

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»



Луценко Тетяна Миколаївна

УДК 573.6.083.3+573.6.086.8

**БІОТЕХНОЛОГІЯ ПРЕПАРАТІВ РЕКОМБІНАНТНОГО
ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ ТА ЇХ СТАНДАРТИЗАЦІЯ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України та у відділі регуляторних відносин, менеджменту якості і науково-технічних розробок ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» (м. Київ).

Науковий керівник: доктор біологічних наук, доцент
Галкін Олександр Юрійович – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, професор кафедри промислової біотехнології.

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, старший науковий співробітник
Карпенко Олена Володимирівна – Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, завідувач відділу хімії та біотехнології горючих копалин;

доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, заступник директора з наукової роботи.

Захист відбудеться 01 червня 2018 р. об 11-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 при Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 4, ауд. 258).

З дисертацією можна ознайомитися у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України (03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37).

Відгуки на автореферат просимо надсилати за адресою: 03056, Україна, м. Київ, пр. Перемоги, 37, корп. 1, кімната 158, відділ вченого секретаря КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Автореферат розіслано ____ квітня 2018 р.

В.о. ученого секретаря спеціалізованої
вченої ради Д 26.002.28, д.т.н., доц.



Т.С. Тодосійчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Інтерлейкін-7 (ІЛ-7) був вперше виділений майже 30 років тому. Проте повний набір фізіологічних функцій цього цитокіну, особливо тих, які залучені до регуляції гомеостазу лімфоцитів, був відкритий тільки недавно. ІЛ-7 – це центральний цитокін імунної системи, який грає важливу роль у модуляції Т- і В-клітинного розвитку й Т-клітинного гомеостазу (Goodwin et al., 1989). Наразі ведуться активні дослідження ІЛ-7 як засобу для відновлення імунної системи на фоні імунодефіцитних станів різного походження. Доведена його терапевтична активність при солідних пухлинах, аутоімунних захворюваннях, бактерійних та вірусних інфекціях (Lundström et al., 2012; 2014; Dawood et al., 2017; 2017; Shindo et al., 2017). Актуальною є розробка лікувально-профілактичних препаратів для відновлення імунітету під час гострих респіраторних захворювань (Wong et al., 2010). Реалізація такого завдання може адресуватися до створення препаратів на основі ІЛ-7 людини назального застосування.

Зважаючи на сучасні досягнення молекулярної біології та біотехнології у галузі отримання білків медичного призначення (Morre et al., 2009; Kolibo et al., 2013; Pokholenko et al., 2015), оптимальним вважаємо підхід до отримання даного цитокіну на основі рекомбінантного продуцента.

Розробка готових препаратів на основі рекомбінантного ІЛ-7 людини (pІЛ-7), що забезпечать його доставку, збереження стабільності та біологічної активності, є складною біотехнологічною задачею. У водних розчинах рекомбінантні білки можуть піддаватися протеолізу, окисненню, олігомеризації, деамінуванню, агрегації тощо (Sofer, 2003). Нівелювання таких негативних ефектів має бути передбачено при створенні готових форм препарату. Стандартизація рекомбінантних препаратів терапевтичного призначення та технології їх виготовлення зазвичай передбачає розробку індивідуальних аналітичних методів та обов'язкову їх валідацію.

Таким чином, розробка біотехнологій препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та їх біоаналітична стандартизація є вкрай актуальними та пріоритетними завданнями сучасної промислової та аналітичної біотехнології.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі промислової біотехнології КПІ імені Ігоря Сікорського та у відділі регуляторних відносин, менеджменту якості і науково-технічних розробок ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» в рамках наступних науково-дослідних робіт: «Біотехнології створення та використання рекомбінантних білків та вивчення їх імунобіологічних та фармакологічних властивостей» (2012-15 рр., державний реєстраційний № 0114U004049), «Фармацевтична розробка субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та готових лікарських форм на її основі» (2014-15 рр., державний реєстраційний № 0114U004050), «Науково-методичне обґрунтування принципів біофармацевтичної продукції та організації її виробництва» (2017-18 рр., державний реєстраційний № 0116U007718). У даних комплексних роботах здобувач була відповідальним виконавцем робіт.

