обладнання здійснено на підставі аналізу технічних характеристик апаратів та розрахунку їх необхідної кількості.

Практичне значення отриманих результатів. Практичне значення роботи полягає у розробці технологічних рішень, що можуть бути використані для організації промислового виробництва субстанції гепарину натрію біотехнологічним методом на вітчизняних фармацевтичних підприємствах. У роботі обґрунтовано склад поживного середовища, розраховано матеріальний баланс на серію 10 м³ культуральної рідини та визначено перелік основного технологічного обладнання. Отримані результати можуть бути використані при модернізації існуючих або створенні нових біотехнологічних виробництв антикоагулянтних засобів в Україні.

Окремі результати роботи представлені на XXXII міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів (15-17 квітня 2026 р., м. Харків). та опубліковані в збірці тез (додаток).

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		5

1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1 Будова та властивості гепарину

Гепарин – природний глікозаміноглікан (ГАГ), високо сульфатована лінійна полісахаридна сполука, що складається з повторюваних дисахаридних одиниць – уронової кислоти (переважно L-ідуронової або D-глюкуронової) та D-глюкозаміну [10, 15].

Дискусії щодо встановлення точної структури гепарину тривали з 1920-х років (рис. 1.1). Гепарин вперше був виявлений в екстрактах тканин тварин на початку 20 ст. Джей Маклін виявив антикоагулянтний ефект гепарину у печінці собак у 1916 р. Пізніше Хауелл і Холт у 1922 р. назвали його «гепарином», і він став ключовим у медичній практиці до 1930-х років завдяки досягненням у методах очищення. До 1940-х років було доведено, що гепарин складається із залишків уронових кислот та аміноцукрів із високим вмістом ефірних сульфатних груп, а його аміногрупи є частково ацетильованими. Взаємодія гепарину з антитромбіном була з'ясована в 1950-х рр., що призвело до кращого розуміння терапії. Подальші дослідження з біохімічної характеристики макромолекули засвідчили, що процеси десульфатування призводять до повної втрати антикоагулянтної активності гепарину. Крім того, фракційне осадження активного матеріалу дозволило припустити, що гепарин являє собою суміш близькоспоріднених за будовою структур, а не єдину уніфіковану молекулу. Сучасні дослідження повністю підтвердили правильність цих ранніх спостережень та висновків. На сьогодні доведено, що гепарин є високосульфатованим полісахаридом, який складається із залишків глюकोзаміну та уронової кислоти, що чітко чергуються (рис. 1.2).

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

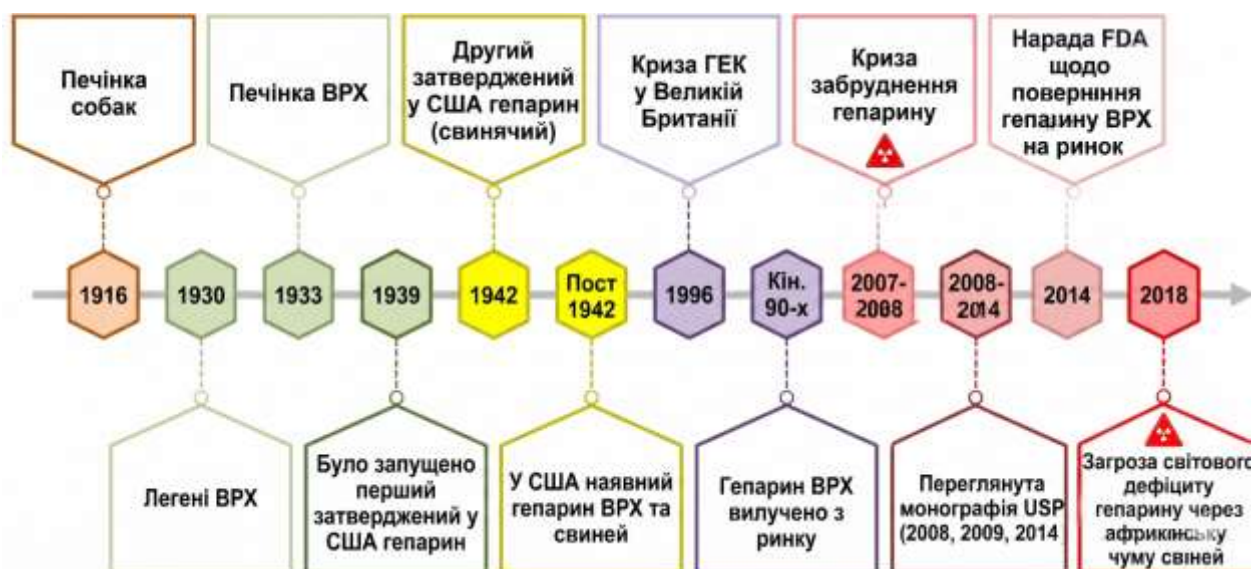


Рис. 1.1. Хронологія історичного розвитку терапевтичного гепарину. USP: Фармакопея США; ГЕК: губчаста енцефалопатія великої рогатої худоби; FDA: Управління з контролю за продуктами харчування та лікарськими засобами. Джерело [24]

У біосинтетичному шляху утворення гепарину моносахариди - N-ацетил-D-глюкозамін (GlcNAc) та D-глюкуронова кислота (GlcA) - послідовно приєднуються до тетрасахаридної ділянки зв'язування (GlcA-Gal-Gal-Xyl-), яка ковалентно сполучена з білками, що містять тандемні повтори залишків серину та гліцину (Ser-Gly). Після завершення етапу елонгації генеруються гліканові ланцюги гепарину з молекулярною масою до 100 кДа. Безпосередньо під час елонгації, а також після її завершення, полімерний ланцюг зазнає низки посттрансляційних модифікацій, які включають: епімеризацію D-глюкуронової кислоти з утворенням L-ідурунової кислоти (IdoA), N-деацетилювання, N-сульфатування, 2-O-сульфатування, 6-O-сульфатування та, значно рідше, 3-O-сульфатування залишків глюкозаміну. Повний цикл біосинтезу відбувається в апараті Гольджі переважно тучних клітин (мастоцитів), які є спеціалізованим типом імунних клітин, що містять везикули, збагачені гепарином. Внаслідок такого багатоступеневого біосинтезу та подальших модифікацій теоретично можливе існування 32

негативного заряду завдяки сульфатним групам (в середньому 2,7 на дисахарид).

1.2 Механізм дії гепарину

Гепарин – один із найважливіших антикоагулянтів прямої дії, який уже понад століття застосовується в клінічній практиці. Незважаючи на появу низькомолекулярних гепаринів та синтетичних аналогів (наприклад, фондапаринуксу), нефракціонований гепарин (НФГ) залишається незамінним у багатьох клінічних ситуаціях, зокрема при екстракорпоральному кровообігу, гемодіалізі, лікуванні гострих тромбозів та у війсьній медицині. Основний механізм дії – зв'язування з антитромбіном ІІІ, що інгібує тромбін (фактор ІІа) та фактор Ха, запобігаючи утворенню тромбів. Крім антикоагулянтних властивостей, гепарин проявляє антизапальну, антивірусну, антипроліферативну та антиметастатичну активність завдяки взаємодії з різними білками (наприклад, інгібування гепаранози, модуляція факторів росту).

У світі гепарин є одним з найважливіших антикоагулянтів, що використовується для профілактики та лікування венозної тромбоемболії, гострих коронарних синдромів, у кардіохірургії, гемодіалізі, екстракорпоральному кровообігу та під час операцій. Глобальний ринок гепарину (включаючи НФГ та низькомолекулярні гепарини – НМГ) оцінюється в мільярди доларів США і продовжує зростати через старіння населення, збільшення кількості хірургічних втручань та серцево-судинних захворювань. Основні форми – ін'єкційні розчини для внутрішньовенного та підшкірного введення. Перспективними є неантикоагулянтне застосування – лікування запальних захворювань, онкології (інгібування метастазів), вірусних інфекцій (включаючи потенціал проти SARS-CoV-2) та загоєння ран.

Гепарин реалізує свою основну фармакологічну дію - антикоагулянтну -

									Арк.
									9
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.01.00 000 ПЗ				

переважно через взаємодію з антитромбіном (АТ, раніше відомим як антитромбін ІІІ). Цей механізм є класичним прикладом алостеричної активації інгібітора серинових протеаз і був детально вивчений ще у 1970-х роках, однак сучасні дослідження значно розширили уявлення про багатогранність дії гепарину.

Гепарин являє собою лінійний полісахарид, що складається з повторюваних дисахаридних одиниць, утворених уроновою кислотою (L-ідуроною або D-глюкуроною) та D-глюкозаміном. Молекула характеризується високою гетерогенністю як за довжиною ланцюга (середня молекулярна маса нефракціонованого гепарину - 12–15 кДа, діапазон 5–30 кДа), так і за ступенем та позиціями сульфатування (N-сульфатування, 2-O-, 6-O- та 3-O-сульфатування). Саме специфічна пентасахаридна послідовність з високою афінністю до антитромбіну (зокрема наявність 3-O-сульфатної групи на центральному глюкозаміні) є критичною для антикоагулянтної активності. Ця послідовність зустрічається приблизно в третині молекул комерційного гепарину.

Основний механізм антикоагулянтної дії реалізується через зв'язування гепарину з антитромбіном. Антитромбін є природним інгібітором серинових протеаз коагуляційного каскаду (тромбін - фактор ІІа, фактор Ха, ІХа, ХІа, ХІІа). У відсутності гепарину АТ інгібує ці ферменти відносно повільно. Приєднання гепарину до специфічної ділянки на АТ (гепарин-зв'язуючий сайт, утворений позитивно зарядженими залишками аргініну та лізину) викликає конформаційну зміну в молекулі інгібітора. Це призводить до експоненціального (до 1000–4000 разів) прискорення швидкості інгібування тромбіну та фактора Ха.

Для інгібування фактора Ха достатньо самої пентасахаридної послідовності (анти-Ха ефект реалізується переважно алостеричним механізмом). Для ефективного інгібування тромбіну (фактора ІІа) необхідний довший полісахаридний ланцюг (мінімум 18–20 моносахаридних залишків). У

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		10

цьому випадку гепарин виконує роль «темплату»: одна частина молекули зв'язується з АТ, а інша - безпосередньо з тромбіном, що значно підвищує локальну концентрацію інгібітора біля активного центру ферменту.

Таким чином, нефракціонований гепарин проявляє як анти-Ха, так і анти-Па активність (співвідношення $\text{anti-Ха}/\text{anti-Па} \approx 1$), тоді як низькомолекулярні гепарини (LMWH) та синтетичний пентасахарид фондапаринукс переважно інгібують фактор Ха.

Окрім безпосередньої антикоагулянтної дії, гепарин проявляє низку неантикоагулянтних ефектів, які реалізуються через взаємодію з іншими білками. Він зв'язується з тромбоцитарним фактором 4 (PF4), що лежить в основі імуніопосередкованої тромбоцитопенії, індукованої гепарином - одного з найсерйозніших ускладнень терапії. Гепарин також модулює активність комплементу, пригнічує адгезію та активацію лейкоцитів, проявляє протизапальну та антиангіогенну дію, а також може зв'язуватися з вірусними білками, демонструючи певну антивірусну активність. Ці додаткові ефекти пояснюють інтерес до створення структурно модифікованих аналогів гепарину з селективним профілем дії.

Фармакодинамічний ефект гепарину залежить від його молекулярної структури, зокрема від наявності та розташування специфічних сульфатних груп. Саме тому при розробці біотехнологічних методів виробництва гепарину (або його аналогів) ключовим завданням є не лише досягнення високого виходу полісахариду, а й забезпечення правильного ступеня та позицій сульфатування, особливо 3-О-сульфатування, необхідного для формування високоафінної пентасахаридної послідовності. Відтворення або навіть покращення природної структури гепарину в біоінженерних системах (мікробних або клітинних) відкриває можливості створення препаратів з передбачуваним терапевтичним профілем, зниженим ризиком імуніопосередкованої тромбоцитопенії, індукованої гепарином (НІТ, Heparin-Induced Thrombocytopenia, гепарин-індукована тромбоцитопенія) та кращою

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

відтворюваністю порівняно з традиційним тваринним гепарином.

У контексті вдосконалення виробництва субстанції гепарину на вітчизняному підприємстві особливого значення набуває контроль структурної ідентичності продукту. Біотехнологічні підходи дозволяють цілеспрямовано інженерувати штами-продуценти або застосовувати хемоензиматичні модифікації для отримання молекул з бажаним співвідношенням anti-Ха/anti-Па активності та мінімальним вмістом домішок, що потенційно може зменшити частоту побічних ефектів та підвищити безпеку терапії.

Таким чином, механізм дії гепарину є багатокomпонентним і залежить як від його унікальної сульфатованої структури, так і від взаємодії з ключовими білками системи гемостазу. Розуміння цих молекулярних основ є необхідним для обґрунтування доцільності переходу від традиційного тваринного виробництва до сучасних біотехнологічних технологій, які здатні забезпечити вищу якість, безпеку та контрольованість кінцевого продукту.

1.3 Джерела та технології виробництва гепарину

Традиційно гепарин отримують екстракцією з тваринної сировини, однак цей підхід має низку суттєвих обмежень, що стимулює розвиток альтернативних біотехнологічних технологій.

Основним джерелом фармацевтичного гепарину протягом десятиліть залишається слизова оболонка кишківника свиней. З однієї свині отримують приблизно 0,8 кг слизової, у якій концентрація гепарину становить 160–260 мг/кг. Специфічна анти-Ха активність свинячого гепарину коливається в межах 148–219 МО/мг, середня молекулярна маса - 15,0–19,0 кДа, а співвідношення сульфат/карбоксил (S/C) - 2,31–2,57. Історично використовували також легені та слизову оболонку великої рогатої худоби, однак через ризик пріонних інфекцій їх застосування значно скоротилося. Овеча сировина (овечі кишківники) дає гепарин з активністю близько 142

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		12

МО/мг та вищою середньою молекулярною масою (22,9 кДа). Серед інших джерел досліджували слизову оболонку дромедара (вихід до 400 мг/кг), курей, індиків, лосося та навіть молюсків (до 2100 мг/кг сухої тканини), однак промислове значення мають переважно свинячі та, меншою мірою, бичачі та овечі джерела.