Мета та задачі дослідження. *Мета роботи* – наукове обґрунтування та розроблення біотехнології субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та назальної форми препарату на його основі, а також параметрів їх технологічної та аналітичної стандартизації.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні *задачі*.

1. Розробити технологію одержання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, придатної для виготовлення з неї нестерильних препаратів.
2. Розробити технологію одержання готового препарату назального застосування на основі субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.
3. Дослідити біологічну активність рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на різних моделях *in vitro* як основу для біологічної стандартизації препаратів на його основі.
4. Обґрунтувати параметри аналітичної стандартизації різних препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, розробити методи контролю їх якості та провести їх валідацію.
5. Провести дослідження стабільності різних препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.
6. Провести перспективну валідацію технології виготовлення готового препарату рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на основі оцінки ризиків виробничого процесу.

Об'єкт дослідження – біотехнологічні підходи до створення препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та науково-методичне обґрунтування параметрів біоаналітичної стандартизації цих препаратів і їх валідації.

Предмет дослідження – розробка біотехнології створення препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та науково-методичне обґрунтування параметрів біоаналітичної стандартизації цього препарату і їх валідації.

Методи дослідження – мікробіологічні, біотехнологічні, молекулярно-біологічні, вірусологічні, імунологічні, фізико-хімічні та математичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено раціональну технологію біосинтезу (вихід – 0,9 мг/мл біомаси), а також виділення та очистки рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із високою біологічною активністю *in vitro*.

Вперше показано наявність безпосередньої противірусної активності рІЛ-7 людини по відношенню до вірусу гепатиту С в умовах *in vitro* (CC_{50} – 3 мкг/мл, ED_{50} – 4,7 нг/мл, IS – 640) та доведено можливість використання відповідної методики для стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Вперше науково обґрунтовано технологію отримання назальної форми препарату на основі отриманого рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини, а також принципи його аналітичної стандартизації із застосуванням фізико-хімічних, мікробіологічних та імунологічних методів.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення препаратів рекомбінантних білків терапевтичного призначення.

Практичне значення отриманих результатів. Проведено адаптацію та валідацію методики визначення біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із застосуванням моноклеарних клітин периферичної крові людини, що дозволило використовувати запропонований метод для рутинного аналітичного контролю якості препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Проведено перспективну валідацію технології отримання назального спрею на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок, яка підтвердила стабільність процесу та його відповідність критеріям прийнятності (акт апробації від ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» від 03.07.2017 р.).

Для назальної форми рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини розроблено технічні умови ТУ У 20.4-34414427-013:2017 «Засіб профілактично-гігієнічний», на які отримано позитивний висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи від Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (№ 602-123-20-2/15716 від 19.05.2017 р.).

Науково-методичні рекомендації щодо аналізу ризиків технології назальних спреїв на основі рекомбінантних білків використовуються у ДП «Український медичний центр сертифікації» МОЗ України (м. Київ) при оцінці відповідності медичних виробів, що регламентується постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753 «Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів».

Результати роботи впроваджено у викладання курсів «Медична біотехнологія» та «Розробка біофармацевтичної продукції та організація виробництва» на кафедрі промислової біотехнології КПІ імені Ігоря Сікорського.

Особистий внесок здобувача. Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилися спільно із науковим керівником.

Розробку молекулярної біотехнології одержання рІЛ-7 проводили спільно з к.б.н. О.Б. Горбатюк та Я.О. Похолоенко. Вивчення біологічної активності рІЛ-7 проводили спільно із д.м.н. С.Л. Рибалко, д.б.н. М.В. Коваленко, к.б.н. Д.Б. Старосилою, к.б.н. Ю.І. Порвою, к.б.н. С.Т. Дядюн. Отримання назальної форми препарату рІЛ-7 проводили спільно з д.фарм.н. Л.М. Андрюковою та к.фарм.н. О.Г. Фетісовою. Огляд літератури за окремими розділами проводили спільно з д.б.н. О.М. Дуганом, к.т.н. Ю.В. Горшуновим, к.т.н. Л.І. Ружинською, к.х.н. Н.Г. Марінцовою, В.В. Мотроненко.

Особисто автором описані результати досліджень, проведено їх аналіз та обговорення. Спільно із науковим керівником сформовано висновки.

Автор висловлює щирю вдячність науковому керівнику д.б.н. О.Ю. Галкіну, академіку НАМН України, члену-кореспонденту НАН України В.А. Кордюму та професору С.Л. Рибалко – за підтримку та цінні поради під час планування й виконання роботи.

Апробація результатів роботи. Основні положення роботи доповідались та обговорювались на: II Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія та імунологія» (14-15 квітня 2016 р., м. Київ), X Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченій 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016 р., м. Київ), V Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (12-13 травня 2016 р., м. Київ), VII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Молодіжний форум з нанобіотехнологій-2016 (YouthNanoBioTech-2016)» (25-26 травня 2016 р., м. Київ).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць, серед яких: 1 монографія, 7 наукових фахових статей (у т.ч. 2 статті у виданнях іноземних країн, 3 статті у вітчизняних журналах, які представлено у міжнародних наукометричних базах даних), 2 статті у інших наукових виданнях, 4 тези доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел (117 найменувань), двох додатків. Робота представлена на 180 сторінках друкованого тексту, містить 20 рисунків і 29 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто особливості будови та фізико-хімічні властивості ІЛ-7 людини. Описано та проаналізовано біотехнологічні підходи до створення штаму-продуценту та отримання рекомбінантного ІЛ-7. Проведено аналіз основних принципів стандартизації препаратів на основі рекомбінантних білків. Основну увагу зосереджено на оптимізації параметрів технологічного процесу отримання цільового білка. Наведено сучасні підходи до вдосконалення методів отримання та очистки рекомбінантного білка, спрямовані на зменшення собівартості, довготривалості експериментів, а також наведено основні аспекти стандартизації рекомбінантних препаратів.

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Основним матеріалом досліджень був рекомбінантний інтерлейкін-7 людини (ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА», м. Київ). Рекомбінантний ІЛ-7 був отриманий за допомогою технології рекомбінантних ДНК в системі експресії на основі продуцента *E. coli BL21(DE3)* та плазмідного вектора рАСУС184 (патент України на винахід № 112442 «Спосіб отримання інтерлейкіну-7 людини за допомогою рекомбінантної молекули, рекомбінантна молекула, що містить кДНКову копію структурної частини сплайсованого кДНК гена інтерлейкіну-7 людини та експресійного вектору ДНК»).

Синтез білка проводили шляхом ферментації продуцента на середовищі для індукції наступного складу: пептон, дріжджовий екстракт, $MgSO_4 \times 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза, $NaHCO_3$ та хлорамфенікол при температурі $37,5^\circ C$ при орбітальному качанні з швидкістю 160 об/хв. 14-18 год, після чого клітини осаджували центрифугуванням при 4000 об/хв. протягом 15 хв.

В результаті отримували цільовий білок у вигляді внутрішньоклітинних агрегатів (тілець-включень). Для подальшої очистки рІЛ-7 клітини руйнували за допомогою біохімічного методу. Для етапу виділення і очищення ТВ використовували послідовну відмивку в буферних розчинах наступного складу:

Буфер А: 50mM TRIS-HCl, pH 8,0, 5mM ЕДТА, 100mM NaCl, 1мг/мл лізоцим (лізоцим додається в розчин безпосередньо перед використанням);

Буфер В: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,0, 1mM ЕДТА, 0,1% Triton X-100;

Буфер С: 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 0,14M NaCl;

Буфер D: 20 mM TRIS-HCl, pH 8,0, 0,3% дезоксихолат Na.

Розчинення ТВ проводили в буферному розчині з додаванням хаотропних агентів наступного складу: 7М гуанідин гідрохлорид, 100мМ Трис-HCl, 0,1% Твін-20 та 50мМ дітіотріетол. Розчинення проводили виходячи зі співвідношення: на 1,2-1,5 мг інтерлейкіну-7 – 2 мл буферного розчину (вміст білка в отриманій партії ТВ визначається до солюбілізації шляхом денситометрирування ДСН-ПААГ). У такому складі ТВ ресуспендували і інкубували при 22°C протягом 1-1,5 години на мішалці (2 об/хв). По завершенню інкубації отриманий розчин центрифугували при 13,2 тис. об./хв, упродовж 15 хв.