Промислове виробництво гепарину з тваринної сировини складається з п'яти основних етапів.

1. Збір та стабілізація сировини. Слизову оболонку отримують на бойнях від здорових тварин із повною простежуваністю походження. Сировину консервують 1,5–2,5 % (мас./мас.) натрію бісульфітом або іншими антиоксидантами (кальцій пропіонат, фенол) для запобігання мікробному росту та десульфатуванню (зокрема 6-О-десульфатуванню глюкозаміну). У деяких випадках уже на бойні проводять частковий ферментативний гідроліз (субтилізин, 50–55 °С, лужне рН) з подальшим адсорбуванням на аніонообмінній смолі та сушінням смоли для транспортування. Такий підхід підвищує вихід з 30 тис до 48 тис одиниць на кг слизової.

2. Ферментативний гідроліз для вивільнення гепарину із протеогліканів тучних клітин. Використовують протеолітичні ферменти (трипсин, хімотрипсин, папаїн, субтилізин/Alcalase® або Maxatase®) у співвідношенні 0,2–2 г ферменту на кг сировини. Процес проводять при 50–60 °С, рН - 8,6 (для субтилізинів), протягом 4–16 годин до зниження в'язкості до близько 14,8 мПа·с. Після гідролізу концентрація гепарину в суміші досягає близько 0,01 % (мас./мас.). Хімічний гідроліз (кислотний або лужний за високої температури) застосовують рідше через ризик десульфатування та деградації молекули.

3. Виділення гепарину. Через низьку концентрацію гепарину в дигестаті застосовують високоселективні методи. Найпоширеніші - адсорбція на аніонообмінних смолах з четвертинними амонієвими групами (Amberlite IR-120, FPA98, IRA900, Dowex 22CL, Lewatit CA9249, Duolite; 2–4 л смоли на 100 кг слизової). Після адсорбції смолу промивають розчинами низької іонної

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

СНО ферментів (зокрема певних сульфотрансфераз) вдається підвищити ступінь сульфатування та антикоагулянтну активність продукту, хоча вона поки що поступається свинячому гепарину. Перспективними є також гібридні підходи: мікробне отримання гепарозану з подальшою хемоензиматичною модифікацією на інертних носіях або в безклітинних системах.

До основних викликів біотехнологічного виробництва відносяться забезпечення достатнього рівня сульфатування (особливо 3-О-сульфатування, критичного для антикоагулянтної активності), постачання та регенерація PAPS, масштабованість процесів та економічна доцільність. Однак досягнуті виходи (грами на літр), можливість таргетованої модифікації структури молекули (зниження ризику НІТ, створення аналогів з бажаним профілем активності) та повна незалежність від тваринної сировини роблять ці технології надзвичайно перспективними для промислового впровадження.

Таким чином, традиційне виробництво гепарину з свинячої слизової оболонки є добре відпрацьованим, але вразливим процесом, детально описаним у літературі. Сучасні біотехнологічні підходи, засновані на метаболічній інженерії мікроорганізмів та клітин ссавців, відкривають шлях до безпечного, сталого та контрольованого виробництва гепарину, що особливо актуально для України в контексті імпортозаміщення критичних лікарських засобів та розвитку національної біофармацевтичної промисловості.

1.4 Обґрунтування перспективності виробництва біотехнологічного гепарину

Сучасне промислове виробництво гепарину (нефракціонованого гепарину натрію, UFH, Unfractionated heparin sodium) повністю базується на екстракції з тваринної сировини, переважно зі слизової оболонки кишківника свиней, а історично або альтернативно - з тканин овець, великої рогатої худоби

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

(легені, кишківник) (van der Meer et al., 2017). Це створює низку критичних обмежень і ризиків, які роблять перехід на біотехнологічні методи не лише перспективним, а й стратегічно необхідним для України та вітчизняних підприємств.

По-перше, безпека та контамінація. Тваринна сировина несе ризики передачі патогенів (віруси, бактерії, пріони BSE, Bovine Spongiform Encephalopathy, губчаста енцефалопатія великої рогатої худоби), а також хімічних забруднювачів. Гучний скандал 2008 року з надсульфатованим хондроїтином сульфатом (OSCS, oversulfated chondroitin sulfate) у китайському гепарині призвів до десятків смертей і глобальної кризи постачання (Kishimoto et al., 2008; Blossom et al., 2008; U.S. Government Accountability Office, 2010) [25-27].

OSCS - це хімічно модифікований хондроїтин сульфат, у якому штучно збільшено кількість сульфатних груп (ступінь сульфатування значно вищий, ніж у природного хондроїтин сульфату). Ця речовина за хімічною структурою подібна до гепарину, тому її важко виявити звичайними методами контролю (наприклад, за антикоагулянтною активністю). OSCS був навмисно доданий до сировини на деяких китайських виробництвах з метою збільшення видимого виходу та фальсифікації показників якості. У 2008 році забруднений OSCS гепарин (виробництва компанії Baxter, сировина з Китаю) спричинив тяжкі побічні реакції та летальні випадки. За даними FDA та CDC, у США було зафіксовано щонайменше 81 смерть та понад 785 тяжких побічних ефектів. OSCS не діє через антитромбін (як справжній гепарин), а активує контактну систему, що призводить до масивного вивільнення брадикініну. Це спричиняє різке зниження артеріального тиску, анафілактичні реакції, набряк та шок. Саме тому регуляторні органи (FDA, ЕМА, ВООЗ, а також ДФУ) запровадили обов'язкову вимогу повної відсутності OSCS у фармацевтичному гепарині. Наявність цієї домішки навіть у слідових кількостях вважається критичним дефектом якості. Навіть сучасні процеси не гарантують повної відсутності

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

варіабельності та домішок (дерматан сульфат, хондроїтин сульфат, нуклеїнові кислоти, ендотоксини). Біотехнологічний гепарин, отриманий мікробним або хемоензиматичним шляхом, повністю виключає тваринні патогени та дозволяє жорсткий контроль на кожній стадії.

По-друге, стабільність ланцюга постачання та геополітична вразливість. Понад 80–90 % сировини походить з Китаю, де виробництво тісно пов'язане з м'ясною промисловістю. Спалахи африканської чуми свиней (ASF), регуляторні обмеження, логістичні кризи (як під час пандемії або війни) призводять до дефіциту та зростання цін. Для України, яка значною мірою імпортує субстанцію гепарину, це критична залежність, особливо в умовах воєнного стану, коли антикоагулянти життєво необхідні для лікування травм, операцій, ДВЗ-синдрому, гемодіалізу та профілактики тромбозів.

По-третє, якість та відтворюваність. Тваринний гепарин - це гетерогенна суміш полісахаридів з варіабельною молекулярною масою (Мм близько 12–20 кДа), ступенем сульфатування та біологічною активністю. Це ускладнює стандартизацію, підвищує ризик гепарин-індукованої тромбоцитопенії (НІТ) та інших побічних ефектів. Біотехнологічні підходи (мікробна ферментація гепарозану з подальшою ензиматичною модифікацією або *de novo* біосинтез у рекомбінантних дріжджах) дозволяють отримувати продукт з більш однорідною структурою, контрольованим профілем сульфатування та можливістю «tailor-made» дизайну молекули (індивідуальний дизайн молекули гепарину залежно від терапевтичних потреб) - наприклад, зі зниженим антикоагулянтним ефектом, але збереженою або посиленою протизапальною/антивірусною активністю (Zhang et al., 2022; Sultana, Kamihira, 2024).

По-четверте, сталість, етика та регуляторні переваги. Виробництво не залежить від забою тварин, зменшує екологічне навантаження (відходи slaughterhouse), відповідає принципам green chemistry та етичним вимогам. У контексті євроінтеграції України та гармонізації з ДФУ/ЕР/USP/FDA такі

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

продукти мають кращі шанси на реєстрацію як інноваційні або біосимілярні препарати. Крім того, біотехнологічний гепарин відкриває можливості для створення нових лікарських форм (низькомолекулярні аналоги, кон'югати, системи таргетної доставки).

Таким чином, перехід на біотехнологічне виробництво гепарину - це не просто альтернатива, а стратегічний напрямок, що поєднує безпеку, якість, незалежність та інноваційний потенціал. Сучасна література підтверджує технічну реалізованість підходів на основі мікробних систем (*E. coli* K5, *Pichia pastoris*) та хемоензиматичних технологій, з досягненням виходів у грамах на літр у ферментерах (van der Meer et al., 2017; Zhang et al., 2022; Sultana, Kamihira, 2024).

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТІВ

2.1 Характеристика готового продукту

Найменування продукту

Субстанція гепарину натрію (Heparin Sodium Substance), отримана біотехнологічним методом.

Виробник: ТОВ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна.

Нормативно-технічна документація

Якість субстанції контролюється відповідно до вимог Державної Фармакопеї України, монографія «Гепарин натрію», а також Європейської Фармакопеї (European Pharmacopoeia, Monograph 0333 - Heparin sodium). Додатково застосовуються вимоги Фармакопеї США (USP) щодо нефракціонованого гепарину натрію та внутрішня аналітично-нормативна документація підприємства.

На відміну від традиційної субстанції, отриманої з тваринної сировини, біотехнологічний продукт характеризується вищим рівнем контролю на всіх етапах виробництва та відсутністю ризиків, пов'язаних з використанням тваринних тканин.

Упаковка та маркування

Субстанцію фасують у герметичні контейнери з поліетилену високої щільності або в пакети з багат шарової алюмінієвої фольги. Маса нетто - 1 кг, 5 кг або 10 кг.

Маркування містить повну інформацію про продукт, умови зберігання та попередження про гігроскопічність.

Зовнішній вигляд та якісний і кількісний склад

Біотехнологічна субстанція гепарину натрію являє собою білий або майже білий гігроскопічний порошок.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

Основні показники якості наведено в табл. 2.1, переваги гепарину отриманого біотехнологічним методом – у табл. 2.2.

Таблиця 2.1

Показники якості субстанції гепарину натрію

Показник	Норма згідно з ДФУ / ЕР	Метод контролю
Зовнішній вигляд	Білий або майже білий порошок	Візуальний
Розчинність	Легко розчинний у воді	Фармакопейний
pH (розчин 1 %)	5,5–8,0	Потенціометричний
Специфічна активність	Не менше 150 МО/мг	Анти-Ха метод
Співвідношення anti-Ха / anti-Па	0,9–1,1	Хромогенний метод
Середня молекулярна маса	12 000–18 000 Да	SEC / GPC
Вміст сульфатних груп	Відповідає вимогам монографії	Титриметричний / ЯМР
Відсутність OSCS	Відсутній	¹ H-ЯМР спектроскопія
Вода	Не більше 5,0 %	Метод Карла Фішера
Зольність	Не більше 0,5 %	Гравіметричний
Мікробіологічна чистота	Відповідає вимогам категорії 2А	Фармакопейний

Хімічна природа діючої речовини

Діючою речовиною є гепарин натрію - високо сульфатований глікозаміноглікан, що складається з ланцюгів, утворених повторюваними дисахаридними одиницями (L-ідуронова кислота або D-глюкуронова кислота та D-глюкозамін). Середня молекулярна маса - 12–18 кДа. На відміну від традиційного гепарину тваринного походження, біотехнологічний продукт отримують шляхом контрольованої ферментації та ензиматичної модифікації, що дозволяє досягати більш однорідної структури та зменшувати полідисперсність молекул.

Основне призначення продукту

Субстанція гепарину натрію призначена для виробництва лікарських

засобів з антикоагулянтною дією.

Відповідно до АТС-класифікації препарат належить до групи В01АВ01 - Гепарин.

Фармакологічна дія: прямий антикоагулянт. Механізм дії полягає в активації антитромбіну ІІІ, що призводить до прискореного інгібування факторів згортання крові Іа (тромбін) та Ха.

Умови зберігання та транспортування

Субстанцію гепарину натрію зберігають у щільно закритих контейнерах у сухому, захищеному від світла місці при температурі не вище 25 °С. Допускається короткочасне зберігання при температурі до 30 °С.

Відносна вологість повітря - не більше 60 %.

Термін придатності субстанції - 3 роки з дати виготовлення за умови дотримання умов зберігання.

Транспортування здійснюється в закритих транспортних засобах, що захищають продукт від вологи, прямих сонячних променів та механічних пошкоджень. Не допускається транспортування разом з речовинами, що мають сильний запах.

Переваги біотехнологічного продукту порівняно з традиційним

Біотехнологічна субстанція гепарину натрію має низку суттєвих переваг над продуктом, отриманим з тваринної сировини:

1. Повна відсутність ризику передачі пріонів (BSE) та інших тваринних патогенів;
2. Гарантована відсутність надсульфатованого хондроїтин сульфату (OSCS);
3. Вища відтворюваність якісних показників від серії до серії;
4. Можливість створення молекул з дизайном «на замовлення» (tailor-made design) шляхом регулювання ступеня та позицій сульфатування;
5. Незалежність від епідемій серед тварин (зокрема ASF) та коливань постачання сировини;

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

6. Знижений ризик імуногенності та розвитку гепарин-індукованої тромбоцитопенії (НІТ) при відповідній оптимізації структури.

Таблиця 2.2

Особливості показників якості субстанції гепарину натрію, отриманого біотехнологічним методом

Показник	Норма (ДФУ / ЕР 0333)	Особливості біотехнологічного продукту
Зовнішній вигляд	Білий або майже білий порошок	Вища однорідність частинок
Специфічна активність	≥ 150 МО/мг	Стабільніші показники від серії до серії
Співвідношення anti-Xa / anti-IIa	0,9–1,1	Можливість регулювання в процесі виробництва
Середня молекулярна маса	12 000–18 000 Да	Вужчий молекулярно-масовий розподіл
Відсутність OSCS	Відсутній	Гарантована відсутність
Вміст води	$\leq 5,0$ %	Контрольована на етапі сушіння
Мікробіологічна чистота	Категорія 2А	Нижчий ризик мікробної контамінації

2.2 Характеристика біологічного об'єкту

Для впровадження біотехнологічного виробництва гепарину на фармацевтичному підприємстві ТОВ «Фармацевтична фірма «Дарниця»», з урахуванням українських реалій, найбільш доцільним є використання бактерій *Escherichia coli* K5, які є природними продуцентами прекурсору гепарину - гепарозану. Цей штам поєднує у собі економічність культивування, високу продуктивність та можливість подальшої ензиматичної модифікації, що відповідає вимогам масштабного промислового виробництва.