Отриманий супернатант використовували для подальшої ренатурації цільового білка. Отриманий після солюбілізації ТВ супернатант наносили на колонку XK26/40 (GE Healthcare), заповнену Sephadex G-25 fine. Сорбент попередньо врівноважували 5 об'ємами розчину Кларка-Лабса (50 мл 0,1м KH_2PO_4 (3,6 г/л) + 13,9 мл 0,1м NaOH, pH 6,0), що містить 0,1 М L-аргінін гідрохлориду та 0,1% Tween-80.

На колонку наносили 2 мл супернатанта попереднього етапу солюбілізації, що містить 1,2-1,5 мг цільового білка. Об'єм елюату варіював в діапазоні від 4,5 до 5,1 мл. Отриманий елюат центрифугували при 13,2 тис.об./хв протягом 15 хв, осад видаляли. Після центрифугування супернатант з центрифужних пробірок об'єднувався і передавався для подальшого очищення. Очищення рекомбінантного ІЛ-7 проводили у дві стадії з використанням ДЕАЕ сефарози (слабкий аніонообмінник) - перша стадія, і SP сефарози (сильний катіонообмінник) - друга стадія.

Для збереження дисульфідних зв'язків у ренатуровану суміш додавали окислювально-відновну пару глутатіону (окиснений/відновлений) до кінцевої концентрації в розчині 1 мМ, інкубували 30 хв при +4°C.

Розчини, які використовували для хроматографічного очищення рІЛ-7, фільтрували через 0,22 мкм мембранний фільтр («Millipore») і дегазували з використанням вакуумного насоса.

Фракцію рекомбінантного ІЛ-7, яку пропускали через ДЕАЕ сефарозу використовували для подальшого очищення на SP сефарозі.

Всі фракції отримані в результаті хроматографічного очищення рекомбінантного ІЛ-7 збирали і аналізували в 12% поліакриламідному гелі і з використанням спектрофотометра NanoDrop.

Дослідження противірусної активності рІЛ-7 проводили на лінії клітин *Jurkat*. Джерелом ВГС слугували нерозведена плазма крові хворих на гепатит С з різним вірусним навантаженням, яка містить РНК ВГС. Останню виділяли з використанням комплекту реагентів «РИБО-сорб» (ФДУН «ЦНДІЕ», Росія). кДНК ВГС отримували реакцією зворотної транскрипції РНК з використанням комплекту реагентів «Реверта-Л» (ФДУН «ЦНДІЕ», Росія). До 10 мкл готової реакційної суміші (ліофілізований ДДТ, 125 мкл розчину RT-mix і 6 мкл ревертази MMLv – зворотна транскриптаза вірусу лейкемії мишей) додавали 10 мкл РНК-проби і проводили транскрипцію за температури 37 °С протягом 30 хв, в результаті чого отримували кДНК. Суспензійні культури клітин *Jurkat* трансфекували за допомогою реагенту *Turbofect*. Трансфекцію проводили за стандартним протоколом за допомогою трансфекційного реагенту *Turbofect* (Thermo Scientific Products). Щільність клітин в

день трансформації становила 5×10^4 (для перещеплюваних клітин) і 5×10^5 (суспензійних клітин) в 1 мл поживного середовища.

Для вивчення антивірусної активності препарату рІЛ-7 його в різних концентраціях вводили в культуру клітин *Jurkat*, яка продукує ВГС. Через 5 діб визначали вірусне навантаження у кожній пробі методом ПЛР. На моделі сурогатного вірусу гепатиту С антивірусну активність вивчали в культурі МДВК (лінія клітин бичачої нирки), яку обробляли препаратом ІЛ-7 (за різних розведень) і додавали вірус в дозі 100 ТЦД₅₀, культури інкубували в термостаті до специфічної цитопатогенної дії в контролі вірусу, а потім в культуральному середовищі різних розведень препарату визначали інфекційний титр вірусу.

Цитологічний аналіз впливу ІЛ-7 проводили в клітинах невриноми Гассерова вузла щура (НГВЩ) після фіксації клітин, які вирощували на покривних скельцях, в рідині Шабаша упродовж 30 хв. Фарбування проводили гематоксилін-еозином за загальноприйнятою методикою. Мітотичний індекс визначали шляхом обчислення 3000-10000 клітин і виражали у проміле (‰) (кількість мітозів на 1000 клітин).

Дослідження біологічної активності рІЛ-7 проводили на мононуклеарних клітинах периферичної крові (МНПК) отриманих з донорської крові з такими антикоагулянтами як гепарин (використовувати 10 од/мл крові) або ЕДТА. Об'єм проб крові складав 14 мл. За допомогою градієнта щільності Histopaque 1077 (Sigma) проводили розділення крові на центрифuzі з баккет-ротором (Liston 2204 Classic) протягом 30 хв при 1500 об/хв при кімнатній температурі. Збирали МНПК за допомогою стерильної піпетки та проводили двократну відмивку клітин в 10 мл середовища (RPMI-1640 (Biowest), з 2% вмістом фетальної телячої сироватки за допомогою центрифугування протягом 10 хв при 400 g (1000 об/хв) при кімнатній температурі. Клітини ресуспендували в 4 мл середовища для культивування клітин (RPMI з 10% фетальної телячої сироватки, 10 мкг/мл ФГА (РНА Sigma L 8754) та 50 мМ меркаптоетанолу). Проводили підрахунок кількості життєздатних клітин після фарбування 0,4% трипановим синім в камері Горяєва. Доводили концентрацію до $(1-4) \times 10^6$ клітин/мл у поживному середовищі та культивували в матрацах T45 (10 мл/матрац) протягом 5 діб при 37°C в інкубаторі з 5% вмістом CO₂. Після стимуляції ФГА суспензію клітин центрифугували при 1000 об/хв протягом 10 хвилин. Проводили ще один етап відмивки як було описано раніше. Клітини ресуспендували в 3-5 мл середовища для культивування, підраховували кількість життєздатних клітин після фарбування 0,4% трипановим синім в камері Горяєва, доводили їх кількість до 2×10^6 клітин/мл. Клітини розсівали в планшети на 96 лунок по 50 мкл на лунку та використовували для контролю біологічної активності.

Розведення стандарту та зразка вносили в лунки планшети з МНПК об'ємі 50 мкл у трьох повторях і інкубували планшети 4 доби при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂. Після цього вносили по 15 мкл розчину МТТ (5 мг/мл) у кожну лунку і інкубували протягом 4 годин при 37°C в інкубаторі з 5% CO₂, далі для розчинення кристалів формазану додавали по 200 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО) в кожну лунку. Вимірювали оптичну густину (ОГ) при 570 нм, будували графіки залежності ОГ від логарифма концентрації ІЛ-7, який мав форму сигмоїдальної кривої. ED₅₀ (ефективна доза) обчислювали з лінійної частини графіка і являє 50% проліферативний відповідь щодо максимального проліферативної відповіді,

отриманого в лінійній частині графіка. Для обчислення ED₅₀ проводили апроксимацію отриманих даних сігмоїдною кривою за допомогою статистичних пакетів.

Оптимізований метод проведення контролю біологічної активності було перевірено відповідно до процедур, описаних в ІСН керівних принципах Q2 (R1), а також програмного комплексу Microsoft Excel. Було розглянуто наступні параметри валідації: специфічність, лінійність і діапазон застосування, правильність, прецизійність та робустність.

Для оцінки ризиків у технології препарату було використано підходи, які сформовано у ДСТУ ISO 14971:2009 «Вироби медичні. Настанови щодо управління ризиком».

Розділ 3. РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ

Джерелом інформаційної РНК для отримання кДНК гену ІЛ-7 був кістковий мозок людини. Poly A+ РНК була виділена з кісткового мозку людини через набір реактивів фірми GE Healthcare (27–9255-01), Великобританія.

Система експресії, що використовується в технології отримання рІЛ-7 сконструйована за допомогою плазмиди pACYC184 (Thermo Scientific, №X06403) та штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) (GE Healthcare, 27-1542-01). Індукцію експресії гену рІЛ-7 проводили за протоколом аутоіндукції.

Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність у них продуктів очікуваної молекулярної маси (17,4 кДа), максимальні рівні яких становили 15-20% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli* (рис. 1). Вихід цільового білка досягав 0,9 мг/мл вихідної культури *E. coli*. Аналіз білків клітинних фракцій після індукції експресії показав, що білок рІЛ-7 накопичувався в нерозчинній фракції бактеріальної цитоплазми – тільцях-включення (ТВ).