Escherichia coli K5 належить до царства Бактерії (Bacteria), типу

									Арк.
									23
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.01.00 000 ПЗ				

Фірмлікут (Firmicutes), класу Грамнегативні бактерії (Gram-negative bacteria), роду *Escherichia*, виду *Escherichia coli*. Штам K5 виділяється здатністю утворювати капсулу із полісахариду, структурно схожого з гепарином - гепарозаном.

E. coli K5 - це короткі грамнегативні палички розміром близько 1–2 мкм у довжину та 0,25–1,0 мкм у діаметрі, неспороздатні, рухливі за допомогою перитрихального джгутика. Клітини мають типову клітинну будову бактерій з зовнішньою мембраною, яка містить ліпополісахариди, та капсулою, що відповідає серотипу K5. Капсула складається з ацетилглюкозамін-глюкуронового полісахариду, який є біосинтетичним попередником гепарину.

E. coli K5 культивується аеробно або факультативно анаеробно на базових поживних середовищах (наприклад, LB, M9 з додаванням глюкози) при температурі 30–37 °C, оптимум 37 °C. Росте швидко з генераційним часом приблизно 20–30 хв в оптимальних умовах. Для отримання гепарозану застосовують ферментацію у біореакторах з контрольованими параметрами - аерацією, рН, температурою та складу поживних речовин, з можливістю масштабування до промислових обсягів.

Штам K5 продукує велику кількість капсульного полісахариду гепарозану (аналог N-ацетил гепарину) - повторюваний дисахаридний полімер з глюкуронової кислоти та N-ацетил-D-глюкозаміну. Здатність до метаболічної інженерії є ключовою: генетичні маніпуляції дозволяють підвищувати синтез гепарозану, блокувати побічні шляхи або впроваджувати ферменти, що ковалентно модифікують молекулу (N-деацетилаза/сульфотрансферази, епімерази, O-сульфотрансферази), забезпечуючи відтворюваність структури, ступінь сульфатування та антикоагулянтну активність.

Ферментативне розщеплення біомаси після культивації дає змогу ефективно виділити гепарозан, який надалі піддають ензиматичній трансформації (N-деацетилювання, N-сульфатування, 2-O-, 6-O- та 3-O-

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		24

сульфатування) із застосуванням рекомбінантних ферментів для досягнення характеристик, близьких до натурального гепарину.

Основні переваги введення *E. coli* K5 у виробничий процес включають:

- Високу швидкість росту та продуктивність у стандартних, недорогих поживних середовищах.
- Можливість масштабування у промислових біореакторах.
- Відсутність ризику контамінації патогенами тваринного походження.
- Розвинуті методи метаболічної інженерії для підвищення виходу та контролю якості продукту.
- Відповідність принципам сталого виробництва, що особливо важливо для української фармацевтичної галузі.

Хоча перспективні і інші системи, зокрема рекомбінантні дріжджі *Pichia pastoris* та клітини ссавців (СНО), другу лінію розвитку для біотехнологічного виробництва, через складність культури та більш високі виробничі витрати на даному етапі ефективності вони поступаються *E. coli* K5. Проте такі системи можуть використовуватися для створення специфічних гепариноподібних молекул зі зміненими фармакологічними властивостями.

Таким чином, штам *Escherichia coli* K5 є оптимальним біологічним агентом для виробництва біотехнологічного гепарину вітчизняним підприємством, що дозволить поєднати сучасні наукові досягнення з економічною ефективністю та відповідністю вимогам фармацевтичної промисловості України.

2.2 Характеристика сировини

2.2.1 Характеристика середовищ для вирощування *Escherichia coli* K5

Для біотехнологічного виробництва гепарину обрано штам *Escherichia coli* K5, який природно синтезує гепарозан - не сульфатований прекурсор гепарину. Вихід гепарозану значною мірою залежить від складу поживного

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

середовища та стратегії ферментації.

1. Типи середовищ для вирощування *E. coli* K5

1.1. Комплексні (багатокомпонентні) середовища - LB (Luria-Bertani), Terrific Broth (TB), Super Broth, містять дріжджовий екстракт, пептони, NaCl, застосовуються переважно для посівного матеріалу. Переваги: швидке зростання біомаси, простота приготування. Недоліки: низька відтворюваність, складний контроль метаболізму, утворення ацетату, вища собівартість при масштабуванні.

1.2. Напіввизначені середовища містять визначені солі + обмежену кількість органічних компонентів (дріжджовий екстракт 0,5–2 г/л), дають хороший баланс між виходом і контролем, часто використовуються на етапі оптимізації процесу.

1.3. Хімічно визначені (мінімальні) середовища - модифіковані середовища на основі M9 або спеціально розроблені середовища. Основні компоненти: джерело вуглецю - глюкоза або гліцерин (20–40 г/л на старті), джерело азоту - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ або NH_4Cl , фосфати - KH_2PO_4 + K_2HPO_4 , магній - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, мікроелементи - Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Mo, Ca. Переваги: висока відтворюваність, легше валідація за GMP, нижчий ризик небажаних метаболітів. Недоліки: повільніше початкове зростання порівняно з комплексними середовищами.

У визначеному середовищі з експоненціальною подачею глюкози та збагаченням киснем вдалося досягти виходу гепарозану до 15 г/л (Wang et al., 2010). Гліцерин як джерело вуглецю дає кращі результати, ніж глюкоза: у гліцерин-вмісному визначеному середовищі продуктивність гепарозану була на 26,4 % вищою, а утворення ацетату - значно нижчим. Стратегія періодичної ферментації з підживленням з експоненціальною подачею субстрату та контролем розчиненого кисню є ключовою для досягнення високої щільності клітин ($\text{OD}_{600} > 50-100$) і високого виходу полісахариду. Хімічно визначені середовища переважають для промислового виробництва через кращу

									Арк.
									26
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.01.00 000 ПЗ				

відтворюваність і відповідність вимогам GMP.

Таким чином, для швидкого отримання біомаси на етапі підготовки посівного матеріалу обране посівне середовище LB, а на етапі основної ферментації хімічно визначене середовище з гліцерином як основним джерелом вуглецю, як режим ферментації - періодичну ферментацію з експоненціальною подачею гліцерину та контролем розчиненого кисню ($DO > 20-30 \%$).

Середовище LB:

Компонент	Кількість, г/л	Призначення
Триптон	12,0	Джерело азоту та амінокислот
Дріжджовий екстракт	8,0	Джерело вітамінів та ростових факторів
NaCl	10,0	Осмотичний тиск
Глюкоза	5,0	Джерело вуглецю (опціонально)
Вода очищена	до 1,0 л	

pH середовища перед стерилізацією: $7,0 \pm 0,2$ Стерилізація автоклавуванням при $121 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 20 хв. Це середовище забезпечує швидкий ріст культури (OD_{600} 4–8 за 8–12 годин) і є економічно вигідним на стадії підготовки інокуляту.

Середовище для основної ферментації для максимального накопичення гепарозану в умовах періодично-підживлювальної ферментації - гліцерин-вмісне середовище (гліцерин дешевший за глюкозу в довгостроковій перспективі, менше утворення ацетату, що призводить до вищої щільності клітин, краща відтворюваність і відповідність вимогам GMP, доступність гліцерину в Україні (наприклад, як побічний продукт біодизельного виробництва).

Гліцерин-вмісне середовище:

Компонент	Кількість, г/л	Призначення
Гліцерин	25,0	Основне джерело вуглецю
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,0	Джерело азоту
KH_2PO_4	3,0	Фосфор + буферна система
K_2HPO_4	6,0	Фосфор + буферна система
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8	Джерело магнію

Компонент	Кількість, г/л	Призначення
NaCl	1,0	Осмотичний тиск
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05	Джерело кальцію
Розчин мікроелементів	2,0 мл	склад нижче
Вода очищена	до 1,0 л	

рН перед стерилізацією: $7,0 \pm 0,2$ (регулюється 25% розчином NH₄OH або 2М NaOH). Стерилізація - автоклавуванням при 121 °С, 20–25 хв. Гліцерин та MgSO₄ стерилізують окремо (щоб уникнути утворення осаду).

Розчин мікроелементів:

Компонент	Кількість, г/л
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2,0
MnSO ₄ · H ₂ O	0,5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,4
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,2
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,1
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,1
H ₃ BO ₃	0,05
Концентрована HCl	5 мл
Вода очищена	до 1,0 л

Стерилізують фільтруванням через мембрану 0,22 мкм.

Розчин для підживлення:

Компонент	Кількість	Примітка
Гліцерин	500–600 г/л	Основне джерело вуглецю
(NH ₄) ₂ SO ₄	50–80 г/л	Джерело азоту
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5–8 г/л	Магній
Вода очищена до необхідного об'єму		

Цей розчин подається в ферментер за експоненціальною стратегією (залежно від швидкості росту культури).

У процесі біотехнологічного виробництва субстанції гепарину натрію використовується значна кількість сировини та матеріалів, які входять до складу поживних середовищ на стадіях підготовки посівного матеріалу та основної ферментації. Якість цих компонентів безпосередньо впливає на ріст культури, вихід гепарозану та відповідність готового продукту вимогам фармакопеї. Характеристику сировини, матеріалів і напівпродуктів наведено в

									Арк.
									28
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.01.00 000 ПЗ				

таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Характеристика сировини, матеріалів і напівпродуктів

№ з/п	Найменування	Показники НТД, обов'язкові для перевірки	Примітка (призначення у виробництві)
1. Основна сировина			
1.1	<i>Escherichia coli</i> K5 (штам-продуцент)	Чистота, ідентичність, життєздатність	Основний біологічний агент для синтезу гепарозану
1.2	Гліцерин	Вміст основної речовини ≥ 99 %, вологість, зольність	Основне джерело вуглецю в продукційному середовищі
1.3	Амонію сульфат ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Вміст основної речовини, вологість, важкі метали	Джерело азоту в продукційному середовищі
1.4	Калію дигідрофосфат (KH ₂ PO ₄)	Вміст основної речовини, вологість	Джерело фосфору та компонент буферної системи
1.5	Калію гідрофосфат (K ₂ HPO ₄)	Вміст основної речовини, вологість	Компонент буферної системи
1.6	Магнію сульфат гептагідрат (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	Вміст основної речовини, вологість	Джерело магнію
1.7	Кальцію хлорид дигідрат (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Вміст основної речовини	Джерело кальцію
1.8	Триптон	Вміст азоту, вологість, мікробіологічні показники	Джерело азоту та амінокислот у посівному середовищі (LB)
1.9	Дріжджовий екстракт	Вміст азоту, вологість	Джерело вітамінів та ростових факторів у посівному середовищі
1.10	Натрію хлорид (NaCl)	Вміст основної речовини, вологість	Осмотичний тиск у середовищах
1.11	Глюкоза	Вміст основної речовини, вологість	Джерело вуглецю в посівному середовищі (опціонально)
1.12	Вода очищена	Електропровідність, мікробіологічна чистота, загальний органічний вуглець	Розчинник для приготування всіх середовищ
2. Допоміжна сировина			
2.1	Розчин амонію гідроксиду (NH ₄ OH), 25 %	Концентрація	Регулятор рН під час ферментації

№ з/п	Найменування	Показники НТД, обов'язкові для перевірки	Примітка (призначення у виробництві)
2.2	Розчин натрію гідроксиду (NaOH), 2 М	Концентрація	Альтернативний регулятор рН
2.3	Антипінний агент (силіконовий)	Відсутність токсичних домішок	Запобігання піноутворенню в ферментері
2.4	Розчин мікроелементів	Склад та концентрація компонентів	Забезпечення мікроелементами в продукційному середовищі
3. Матеріали			
3.1	Мембранні фільтри стерилізуючі (0,22 мкм)	Цілісність, бактеріальна затримка	Стерильна фільтрація середовищ та культуральної рідини
3.2	Ультрафільтраційні мембрани	Молекулярна маса відсічення	Концентрування та очищення гепарозану
3.3	Пакувальні матеріали (контейнери, пакети з алюмінієвої фольги)	Герметичність, хімічна інертність	Фасування готової субстанції
4. Напівпродукти			
4.1	Посівна культура <i>E. coli</i> K5	Кількість життєздатних клітин (КУО/мл), чистота культури	Інокулят для основної ферментації
4.2	Культуральна рідина після ферментації	Вміст гепарозану, біомаса, рН	Вихідний матеріал для виділення та очищення гепарозану
4.3	Гепарозан (очищений)	Вміст основної речовини, молекулярна маса, ступінь чистоти	Напівпродукт для ензиматичної модифікації

2.4 Біосинтез цільового продукту

Цільовим продуктом біотехнологічного виробництва є гепарозан – не сульфатований глікозаміноглікан, який є безпосереднім прекурсором для подальшої ензиматичної модифікації до фармацевтичного гепарину натрію. У даному виробництві як біологічний агент обрано штам *Escherichia coli* K5, який природно здатний синтезувати гепарозан як компонент своєї капсули.

У природних умовах *E. coli* K5 синтезує гепарозан як капсульний полісахарид (K5-антиген), що виконує захисну функцію. Біосинтез гепарозану

									Арк.
									30
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.01.00 000 ПЗ				

застосовують метаболічно інженерні штами, у яких: посилено експресію генів *kfiA* та *kfiC*; видалено або ослаблено конкуруючі метаболічні шляхи; оптимізовано транспортні системи.

Промисловий біосинтез здійснюють у режимі періодично-підживлювальної ферментації з використанням хімічно визначеного середовища на основі гліцерину. Оптимальні умови процесу: температура 37 °С; рН $7,0 \pm 0,2$ (регулюється автоматично); розчинений кисень (DO) не нижче 20–30 %; подача субстрату експоненціальна стратегія подачі гліцерину. За таких умов вдається досягти концентрації гепарозану до 15 г/л і вище (Wang et al., 2010).

При порушенні оптимальних параметрів процесу можливий розвиток таких небажаних явищ: утворення ацетату - відбувається при надмірному надходженні вуглецю (особливо глюкози) та недостатній аерації. Ацетат пригнічує ріст клітин і знижує вихід гепарозану; активація стрес-відповіді - при нестачі кисню або поживних речовин можлива активація альтернативних шляхів метаболізму, що призводить до зниження продуктивності; деградація гепарозану - у деяких штамів за певних умов можлива експресія ферментів, що розщеплюють полісахарид. Для мінімізації цих ефектів у промислових умовах застосовують: використання гліцерину замість глюкози; суворий контроль розчиненого кисню; метаболічну інженерію штаму (видалення генів, відповідальних за синтез ацетату).

Зміна температури, рН або швидкості подачі субстрату може суттєво впливати на співвідношення між ростом біомаси та накопиченням продукту. Зокрема, підвищення температури понад 37 °С може призводити до теплового стресу та зниження активності глікозилтрансфераз. Недостатня аерація стимулює ацетатний метаболізм, що негативно позначається на виході гепарозану.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

3.1 Розрахунок матеріального балансу

Приймаємо для розрахунку обсяг серії 10 м³ культуральної рідини після стадії біосинтезу. Розрахунок матеріального балансу виконується на 1 м³ культуральної рідини з подальшим масштабуванням.

1. Стадія біосинтезу

Приймаємо концентрацію гепарозану в культуральній рідині 15 г/л (Wang et al., 2010). Кількість культуральної рідини з урахуванням втрат 10 %:

$$G1 = 1 \cdot 1,1 = 1,1 \text{ м}^3.$$

Кількість посівного матеріалу (5 % від G1):

$$G2 = 1,1 \cdot 0,05 = 0,055 \text{ м}^3.$$

Кількість середовища, що надходить у ферментер:

$$G3 = 1,1 + 0,055 = 1,155 \text{ м}^3.$$

Кількість культуральної рідини після біосинтезу (вихід 90 %):

$$G4 = 1,155 \cdot 0,9 = 1,0395 \text{ м}^3.$$

Втрати культуральної рідини:

$$G5 = 1,155 \cdot 0,1 = 0,1155 \text{ м}^3.$$

Кількість гепарозану в культуральній рідині:

$$G6 = 15 \cdot 1,0395 = 15,5925 \text{ кг.}$$

2. Стадія фільтрування культуральної рідини (відділення біомаси)

Витрата води на промивку осаду (гідромодуль 1:0,5):

$$G7 = 1,0395 \cdot 0,5 = 0,51975 \text{ м}^3.$$

Загальна кількість рідини на фільтрування:

$$G8 = 1,0395 + 0,51975 = 1,55925 \text{ м}^3.$$

Кількість фільтрату з урахуванням втрат 10 %:

$$G9 = 1,55925 \cdot 0,9 = 1,403325 \text{ м}^3.$$

Втрати фільтрату:

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

$$G_{10} = 1,55925 \cdot 0,1 = 0,155925 \text{ м}^3.$$

Вміст гепарозану у фільтраті (втрати від інактивації та механічні 8 %):

$$G_{11} = 15,5925 \cdot 0,92 = 14,3451 \text{ кг.}$$

Кількість вологого осаду (біомаси):

Вміст абсолютно сухих речовин у культуральній рідині приймаємо 25 г/л.

Кількість а.с.р. в осаді (40 % від загальної кількості а.с.р.):

$$G_{12} = (1,0395 \cdot 25) \cdot 0,4 = 10,395 \text{ кг.}$$

При вологості осаду 85 %:

$$G_{13} = 10,395 / 0,15 = 69,3 \text{ кг.}$$

3. Стадія ультрафільтрації (концентрування)

Ступінь концентрування - 10 разів.

Кількість ультраконцентрату з урахуванням втрат 10 %:

$$G_{14} = (1,403325 / 10) \cdot 0,9 = 0,1263 \text{ м}^3.$$

Вміст гепарозану в ультраконцентраті (втрати 10 %):

$$G_{15} = 14,3451 \cdot 0,9 = 12,9106 \text{ кг.}$$

Кількість ультрафільтрату:

$$G_{16} = 1,403325 - 0,1263 = 1,277025 \text{ м}^3.$$

4. Стадія осадження гепарозану (етанолом)

Приймаємо осадження 3 об'ємами 96 % етанолу з втратами 15 %.

Кількість етанолу:

$$G_{17} = 0,1263 \cdot 3 = 0,3789 \text{ м}^3.$$

Кількість осаду (гепарозану) після осадження з урахуванням втрат 15 %:

$$G_{18} = 12,9106 \cdot 0,85 = 10,974 \text{ кг.}$$

Кількість маточного розчину (втрати гепарозану 15 %):

$$G_{19} = 12,9106 \cdot 0,15 = 1,9366 \text{ кг.}$$

5. Стадія сушіння

Вологість гепарозану перед сушінням - 70 %.

Кількість вологого осаду:

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						34
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$G_{20} = 10,974 / 0,3 = 36,58 \text{ кг.}$$

Кількість сухого гепарозану з урахуванням втрат при сушінні 10 % та вологості готового продукту 5 %:

$$G_{21} = (10,974 \cdot 0,9) / 0,95 = 10,395 \text{ кг.}$$

Втрати при сушінні:

$$G_{22} = 10,974 - 10,395 = 0,579 \text{ кг.}$$

Таблиця 3.1

Матеріальний баланс стадій технологічного процесу
(розрахунок на 1 м³ культуральної рідини після біосинтезу)

№ з/п	Найменування	Витрачено / Отримано, кг	Вміст гепарозану, кг	Примітка
Стадія 1. Біосинтез				
	Витрачено:			
1.1	Поживне середовище	1100		
1.2	Посівний матеріал	55		5 % від об'єму
	Всього витрачено на стадії	1155		
	Отримано:			
1.3	Культуральна рідина	1039,5	15,59	Вихід 90 %
1.4	Втрати (винос газами + механічні)	115,5		10 %
	Всього отримано на стадії	1155		
Стадія 2. Фільтрування культуральної рідини				
	Витрачено:			
2.1	Культуральна рідина	1039,5	15,59	
2.2	Вода для промивання осаду	519,75		Гідромодуль 1:0,5
	Всього витрачено на	1559,25		

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.01.00 000 ПЗ

Арк.

35

	стадії			
	Отримано:			
2.3	Фільтрат	1403,3	14,35	Втрати 8 % гепарозану
2.4	Вологий осад (біомаса)	69,3		Вологість 85 %
2.5	Втрати фільтрату	155,9	1,24	10 %
	Всього отримано на стадії	1559,25		
Стадія 3. Ультрафільтрація				
	Витрачено:			
3.1	Фільтрат	1403,3	14,35	
	Отримано:			
3.2	Ультраконцентрат	126,3	12,91	Ступінь концентрування ×10, втрати 10 %
3.3	Ультрафільтрат	1277	1,44	
	Всього отримано на стадії	1403,3		
Стадія 4. Осадження гепарозану етанолом				
	Витрачено:			
4.1	Ультраконцентрат	126,3	12,91	
4.2	Етанол 96 %	378,9		3 об'єми
	Отримано:			
4.3	Осад гепарозану (вологий)	36,58	10,97	Втрати 15 %
4.4	Маточний розчин	469	1,94	
	Всього отримано на стадії	505,2		
Стадія 5. Сушіння				

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.01.00 000 ПЗ

Арк.

36

	Витрачено:			
5.1	Вологий осад гепарозану	36,58	10,97	Вологість 70 %
	Отримано:			
5.2	Сухий гепарозан	10,4	10,4	Вологість 5 %, втрати 10 %
5.3	Втрати при сушінні	26,18	0,57	
	Всього отримано на стадії	36,58		

Таблиця 3.2

Загальний матеріальний баланс (на 1 м³ культуральної рідини)

Найменування	Витрачено, кг	Отримано, кг	Вміст гепарозану, кг	Вихід, %
Витрачено				
Компоненти поживного середовища	1100			
Посівний матеріал	55			
Вода для промивання	519,75			
Етанол (96 %)	378,9			
Всього витрачено	2053,65			
Отримано				
Гепарозан (сухий)		10,395	10,395	66,7
Біомаса (вологий осад)		69,3		
Ультрафільтрат + маточний розчин		1280	3,62	
Втрати (всі стадії)		684	1,58	10,1
Всього отримано		2053,65		

Загальний вихід гепарозану зі стандартною якістю після всіх стадій очищення та сушіння становить 66,7 %. На 1 м³ культуральної рідини виходить

10,4 кг сухого гепарозану. На серію 10 м³ можна отримати приблизно 104 кг готового гепарозану. Основні втрати відбуваються на стадіях фільтрування та осадження (біомаса + маточний розчин).

Витратний коефіцієнт за гепарозаном:

$$K_p = 198 \text{ кг компонентів середовища} / 1 \text{ кг гепарозану.}$$

Таблиця 3.3

Загальний матеріальний баланс серії (на 10 м³ культуральної рідини)

Найменування	Витрачено, кг	Отримано, кг	Вміст гепарозану, кг	Вихід, %
Витрачено				
Компоненти поживного середовища	1 000			
Посівний матеріал	550			
Вода для промивання	5197,5			
Етанол (96 %)	3789			
Всього витрачено	20536,5			
Отримано				
Гепарозан (сухий)		104	104	66,7
Біомаса (вологий осад)		693		
Ультрафільтрат + маточний розчин		12800	36,2	
Втрати (всі стадії)		6939	15,8	10,1
Всього отримано		20536,5		

Основні показники процесу (на 10 м³):

Кількість готового гепарозану 104 кг.

Загальний вихід гепарозану 66,7 %.

Витратний коефіцієнт (за гепарозаном): 198 кг компонентів середовища на 1 кг гепарозану.

Втрати гепарозану на всіх стадіях 10,1 %.

									Арк.
									38
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.01.00 000 ПЗ				

3.2 Розрахунок і вибір технологічного обладнання

Вибір технологічного обладнання для біотехнологічного виробництва субстанції гепарину натрію (гепарозану) виконано з урахуванням матеріального балансу, розрахованого в підрозділі 3.1, та прийнятої річної продуктивності. Приймаємо обсяг однієї серії - 10 м³ культуральної рідини після стадії біосинтезу.

Основним апаратом технологічного процесу є ферментер, в якому відбувається біосинтез гепарозану штамом *Escherichia coli* K5. Для виробництва гепарозану обрано ферментер періодичної дії з механічним перемішуванням і барботажною аерацією об'ємом 15 м³ (робочий об'єм - 12 м³) з можливістю точного контролю параметрів (температура, рН, розчинений кисень, швидкість перемішування); високою ефективністю масообміну; можливістю проведення стерилізації на місці (SIP) фірми BaiLun <https://fermentorchina.com/large-scale-bioreactor.html>.

Технічні характеристики обраного ферментера:

Параметр	Значення	Примітка
Загальний об'єм	15 м ³	
Робочий об'єм	12 м ³	
Висота циліндричної частини	3,2 м	H/D ≈ 2,5–3
Діаметр апарату	1,8 м	
Матеріал	AISI 316L	Харчова нержавіюча сталь
Перемішування	Механічна мішалка	2–3 яруси, 6-лопатева
Аерація	Барботер кільцевий	
Охолодження/обігрів	Рубашка + зміювик	
Стерилізація	SIP (на місці)	

Розрахунок кількості ферментерів

Розрахунок виконано за формулою для апаратів періодичної дії:

$$N = M_{зм} / (V * K_{ц})$$

де:

M_{зм} - кількість культуральної рідини, що переробляється за зміну, м³;

V - робочий об'єм ферментера, м³;

Кц - кількість циклів за зміну.

Обсяг однієї серії = 10 м³

Робочий об'єм ферментера = 12 м³

Тривалість циклу (біосинтез + підготовка) = 72 год

Кількість змін на добу = 1 (приймаємо)

Кількість циклів за зміну = 1

$$N = 10 / 12 * 1 = 0,83/$$

Приймаємо 1 ферментер об'ємом 15 м³.

Основні елементи конструкції:

Циліндричний корпус з еліптичним днищем і кришкою;

Рубашка обігріву/охолодження;

Внутрішній змішувач;

Механічна мішалка з 3 ярусами (нижній - турбінний, верхні - лопатеві);

Кільцевий барботер;

Система CIP/SIP;

Люк, оглядове скло, штуцери.

Штуцери:

Позначення	Призначення	Діаметр, мм	Кількість
A	Введення середовища	50	1
B	Виведення культуральної рідини	80	1
C	Подача повітря	40	1
D	Вихід відпрацьованого повітря	50	1
E	Введення пари (SIP)	40	1
F	Датчики (рН, DO, температура)		3
G	Люк	400	1

Технічна характеристика ферментера:

Загальний об'єм: 15 м³

Робочий об'єм: 12 м³

Матеріал: AISI 316L (внутрішня поверхня Ra ≤ 0,8 мкм)

Робочий тиск: від -0,1 до 0,3 МПа

Робоча температура: 10–50 °С

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

Швидкість обертання мішалки: 50–300 об/хв (регульована)

Перелік основного та допоміжного обладнання:

№	Найменування обладнання	Марка / Тип	Кількість, од.	Основні технічні характеристики
1	Ферментер	15 м ³ , механічне перемішування	1	Робочий об'єм 12 м ³ , AISI 316L, SIP
2	Посівний ферментер	0,5–1 м ³	1	Робочий об'єм 0,5 м ³
3	Ультрафільтраційна установка	TFF система	1	Площа мембран 10–20 м ²
4	Фільтр-прес / мембранний фільтр		1	Продуктивність 500–1000 л/год
5	Реактор для осадження	2 м ³	1	3 мішалкою та сорочкою
6	Вакуумна сушарка / Ліофілізатор		1	Продуктивність 50–100 кг/цикл
7	Ємність для приготування середовища	2 м ³	2	3 мішалкою
8	Ємність для посівного матеріалу	0,2 м ³	1	
9	Теплообмінник	Пластинчастий	2	
10	Насоси (перистальтичні, відцентрові)		6–8	

Час технологічного процесу (на одну серію):

Стадія	Тривалість, год	Примітка
Приготування посівного матеріалу	12	
Приготування поживного середовища	4	
Стерилізація ферментера та середовища	3	SIP
Біосинтез	48–60	Залежить від штаму
Фільтрування	4	
Ультрафільтрація	6	
Осадження	4	
Сушіння	12–24	Залежить від типу сушарки
Стандартизація та фасування	6	
Загальна тривалість циклу	100–120 год	

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

Розрахунок потужності приводу мішалки ферментера

Вихідні дані для розрахунку:

Параметр	Позначення	Значення	Одиниця виміру
Робочий об'єм ферментера	V	12	м ³
Діаметр апарату	D	1,8	м
Діаметр мішалки	d	0,6	м
Частота обертання мішалки	n	3,0 (180 об/хв)	об/с
Густина культуральної рідини	ρ	1020	кг/м ³
Динамічна в'язкість середовища	μ	0,0015	Па·с
Тип мішалки		6-лопатева турбінна	
Кількість ярусів мішалки		2	
Наявність аерації		Барботаж	

1. Визначення числа Рейнольдса для перемішування

$$Re_m = (\rho \cdot n \cdot d^2) / \mu$$

$$Re_m = (1020 \times 3 \times 0,6^2) / 0,0015 = 734400$$

$Re_m > 10^4$ - режим турбулентний. У цьому режимі критерій потужності N_p майже не залежить від числа Рейнольдса.

2. Визначення критерію потужності N_p

Для 6-лопатевої турбінної мішалки Рутона в турбулентному режимі без аерації: $N_p = 5,0 - 5,5$. Приймаємо $N_p = 5,2$.

3. Розрахунок потужності мішалки (без урахування аерації):

$$P = N_p \cdot \rho \cdot n^3 \cdot d^5$$

$$P = 5,2 \times 1020 \times 3^3 \times 0,6^5 = 5,2 \times 1020 \times 27 \times 0,07776 = 11140 \text{ Вт} = 11,14 \text{ кВт}$$

4. Врахування впливу аерації (барботажу)

При наявності аерації потужність, необхідна для перемішування, зменшується. Для турбулентного режиму вводять поправочний коефіцієнт f :

$$f = 0,7 \div 0,85 \text{ (залежить від інтенсивності аерації)}$$

Приймаємо $f = 0,78$:

$$P_{aer} = P \times f = 11,14 \times 0,78 = 8,7 \text{ кВт}$$

5. Потужність на одиницю об'єму

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		42

$$P / V = 8700 / 12 = 725 \text{ Вт/м}^3$$

Рекомендований діапазон для бактеріальних ферментацій: 300–1000 Вт/м³. Отримане значення знаходиться в оптимальному діапазоні.

6. Встановлена потужність приводу

З урахуванням:

ККД редуктора та муфти ($\eta = 0,85$)

Запасу потужності (20–30 %)

$$P_{\text{вст}} = (P_{\text{аер}} / \eta) \times 1,25 = (8,7 / 0,85) \times 1,25 = 12,8 \text{ кВт.}$$

Рекомендована встановлена потужність приводу мішалки 15 кВт (з запасом).

Привід рекомендується з частотним перетворювачем для регулювання швидкості обертання. Для зниження енерговитрат можна використовувати комбіновану систему перемішування (нижній ярус - турбінна мішалка, верхні лопатеві). При інтенсивній аерації ($v_s > 0,5 \text{ см/с}$) потужність можна зменшити ще на 10–15 %.

Розрахунок коефіцієнта масопередачі кисню $k_L a$

Коефіцієнт масопередачі кисню $k_L a$ є одним з ключових параметрів при проектуванні аеробних ферментацій. Він характеризує інтенсивність перенесення кисню з газової фази в рідину.

1. Визначення необхідного значення $k_L a$

Для штаму *Escherichia coli* K5, який синтезує гепарозан, приймаємо такі вихідні дані:

- Споживання кисню на утворення біомаси та продукту:
OUR (Oxygen Uptake Rate) = 80–120 ммоль O₂ / (л·год). Приймаємо OUR = 100 ммоль O₂ / (л·год) = 3,2 г O₂ / (м³·с)
- Критична концентрація розчиненого кисню для *E. coli*:
C_{crit} = 0,2–0,5 мг/л. Приймаємо 0,3 мг/л.
- Насичення киснем при 37 °С і атмосферному тиску:
C* = 6,5–7,0 мг/л. Приймаємо 6,8 мг/л.

									Арк.
									43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.01.00 000 ПЗ				

Необхідний коефіцієнт масопередачі:

$$k_{La} = OUR / (C^* - C_{crit}) = 3,2 / (6,8 - 0,3) = 0,49 \text{ с}^{-1} = 29,4 \text{ год}^{-1}.$$

Для забезпечення нормального росту культури необхідне значення k_{La} повинно бути не менше 25–30 год⁻¹.

2. Розрахунок k_{La} за емпіричною кореляцією

Для ферментерів з механічним перемішуванням і барботажною аерацією використовуємо кореляцію Van't Riet (1979), яка добре працює для води та слабов'язких середовищ:

$$k_{La} = 0,026 \cdot (P_g / V)^{0,4} \cdot v_s^{0,5}$$

де:

- k_{La} - коефіцієнт масопередачі, с⁻¹
- P_g - потужність перемішування при аерації, Вт
- V - об'єм рідини, м³
- v_s - поверхнева швидкість газу, м/с

Вихідні дані:

- Потужність перемішування при аерації (з попереднього розрахунку):

$$P_g = 8700 \text{ Вт}$$

- Об'єм рідини: $V = 12 \text{ м}^3$
- Питома потужність:

$$P_g / V = 8700 / 12 = 725 \text{ Вт/м}^3$$

- Поверхнева швидкість газу (при витраті повітря 0,5–1,0 vvm):

Приймаємо 0,8 vvm, тоді $v_s = 0,008 \text{ м/с}$ (для робочого об'єму 12 м³ і діаметра 1,8 м).

$$k_{La} = 0,026 \times (725)^{0,4} \times (0,008)^{0,5} = 0,026 \times 11,48 \times 0,0894 = 0,0267 \text{ с}^{-1} = 96 \text{ год}^{-1}$$

Обрані параметри перемішування та аерації забезпечують значний запас по масопередачі кисню. Це дозволяє вести процес при високій щільності клітин без кисневого голодування.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		44

Для гнучкого керування процесом рекомендується: змінювати швидкість обертання мішалки (100–250 об/хв); регулювати витрату повітря (0,3–1,2 vvm); підтримувати питому потужність у діапазоні 400–800 Вт/м³. При необхідності збільшення k_{La} до 120–150 год⁻¹ (для високопродуктивних штамів) можна підвищити частоту обертання мішалки до 220–250 об/хв.

Розчинність кисню в рідині є одним із ключових факторів, що визначають ефективність аеробних ферментацій. Температура суттєво впливає на цей показник.

Розчинність газів у рідинах зменшується зі збільшенням температури. Це пояснюється тим, що при підвищенні температури зростає кінетична енергія молекул газу, і вони легше виходять з розчину в газову фазу. Для кисню ця залежність є особливо важливою, оскільки його розчинність у воді відносно низька.

Значення насичення води киснем (C^*) при атмосферному тиску (101,3 кПа) і різних температурах:

Температура, °С	Розчинність кисню C^* , мг/л	Примітка
20	9,09	
25	8,26	
30	7,56	
37	6,80 – 7,00	Температура культивування <i>E. coli</i>
40	6,41	
45	5,95	

При підвищенні температури з 25 °С до 37 °С розчинність кисню зменшується приблизно на 15–18 %. При 37 °С (оптимальна температура для *E. coli* K5) кисню розчиняється значно менше, ніж при кімнатній температурі.

Розрахунок рушійної сили масопередачі при різних температурах
Припустимо, що критична концентрація кисню $C_{crit} = 0,3$ мг/л.

Температура	C*, мг/л	Рушійна сила (C* - Ccrit)	Відносна зміна
25 °C	8,26	7,96	100 % (база)
37 °C	6,90	6,60	83 %
40 °C	6,41	6,11	77 %

При 37 °C рушійна сила масопередачі кисню зменшується приблизно на 17 % порівняно з 25 °C. Це означає, що для підтримки того ж рівня забезпеченості киснем потрібно збільшувати коефіцієнт масопередачі k_La або інтенсивність аерації.

Для ферментації *E. coli* K5 при 37 °C рекомендується:

- Підтримувати k_La на рівні 80–120 год⁻¹ (з урахуванням зниженої розчинності кисню).
- Використовувати чистіший кисень (або повітря, збагачене киснем) при високій щільності клітин.
- Оптимізувати перемішування - підтримувати питому потужність P_g/V у діапазоні 500–800 Вт/м³.
- Уникати перегріву - навіть невелике підвищення температури до 39–40 °C може суттєво погіршити киснезабезпечення.
- Контролювати піноутворення - надмірна піна зменшує ефективну поверхню контакту газ-рідина.

3.3 Опис технологічного процесу

Технологічний процес виробництва субстанції гепарину натрію біотехнологічним методом базується на культивуванні штаму-продуцента *Escherichia coli* K5 з подальшим виділенням, очищенням та сушінням гепарозану. Процес розрахований на серію об'ємом 10 м³ культуральної

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						46
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

рідини після стадії біосинтезу, що відповідає економічно доцільному масштабу виробництва для вітчизняного фармацевтичного підприємства.

Стадія 1. Приготування посівного матеріалу

Отримання достатньої кількості активної посівної культури *E. coli* K5 для засіву основного ферментера.

Технологічний цикл розпочинається зі стадії приготування посівного матеріалу. Для цього в посівному ферментері об'ємом 0,5–1,0 м³ готують модифіковане LB-середовище, в яке вносять штам *E. coli* K5. Культивування проводять за температури $37 \pm 0,5$ °С, рН $7,0 \pm 0,2$ та аерації 0,5–1,0 vvm протягом 10–12 годин. На виході отримують 0,55 м³ посівного матеріалу з оптичною густиною 4–8 од. та кількістю життєздатних клітин не менше 10⁹ КУО/мл. Втрати на цій стадії становлять близько 5 %.

Надходить на стадію:

- Сухі компоненти посівного середовища (триптон, дріжджовий екстракт, NaCl, глюкоза) - згідно з рецептурою LB-середовища (див. підрозділ 2.2).
- Вода очищена.

Виходить зі стадії:

- Готовий посівний матеріал об'ємом 0,55 м³ (5 % від об'єму основного середовища).
- Втрати посівного матеріалу - 5 % (приблизно 0,0275 м³).

Параметри процесу:

- Температура: $37 \pm 0,5$ °С
- рН: $7,0 \pm 0,2$ (автоматичне регулювання)
- Тривалість: 10–12 годин
- Швидкість перемішування: 150–200 об/хв
- Аерація: 0,5–1,0 vvm

Обладнання: Посівний ферментер об'ємом 1,0 м³.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

Точки контролю якості:

- Кількість життєздатних клітин (КУО/мл) - не менше 10^9
- Чистота культури (мікроскопія + висів на живильні середовища)
- Оптична густина (OD_{600}) - 4–8 од.

Стадія 2. Приготування поживного середовища

Приготування стерильного хімічно визначеного гліцерин-вмісного середовища для основної ферментації.

Паралельно з вирощуванням посівного матеріалу здійснюють приготування поживного середовища для основної ферментації. Для цього використовують гліцерин-вмісне середовище, компоненти якого розчиняють у воді очищеній у ємностях об'ємом 2 м^3 . Загальний об'єм приготованого середовища становить 11 м^3 . Після приготування середовище подають у ферментер об'ємом 15 м^3 , де разом із посівним матеріалом проходить стерилізацію на місці (SIP) за температури $121 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 20–30 хвилин.

Надходить на стадію:

- Компоненти середовища (гліцерин - 25 кг/м^3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, фосфати, MgSO_4 , CaCl_2 , розчин мікроелементів) - на 11 м^3 середовища.
- Вода очищена.

Виходить зі стадії:

- Готове поживне середовище об'ємом 11 м^3 .

Параметри процесу:

- Температура приготування: 20–30 $^\circ\text{C}$
- рН середовища: $7,0 \pm 0,2$
- Перемішування: до повного розчинення компонентів

Обладнання: Ємності для приготування середовища об'ємом 2 м^3 (2 шт.).

Точки контролю якості:

- рН середовища

					<i>162.01.01.00 000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

- Концентрація основних компонентів (вибірково)
- Мікробіологічна чистота (після стерилізації).

Параметри процесу стерилізації:

- Температура стерилізації: 121 °С
- Тиск: 0,1–0,15 МПа
- Тривалість: 20–30 хв (залежно від об'єму)
- Охолодження до 37 °С

Обладнання: Ферментер 15 м³ з системою SIP.

Стадія 4. Біосинтез гепарозану (основна ферментація)

Накопичення гепарозану культурою *E. coli* K5.

Після охолодження до 37 °С у ферментер вносять посівний матеріал і розпочинають стадію біосинтезу гепарозану. Процес ферментації проводять у періодично-підживлювальному режимі за температури $37 \pm 0,5$ °С, рН $7,0 \pm 0,2$ (регулювання 25 % розчином амонію гідроксиду), розчиненим киснем не нижче 20–30 % та швидкістю перемішування 150–220 об/хв. Аерацію здійснюють стисненим повітрям із витратою 0,5–1,0 vvm. Тривалість біосинтезу становить 48–60 годин. На виході зі стадії отримують 10 м³ культуральної рідини, що містить близько 15,6 кг гепарозану. Втрати культуральної рідини на цій стадії (винос з відпрацьованими газами та механічні) становлять 10 %.

Надходить на стадію:

- Поживне середовище - 11 м³
- Посівний матеріал - 0,55 м³

Виходить зі стадії:

- Культуральна рідина - 10 м³ (з урахуванням втрат 10 %)
- Втрати з відпрацьованими газами та механічні - 1,1 м³

Параметри процесу:

- Температура: $37 \pm 0,5$ °С

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
						49
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- рН: $7,0 \pm 0,2$ (регулювання 25 % NH_4OH)
- Розчинений кисень (DO): не нижче 20–30 %
- Швидкість перемішування: 150–220 об/хв (регульована)
- Аерація: 0,5–1,0 vvm
- Тривалість: 48–60 годин
- Тиск у ферментері: 0,05–0,1 МПа (надлишковий)

Обладнання: Ферментер 15 м³.

Точки контролю якості:

- Концентрація гепарозану (кожні 6–8 годин)
- Оптична густина (OD_{600})
- рН, температура, DO, швидкість перемішування
- Мікробіологічна чистота (вибірково)

Стадія 5. Фільтрування культуральної рідини

Відділення біомаси від культуральної рідини.

Після завершення біосинтезу культуральну рідину направляють на стадію фільтрування для відділення біомаси. Процес здійснюють на мембранному фільтрі або фільтр-пресі з попередньою промивкою осаду водою (гідромодуль 1:0,5). На цій стадії отримують 13,5 м³ фільтрату, що містить 14,35 кг гепарозану, та 693 кг вологого осаду біомаси. Втрати гепарозану на стадії фільтрування становлять близько 8 %.

Надходить на стадію:

- Культуральна рідина - 10 м³
- Вода для промивання - 5 м³

Виходить зі стадії:

- Фільтрат - 13,5 м³
- Вологий осад (біомаса) - 693 кг
- Втрати - 1,5 м³

Параметри процесу:

					<i>162.01.01.00 000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		50

- Тиск фільтрування: 0,2–0,4 МПа
- Температура: 20–30 °С

Обладнання: Мембранний фільтр або фільтр-прес.

Точки контролю якості:

- Вміст гепарозану у фільтраті
- Вологість осаду

Стадія 6. Ультрафільтрація (концентрування)

Концентрування гепарозану та видалення низькомолекулярних домішок.

Далі фільтрат подають на ультрафільтрацію для концентрування гепарозану та видалення низькомолекулярних домішок. Концентрування проводять у 10 разів на установці тангенціальної фільтрації (ТФФ). На виході отримують 1,215 м³ ультраконцентрату, що містить 12,91 кг гепарозану. Втрати продукту на цій стадії становлять 10 %.

Надходить на стадію:

- Фільтрат - 13,5 м³

Що виходить зі стадії:

- Ультраконцентрат - 1,215 м³ (ступінь концентрування ×10, втрати 10 %)
- Ультрафільтрат - 12,15 м³

Параметри процесу:

- Тиск: 0,2–0,5 МПа
- Температура: 20–30 °С

Обладнання: Ультрафільтраційна установка (ТФФ).

Точки контролю якості:

- Концентрація гепарозану в концентраті
- Об'єм ультрафільтрату

Стадія 7. Осадження гепарозану

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

Виділення гепарозану з розчину.

На наступній стадії здійснюють осадження гепарозану шляхом додавання трикратного об'єму 96 % етанолу за температури 4–10 °С з витримкою протягом 4–6 годин. Після осадження отримують 365,8 кг вологого осаду, що містить 10,97 кг гепарозану. Втрати продукту на стадії осадження становлять 15 %.

Надходить на стадію:

- Ультраконцентрат - 1,215 м³
- Етанол 96 % - 3,645 м³

Виходить зі стадії:

- Вологий осад гепарозану - 365,8 кг
- Маточний розчин - 4,5 м³

Параметри процесу:

- Температура: 4–10 °С
- Час витримки: 4–6 годин

Обладнання: Реактор з мішалкою об'ємом 5–6 м³.

Стадія 8. Сушіння

Отримання сухого гепарозану.

Останньою стадією є сушіння вологого осаду гепарозану. Процес проводять у вакуумній сушарці або ліофілізаторі за температури 40–50 °С до досягнення вологості готового продукту не більше 5 %. На виході отримують 104 кг сухого гепарозану з урахуванням втрат 10 % на стадії сушіння. Загальний вихід гепарозану за весь технологічний цикл становить 66,7 %.

Надходить на стадію:

- Вологий осад гепарозану - 365,8 кг

Виходить зі стадії:

- Сухий гепарозан - 104 кг (вологість 5 %, втрати 10 %)

Параметри процесу:

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

- Температура сушіння: 40–50 °С (вакуумна сушарка) або ліофілізація
- Тиск: 0,01–0,05 МПа

Обладнання: Вакуумна сушарка або ліофілізатор.

Точки контролю якості:

- Вологість готового продукту
- Вміст гепарозану

Стадія 9. Фасування та пакування

Отримання готової субстанції у споживчій тарі.

Після сушіння сухий гепарозан направляють на стадію фасування та пакування в герметичні контейнери або пакети з алюмінієвої фольги. Втрати на цій стадії становлять 1 %. Готовий продукт підлягає вхідному контролю якості відповідно до вимог ДФУ та внутрішньої нормативної документації.

Надходить на стадію:

- Сухий гепарозан - 104 кг

Виходить зі стадії:

- Фасований гепарозан - 103 кг (втрати 1 %)

Обладнання: Фасувальна лінія, пакувальне обладнання.

Точки контролю якості:

- Маса нетто
- Герметичність упаковки
- Маркування

Загальна тривалість технологічного циклу однієї серії становить приблизно 100–120 годин, з яких основну частину часу займає стадія біосинтезу. Процес характеризується високим рівнем автоматизації контролю параметрів (температура, рН, розчинений кисень, швидкість перемішування) та відповідає вимогам GMP. Використання хімічно визначеного середовища та періодично-підживлювального режиму ферментації забезпечує

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

відтворюваність якісних показників продукту та можливість масштабування виробництва.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54

3.4 Схеми виробництва

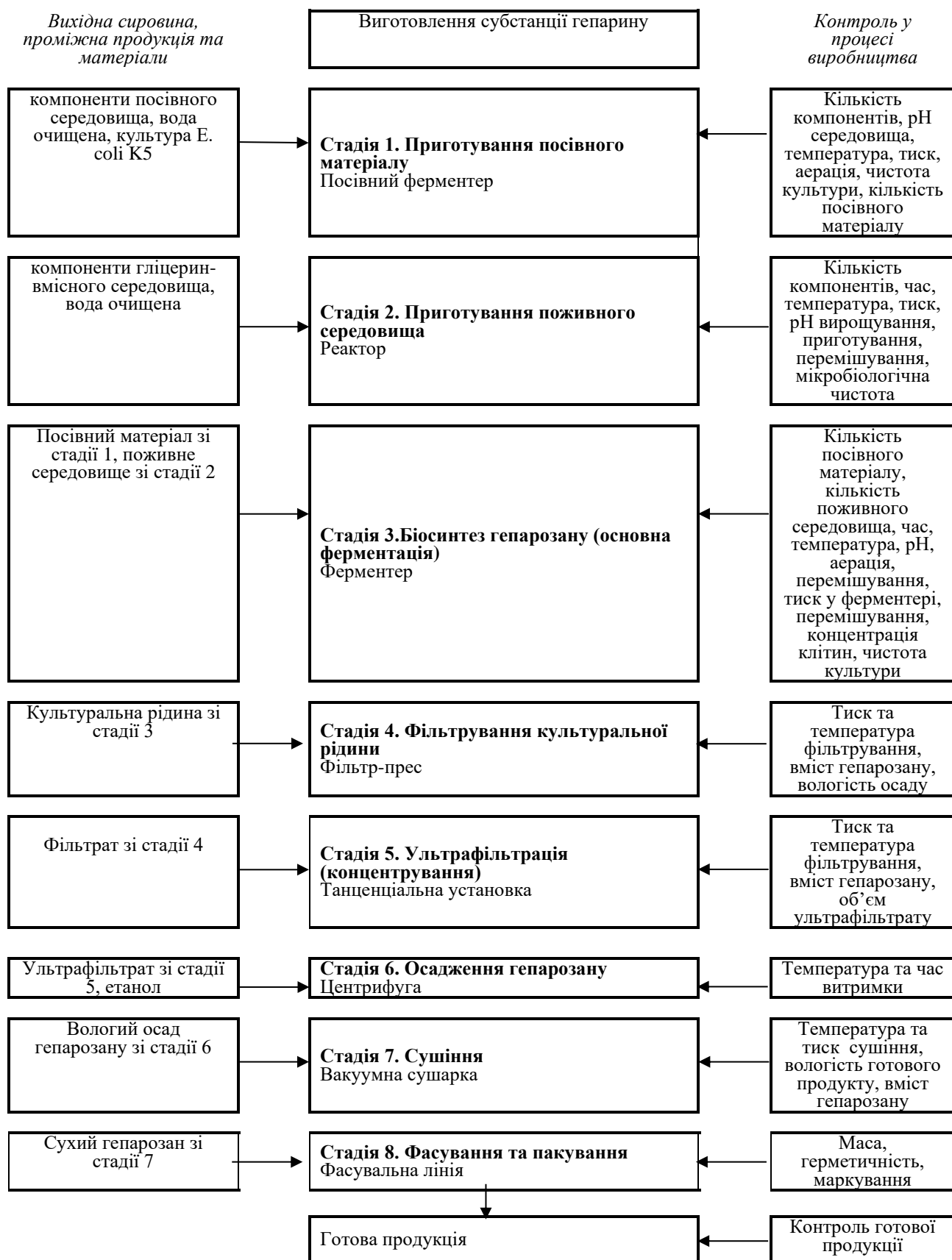


Рис. 3.1 – Технологічна схема виробництва субстанції гепарину

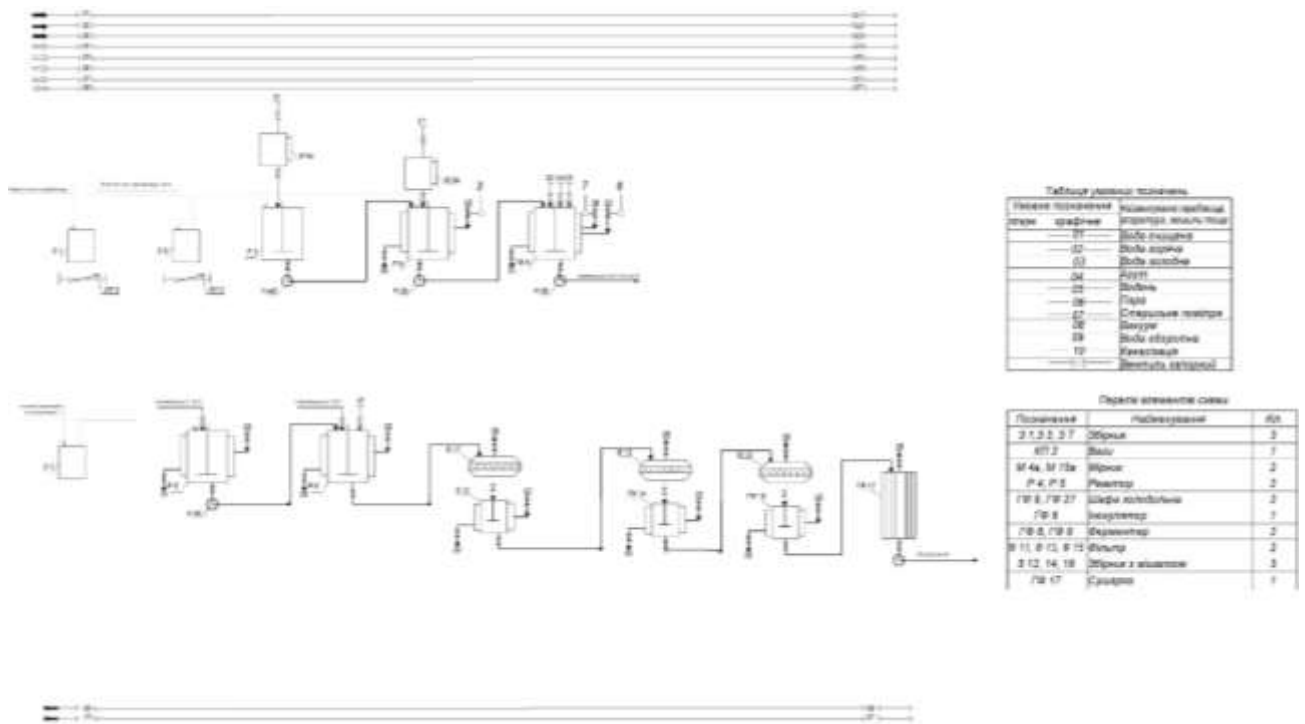


Рис. 3.2 – Апаратурна схема виробництва субстанції гепарину

Специфікація основного технологічного обладнання

Стадія процесу	Найменування обладнання	Технічна характеристика	Кіл.	Призначення
Приготування посівного матеріалу	Посівний ферментер	V _{ном} = 500 л, матеріал AISI 316L, механічна мішалка, система SIP, контроль pH, DO, T	1 шт.	Вирощування та підготовка посівного матеріалу <i>E. coli</i> K5
Приготування поживного середовища	Реактор-змішувач	V _{ном} = 2000 л, матеріал AISI 316L, сорочка обігріву/охолодження, якорна мішалка, SIP	2 шт.	Приготування та стерилізація поживного середовища
Стерилізація	Стерилізаційна установка (SIP-станція)	Автоматична система подачі пари, конденсату та охолодження, програмне керування	1 компл.	Стерилізація ферментера, трубопроводів та середовища
Біосинтез (ферментація)	Виробничий ферментер	V _{ном} = 15000 л (робочий об'єм 12000 л), матеріал AISI 316L, механічна мішалка	1 шт.	Основне культивування <i>E. coli</i> K5 та синтез гепарозану

		(3 яруси), барботер, сорочка + змійовик, система автоматичного контролю рН, DO, Т, тиску, ваги		
Фільтрування культуральної рідини	Мембранна фільтраційна установка	Картриджі 0,45 + 0,22 мкм, корпус з нержавіючої сталі, робочий тиск до 4 бар	1 шт.	Відділення біомаси від культуральної рідини
Концентрування гепарозану	Ультрафільтрацій на установка (TFF)	Площа мембран 15–20 м ² , молекулярна маса відсічення 10–30 кДа, автоматичне керування	1 шт.	Концентрування гепарозану та видалення низькомолекулярних домішок
Осадження гепарозану	Реактор для осадження	V _{ном} = 5000 л, матеріал AISI 316L, якірна мішалка, сорочка охолодження, вибухозахист	1 шт.	Осадження гепарозану етанолом
Сушіння	Вакуумна сушарка / Ліофілізатор	Площа полиць 8–10 м ² , конденсор на 100–150 кг льоду, вакуум ≤ 0,1 мбар, система СІР	1 шт.	Отримання сухого гепарозану (вологість ≤ 5 %)
Фасування	Фасувальна станція порошків	Продуктивність 50–100 кг/год, точність дозування ±1 %, герметичне виконання	1 шт.	Фасування сухого гепарозану в контейнери
Зберігання та транспортування	Ємності для зберігання готового продукту	V = 100–200 л, матеріал AISI 316L, герметичне виконання	4 шт.	Зберігання готової субстанції перед фасуванням

3.5 Критичні параметри виробництва

З метою забезпечення стабільності технологічного процесу та гарантованої якості продукції проведено аналіз критичних точок контролю відповідно до вимог Настанови МОЗ України СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020. До переліку критичних точок включено лише ті стадії та параметри, які безпосередньо впливають на хід процесу та якість готового продукту.

Контроль критичних стадій і проміжної продукції

№	Критична стадія / операція	Критичні параметри та характеристики якості	Одиниця виміру	Критерій прийнятності	Метод контролю	Періодичність контролю
1	Приготування та стерилізація посівного матеріалу	Температура, рН, кількість життєздатних клітин, чистота культури	°С, од., КУО/мл	$37 \pm 0,5$ °С; рН $7,0 \pm 0,2$; $\geq 10^9$ КУО/мл; відсутність контамінантів	Термометрія, рН-метрія, висів на середовища	Кожна партія
2	Стерилізація поживного середовища	Температура, тиск, час стерилізації	°С, МПа, хв	121 °С; $0,1-0,15$ МПа; $20-30$ хв	Прилади контролю	Кожна партія
3	Біосинтез гепарозану	Температура, рН, розчинений кисень (DO), швидкість перемішування, концентрація гепарозану	°С, од., %, об/хв, г/л	$37 \pm 0,5$ °С; рН $7,0 \pm 0,2$; DO ≥ 20 %; $150-220$ об/хв; ≥ 14 г/л	Датчики, HPLC, спектрофотометрія	Кожні 4–6 годин
4	Фільтрування культуральної рідини	Вміст гепарозану у фільтраті, вологість осаду	г/л, %	Втрати гепарозану ≤ 10 %; вологість осаду ≤ 85 %	HPLC, гравіметрія	Кожна партія
5	Ультрафільтрація	Ступінь концентрування, вміст гепарозану в концентраті	рази, г/л	Ступінь концентрування ≥ 9 ; втрати ≤ 12 %	HPLC, рефрактометрія	Кожна партія
6	Осадження гепарозану	Температура, час витримки, вихід гепарозану	°С, год, %	$4-10$ °С; $4-6$ год; вихід ≥ 80 %	Гравіметрія	Кожна партія
7	Сушіння	Температура, тиск, вологість	°С, МПа, %	Вологість ≤ 5 %; втрати ≤ 12 %	Термометрія, вакуумметр, вологомір	Кожна партія
8	Мікробіологічна чистота	Мікробіологічна чистота	КУО/мл, КУО/мл	Відповідно до вимог ДФУ	Мікробіологічний аналіз	Згідно з графіком

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

3.6 Екологічні аспекти виробництва

Виробництво субстанції гепарину натрію біотехнологічним методом з використанням штаму *E. coli* K5 характеризується відносно низьким рівнем негативного впливу на навколишнє природне середовище порівняно з традиційними хімічними технологіями. Проте на різних стадіях процесу утворюються відходи, стічні води та газоповітряні викиди, які потребують належного поводження з метою мінімізації екологічного навантаження.

Основним твердим відходом виробництва є біомаса *E. coli* K5, що утворюється на стадії фільтрування культуральної рідини. На одну серію об'ємом 10 м³ культуральної рідини утворюється приблизно 693 кг вологого осаду біомаси. Цей відхід є органічним за своєю природою і містить залишкові кількості поживних речовин. За умови належної термічної обробки або хімічного знешкодження біомаса може бути використана як органічне добриво або сировина для виробництва біогазу методом анаеробного зброджування. У разі неможливості такого використання відхід підлягає термічній утилізації на спеціалізованих підприємствах.

На стадії ультрафільтрації та осадження гепарозану утворюються рідкі відходи - ультрафільтрат та маточний розчин після осадження етанолом. Загальний обсяг рідких відходів на одну серію становить близько 12–13 м³. Ці стоки характеризуються підвищеним вмістом органічних речовин, залишків етанолу та солей. Для їх очищення доцільно застосовувати комбіновану схему, що включає попереднє фізико-хімічне очищення (нейтралізацію, коагуляцію) з подальшим біологічним очищенням на локальних очисних спорудах підприємства або передачею на міські очисні споруди. Відпрацьований етанол, що міститься в маточному розчині, може бути регенований методом ректифікації з подальшим використанням у технологічному процесі, що дозволить суттєво зменшити витрати на закупівлю розчинника та знизити обсяг небезпечних відходів.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		59

Газоповітряні викиди утворюються переважно на стадії біосинтезу та сушіння. Під час ферментації з ферментера викидається відпрацьоване повітря, що містить діоксид вуглецю, водяну пару та незначну кількість летких органічних сполук. Для очищення цього повітря рекомендується використовувати систему мокрої абсорбції або біофільтри. На стадії сушіння можливе утворення парів етанолу, які підлягають уловлюванню та конденсації з подальшою регенерацією. Загальний обсяг газоповітряних викидів є помірним і за умови належного очищення не створює значного негативного впливу на атмосферне повітря.

Важливим аспектом екологічної безпеки виробництва є також поводження з промивними водами, що утворюються під час проведення СІР-очищення обладнання. Ці стоки містять залишки мийних та дезінфікуючих засобів і потребують нейтралізації перед скиданням у систему каналізації.

З метою мінімізації утворення відходів та підвищення екологічної ефективності виробництва доцільно впроваджувати принципи циркулярної економіки. Зокрема, біомасу після відповідної обробки можна розглядати як потенційну сировину для виробництва кормових добавок або органічних добрив. Регенерація етанолу дозволить зменшити як витрати на сировину, так і обсяг небезпечних рідких відходів. Крім того, впровадження системи замкнутого водообігу на стадіях промивки та очищення обладнання сприятиме зниженню споживання води та обсягу стічних вод.

Таким чином, екологічні аспекти виробництва гепарозану є керованими. При дотриманні сучасних вимог до поводження з відходами та впровадженні заходів з їх мінімізації та утилізації негативний вплив на навколишнє природне середовище може бути зведений до мінімуму. Використання біотехнологічного підходу порівняно з традиційним хімічним синтезом або екстракцією з тваринної сировини є більш екологічно безпечним, оскільки дозволяє зменшити споживання органічних розчинників та уникнути ризиків, пов'язаних з використанням тваринної сировини.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

ВИСНОВОК

У кваліфікаційній роботі було обґрунтовано та розроблено технологічні рішення щодо організації біотехнологічного виробництва субстанції гепарину натрію з використанням штаму *Escherichia coli* K5.

Метою роботи було вдосконалення виробництва гепарину шляхом переходу від традиційної технології екстракції з тваринної сировини до мікробного синтезу гепарозану з подальшим його виділенням та очищенням. Для досягнення мети було вирішено комплекс взаємопов'язаних завдань.

У результаті проведеного аналізу науково-технічної літератури та патентної інформації було обґрунтовано доцільність використання штаму *E. coli* K5 як продуцента гепарозану. Встановлено, що цей штам здатний накопичувати гепарозан у культуральній рідині в концентраціях, достатніх для промислової реалізації процесу. На підставі порівняльного аналізу різних джерел вуглецю обрано гліцерин як основний компонент поживного середовища, що забезпечує вищий вихід продукту та меншу інтенсивність утворення ацетату порівняно з глюкозою.

Розроблено склад гліцерин-вмісного середовища, який забезпечує стабільний ріст культури та накопичення гепарозану. Обґрунтовано параметри процесу ферментації: температуру $37 \pm 0,5$ °C, рН $7,0 \pm 0,2$, рівень розчиненого кисню не нижче 20–30 % та режим періодично-підживлювальної ферментації з експоненціальною подачею субстрату.

Виконано продуктовий розрахунок та складено матеріальний баланс процесу на серію об'ємом 10 м³ культуральної рідини. Встановлено, що загальний вихід гепарозану за повним технологічним циклом становить 66,7 %. Розрахований витратний коефіцієнт та визначено основні статті втрат продукту на різних стадіях.

Здійснено вибір та розрахунок технологічного обладнання. Основним апаратом процесу обрано ферментер об'ємом 15 м³ (робочий об'єм 12 м³) з

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

механічним перемішуванням та барботажною аерацією. Проведено розрахунок потужності приводу мішалки та коефіцієнта масопередачі кисню, що підтвердило достатність обраних режимів аерації та перемішування.

Розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва, що включають стадії приготування посівного матеріалу, ферментації, фільтрування, ультрафільтрації, осадження та сушіння гепарозану. Визначено критичні точки процесу та сформовано систему контролю якості на кожній стадії, що забезпечує мікробіологічну безпеку та стабільність якісних показників продукту.

Проведено екологічну оцінку технології. Встановлено, що основними відходами виробництва є біомаса *E. coli* K5 та рідкі стоки після ультрафільтрації та осадження. Запропоновано раціональні напрямки поводження з відходами, зокрема можливість регенерації етанолу та використання біомаси як сировини для інших виробництв.

Таким чином, у результаті виконання роботи розроблено комплекс технологічних рішень, що дозволяють організувати промислове виробництво субстанції гепарину біотехнологічним методом. Отримані результати можуть бути використані при проектуванні або модернізації біотехнологічних виробництв на вітчизняних фармацевтичних підприємствах, сприяючи імпортозаміщенню критично важливого лікарського засобу та підвищенню національної лікарської безпеки.

Перспективами подальших досліджень є оптимізація процесу ензиматичної модифікації гепарозану до фармацевтично активного гепарину, а також дослідження можливості створення штамів з підвищеною продуктивністю та зниженим рівнем імуногенності продукту.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Стасевич М. В., Зварич В. І. Асортимент антитромботичних засобів: аналіз ринку, хімічної будови та перспективи створення нових препаратів. *Chemistry, Technology and Application of Substances*. 2021. Vol. 4, № 2. Р. 91–105. DOI: 10.23939/ctas2021.02.091.

2. Гепарин-Дарниця (гель 600 МО/г) / ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця». URL: <https://darnytsia.ua/catalog/geparin-darnitsya> (дата звернення: 02.04.2026).

3. Лікарські засоби. Належна виробнича практика : Настанова СТ-Н-МОЗУ-42-4.0:2020. URL: https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2020/05/%D0%9D%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0-%D0%A1%D0%A2-%D0%9D-%D0%9C%D0%9E%D0%97%D0%A3-42-4.0_2020.pdf (дата звернення: 02.04.2026).

4. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. 1. Ферментація. Львів : Львів. політехніка, 2004. 240 с.

5. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. 2. Обробка культуральних рідин. Львів : Львів. політехніка, 2004. 296 с.

6. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. 3. Основи проектування мікробіологічних виробництв. Львів : Львів. політехніка, 2004. 252 с.

7. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ–2000, 2018. 410 с.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

8. Baytas S. N., Linhardt R. J. Advances in the preparation and synthesis of heparin and related products. *Drug. Discov. Today*. 2020. Vol. 25(12). P. 2095–2109. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.09.011.

9. Aspirin versus low-molecular-weight heparin for thromboprophylaxis after orthopaedic surgery: a systematic review and meta-analysis / H. Wu et al. *Blood. Coagul. Fibrinolysis*. 2024. Vol. 35(4). P. 187–195. DOI: 10.1097/MBC.0000000000001300.

10. Sultana R., Kamihira M. Bioengineered heparin: Advances in production technology. *Biotechnology Advances*. 2024. Vol. 77. P. 108456. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2024.108456.

11. Biomedical applications of engineered heparin-based materials / E. N. Zare et al. *Bioactive Materials*. 2023. Vol. 31. P. 87–118. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.08.002.

12. Biosynthetic production of anticoagulant heparin polysaccharides through metabolic and sulfotransferases engineering strategies / J. Q. Deng et al. *Nat. Commun*. 2024. Vol. 15(3755). DOI: 10.1038/s41467-024-48193-5.

13. Comparison of direct oral anticoagulants versus low-molecular-weight heparin in primary and metastatic brain cancers: a meta-analysis and systematic review / V. Iyengar et al. *J. Thromb. Haemost.* 2024. Vol. 22(2). P. 423–429. DOI: 10.1016/j.jtha.2023.10.011.

14. Draft Guidance on Heparin Sodium / U.S. Food and Drug Administration. 2022. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/p_sg/PSG_017029.pdf (Date of access: 02.04.2026).

15. FDA encourages reintroduction of bovine-sourced heparin / U.S. Food and Drug Administration. URL: <https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/fda-encourages-reintroduction-bovine-sourced-heparin> (Date of access: 02.04.2026).

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		64

16. From Farm to Pharma: An Overview of Industrial Heparin Manufacturing Methods / J. Y. van der Meer et al. *Molecules*. 2017. Vol. 22(6). P. 1025. DOI: 10.3390/molecules22061025.

17. General Considerations for Diversifying Heparin Drug Products by Improving the Current Heparin Manufacturing Process and Reintroducing Bovine Sourced Heparin to the US Market / A. Al-Hakim et al. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2021. Vol. 27. P. 10760296211052293.2021.

18. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing low-molecular-weight-heparins / European Medicines Agency. 2016. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products-containing-low-molecular-weight-heparins-scientific-guideline> (Date of access: 02.04.2026).

19. Heparin Extraction. DuPont™ AmberLite™ FPA98 Cl Ion Exchange Resin for Crude and Fine Heparin. URL: <https://www.dupont.com/content/dam/water/amer/us/en/water/public/documents/en/IER-AmberLite-FPA98-Cl-IER-Heparin-Extraction-Br-45-D04430-en.pdf> (Date of access: 02.04.2026).

20. Heparin resistance management during cardiac surgery: a literature review and future directions / S. P. Butt et al. *J. Extra Corpor. Technol.* 2024. Vol. 56. P. 136–144. DOI: 10.1051/ject/2024015.

21. Heparin-Containing Medical Devices and Combination Products: Recommendations for Labeling and Safety Testing / U.S. Food and Drug Administration. 2018. URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/heparin-containing-medical-devices-and-combination-products-recommendations-labeling-and-safety> (Date of access: 02.04.2026).

22. Heparin for Drug and Medical Device Use: Monitoring Crude Heparin Quality / U.S. Food and Drug Administration. 2018. URL:

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		65

<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/heparin-drug-and-medical-device-use-monitoring-crude-heparin-quality> (Date of access: 02.04.2026).

23. Low molecular weight heparin decreases mortality and major complication rates in moderately severe and severe acute pancreatitis – a systematic review and meta-analysis / C. Patoni et al. *Front Med. (Lausanne)*. 2023. Vol. 10. P. 1241301. DOI: 10.3389/fmed.2023.1241301.

24. Multifaceted Heparin: Diverse Applications beyond Anticoagulant Therapy / R. Sultana et al. *Pharmaceuticals*. 2024. Vol. 17(10). P. 1362. DOI: 10.3390/ph17101362.

25. Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system / Kishimoto T.K., Viswanathan K., Ganguly T. et al. *New England Journal of Medicine*. 2008. Vol. 359, № 25. P. 2674–2684. DOI: 10.1056/NEJMoa0803200.

26. Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin / Blossom D.B., Kallen A.J., Patel P.R. et al. *New England Journal of Medicine*. 2008. Vol. 359, № 25. P. 2684–2693. DOI: 10.1056/NEJMoa0806450.

27. U.S. Government Accountability Office (GAO). Response to Heparin Contamination Helped Protect Public Health, but Some Agency Actions Were Limited : Report to the Ranking Member, Committee on Energy and Commerce, House of Representatives. Washington, DC : GAO, 2010. 59 p. URL: <https://www.gao.gov/assets/gao-11-95.pdf>

28. Pharmacology of Heparin and Related Drugs: An Update / J. Hogwood et al. *Pharmacol. Rev.* 2023. Vol. 75(2). P. 328–379. DOI: 10.1124/pharmrev.122.000684.

29. Protamine and Heparin Interactions: A Narrative Review / M. Crivellari et al. *Ann. Card. Anaesth.* 2024. Vol. 27(3). P. 202–212. DOI: 10.4103/aca.aca_117_23.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

30. Strategies involving low-molecular-weight heparin for the treatment and prevention of venous thromboembolism in patients with obesity: A systematic review and meta-analysis / J. Liu et al. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023. Vol. 14. P. 1084511. DOI: 10.3389/fendo.2023.1084511.

31. Synthesis of bioengineered heparin chemically and biologically similar to porcine-derived products and convertible to low MW heparin / M. Douaisi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2024. Vol. 121(14). P. e2315586121. DOI: 10.1073/pnas.2315586121.

					162.01.01.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

ДОДАТКИ



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ГРАМОТА

нагороджується

БЕЗРУК Богдан

за участь у секційному засіданні студентського наукового
товариства кафедри
біотехнології

**XXXII МІЖНАРОДНОЇ НАУКОВО-ПРАКТИЧНОЇ
КОНФЕРЕНЦІЇ
МОЛОДИХ ВЧЕНИХ ТА СТУДЕНТІВ
«АКТУАЛЬНІ ПИТАННЯ СТВОРЕННЯ НОВИХ
ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ»**

Ректор закладу
вищої освіти



Олександр КУХТЕНКО

15 квітня 2026 р. м. Ужгород



Попри величезний потенціал, генна терапія та редагування геному мають і свої виклики. Одним із ключових питань є безпека технології. У процесі редагування можуть виникати помилки, які призводять до небажаних змін у ДНК. Це може мати серйозні наслідки, зокрема сприяти розвитку нових захворювань. Крім того, постають етичні питання: чи припустимо змінювати геном для немедичних цілей, наприклад, для покращення зовнішності або розумових здібностей?

Законодавче регулювання використання CRISPR також перебуває на етапі формування. У багатьох країнах існують суворі обмеження на генетичні експерименти, особливо ті, що стосуються змін геному ембріонів. Однак у деяких країнах вже з'являються програми, спрямовані на впровадження цієї технології у медичну практику.

Цей метод прискорить усі види досліджень – від створення генетично модифікованих моделей людських хвороб у тварин до пошуку мутацій ДНК, які провокують виникнення захворювань або, навпаки, захищають від них.

Висновки. Попри всі виклики, генна терапія та редагування геному відкривають неймовірні можливості для лікування хвороб, які вражали людство століттями. Це одна з найбільш багатообіцяючих галузей медицини, яка не лише змінить підходи до лікування, а й допоможе краще зрозуміти механізми роботи нашого організму. Завдяки розвитку CRISPR, науковці роблять великі кроки до створення майбутнього, де багато спадкових та невиліковних захворювань залишаться в минулому. Молекулярні ножиці дають змогу науковцям замінити пошкоджений ген, що є причиною захворювання, на правильну його копію, потенційно перетворюючи клітину на здорову. Наразі у світі проводиться багато тестів щодо ефективності CRISPR-Cas9 для лікування захворювань крові, шкіри, м'язової дистрофії тощо.

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ У ВИРОБНИЦТВІ СУБСТАНЦІ ГЕПАРИНУ

Безрук Б.В.

Науковий керівник: Калюжня О.С.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

kalyuzhnyao.s@gmail.com

Вступ. Гепарин є одним із найважливіших антикоагулянтів прямої дії, який широко застосовується в кардіології, хірургії, гемодіалізі та профілактиці тромбозів. На сьогодні основним промисловим джерелом гепарину залишається екстракція з слизової оболонки кишкового свиної, що забезпечує значну частину світового обсягу виробництва. Однак такий традиційний спосіб має суттєві недоліки: залежність від тваринних джерел створює ризики контамінації патогенами, вірусами та пріонами, призводить до варіабельності якості та молекулярної маси продукту, а також робить ланцюг постачання вразливим до епізоотій та геополітичних факторів. Крім того, зростає етична та екологічна стурбованість щодо масштабного використання тварин у фармацевтичному виробництві. У зв'язку з цим актуальним є розвиток сучасних біотехнологічних підходів, які дозволяють отримувати субстанцію гепарину (або його аналоги) без використання тваринних матеріалів. Такі методи включають метаболічну інженерію мікроорганізмів, хемоферментативний синтез та генетичну модифікацію клітин ссавців, що відкриває перспективи створення безпечного, стандартизованого та масштабованого виробництва безтваринного гепарину.

Мета дослідження. Метою роботи є аналіз сучасних біотехнологічних підходів до виробництва субстанції гепарину, обґрунтування перспективних стратегій заміни

традиційного тваринного джерела на біотехнологічні методи та оцінка їхніх переваг і обмежень для промислового застосування.

Матеріали та методи. Дослідження базується на аналізі наукової літератури з баз PubMed, ScienceDirect та патентних даних.

Результати дослідження. Традиційне виробництво гепарину залежить від переробки великої кількості свинячих кишок, що робить процес вразливим до ризиків забруднення (як у випадку з кризою 2008 року через контамінацію осульфатованим хондроїтином). Біотехнологічні альтернативи починаються з бактеріального синтезу гепарозану – нессульфатованого прекурсора гепарину, який продукується капсульним полісахаридом *E. coli* K5. Метаболічна інженерія цього штаму дозволяє отримувати гепарозан у значних кількостях. Далі за допомогою рекомбінантних ферментів (N-деацетилаза/N-сульфотрансфераза, C5-епімерази, O-сульфотрансферази) здійснюється послідовна модифікація: N-сульфатування, епізомеризація глюкуронової кислоти в ідуранову та O-сульфатування в позиціях 2, 6 і 3. Дослідження показують, що хемоферментативний підхід дозволяє синтезувати біоінженерний гепарин (bioengineered heparin, BEN), структурно та функціонально близький до фармакопейного свинячого гепарину, з анти-FXa активністю до 246 МО/мг. Генетична модифікація клітин CHO шляхом експресії ключових ферментів (зокрема HS3ST1 та NDST2) дає змогу отримувати гепариноподібні глікозамінолікани безпосередньо в культурі клітин ссавців, хоча вихід і ступінь сульфатування поки що нижчі, ніж у тваринного продукту. Використання дріжджових систем (*Pichia pastoris*) знижує вартість культивування порівняно з клітинами ссавців.

Перевагами біотехнологічних методів є відсутність ризику зоонозних інфекцій, вища стандартизованість структури, можливість контролю молекулярної маси (для отримання низькомолекулярних гепаринів) та етичність виробництва. Обмеженнями залишаються складність повного відтворення специфічного сульфатного патерну, висока вартість ферментів та необхідність подальшої оптимізації для промислового масштабування.

Висновки. Біотехнологічні підходи, зокрема метаболічна інженерія бактерій для синтезу гепарозану з подальшою хемоферментативною модифікацією та генетична модифікація клітин ссавців і дріжджів, представляють перспективну альтернативу традиційному тваринному виробництву гепарину, дозволяючи отримати субстанцію без ризику контамінації, з вищою стандартизованістю та кращою відтворюваністю якості. Подальший розвиток цих технологій з акцентом на підвищення виходу, оптимізацію сульфатування та зниження собівартості відкриває можливості для створення надійного, безпечного та незалежного від тваринних джерел виробництва гепарину, що є важливим кроком до модернізації фармацевтичної промисловості.

ІМУННА МОДИФІКАЦІЯ ЧЕРЕЗ ПЕПТИД: НАУКОВИЙ ШЛЯХ ВІД ТИМУСУ ДО ZADAXIN®

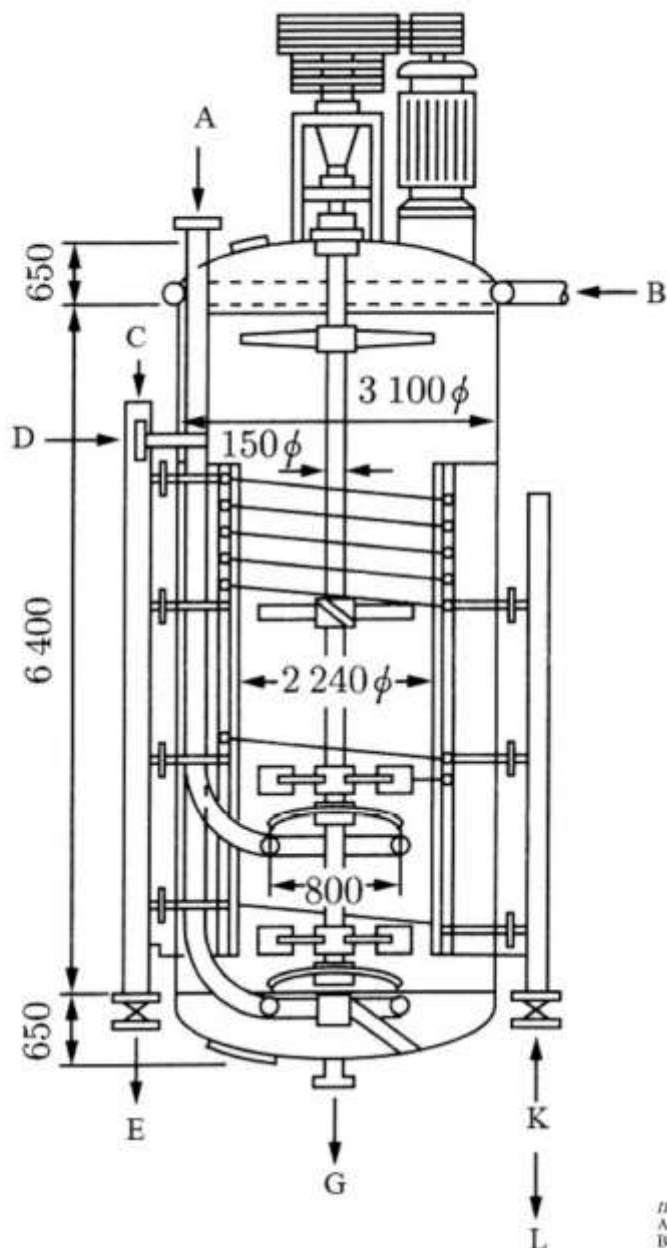
Внукова Д.О.

Науковий керівник: Калужная О.С.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

cemeterydate@gmail.com

Вступ. Імуномодулятори відіграють важливу роль у регуляції імунної відповіді організму при різних патологічних станах. Одним із таких препаратів є Zadaxin® - синтетичний пептид тимальфазин, який є аналогом природного поліпептиду тимозину $\alpha 1$.



Позначки на схемі:
 А - вхід сталевого повітря для аерації
 В - подача охолодженої води в сорочку/випойник
 С - подача пари для стерилізації
 D - подача сталевого повітря для аерації
 E - вихід охолоджувальної води зі сорочки
 G - культуральна рідинка
 K - подача охолоджувальної води
 L - дренаж / злив

162.01.01.00.000 B3

162.01.01.00.000 B3

		162.01.01.00.000 B3	
№ документа	Дата виходу	Ферментер	1:20
№ змін	№ змін	Виробничий завод	№ змін / Підпис
№ змін	№ змін	НФаУ	
№ змін	№ змін	Кафедра БТ	