Наступним етапом проведеним нами були дослідження, спрямовані на оптимізацію умов культивування продуценту рекомбінантного білка з метою підвищення експресії останнього у клітинах *E. coli*. Серед параметрів оптимізації були визначені наступні: температура та тривалість культивування продуценту, склад середовища для аутоіндукції, швидкість перемішування.

Перш за все, проводили дослідження щодо визначення оптимальної температури культивування з огляду на максимальний вихід цільового продукту.

Дослідження впливу температурного режиму культивування на накопичення цільового білку проводили паралельно із визначенням оптимальної тривалості процесу культивування: проводили серію паралельних дослідів за різних температурних режимів (37, 37,5, 38 та 38,5 °С) та різної тривалості процесу культивування (17, 19 та 21 год). При цьому використовували поживне середовище наступного складу: пептон, дріжджовий екстракт, MgSO₄ × 7H₂O, (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза, NaHCO₃ та хлорамфенікол.

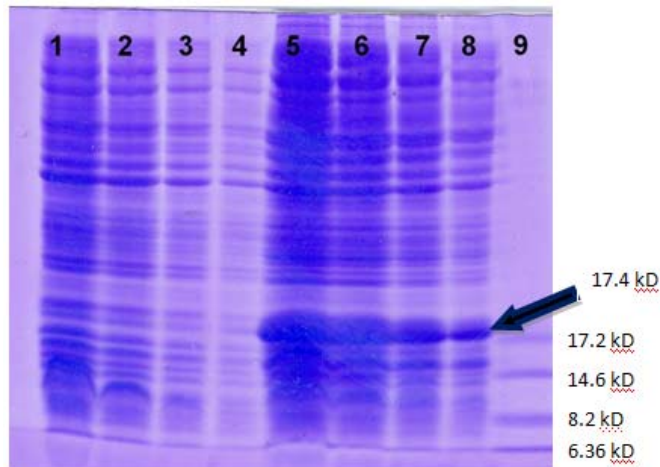


Рис. 1. Електрофореграма зразків культуральної рідини:

1, 2, 3, 4 – клітини без індукції експресії (40, 20, 10 і 4 мкл, відповідно);
5, 6, 7, 8 – індуквані клітини (40, 20, 10 і 4 мкл, відповідно); 9 – маркери ММ

Результати досліджень показали, що найбільш ефективним температурним режимом є культивування бактерій при температурі 37,5°C. Визначення найоптимальнішої тривалості процесу аутоіндукції синтезу білка показали найбільша кількість цільового білка накопичується в результаті культивування протягом 21 год, і складала 1,0 мг/л, для 17 год та 19 год – 0,95 мг/мл вихідної культури та 0,98 мг/мл вихідної культури, відповідно. Проте з тривалістю культивування збільшувалася і загальна білків клітини-продуцента і процентний вміст цільового білка від загального вмісту білка складав 18%, 14% та 13%, відповідно, для 17, 19 та 21 год культивування (рис. 2). Тому можна зробити висновок, що найоптимальнішою є тривалість культивування протягом 17 год, так як протягом подальшого часу приріст цільового білка незначний, в порівнянні із збільшенням забруднення цільового білка білками клітин-продуцента.

Наступний блок досліджень мав на меті визначення оптимального складу середовища для аутоіндукції експресії цільового білка. Дані дослідження проводили при сталій температурі культивування 37,5°C та тривалість процесу складала 17 год. Для дослідження використовували наступні склади середовищ для аутоіндукції: №1 – пептон, дріжджовий екстракт, $MgSO_4 \times 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза, $NaHCO_3$ та хлорамфенікол; №2 – пептон, дріжджовий екстракт, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза, $NaHCO_3$ та хлорамфенікол; №3 – пептон, дріжджовий екстракт, $MgSO_4 \times 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, Na_2HPO_4 , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза, $NaHCO_3$ та хлорамфенікол; №4 – пептон, дріжджовий екстракт, $MgSO_4 \times 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , лактоза, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза та хлорамфенікол; №5 – пептон, дріжджовий екстракт, $MgSO_4 \times 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , лактоза $\times 2$, гліцерол, глюкоза, D-мальтоза, $NaHCO_3$ та хлорамфенікол.

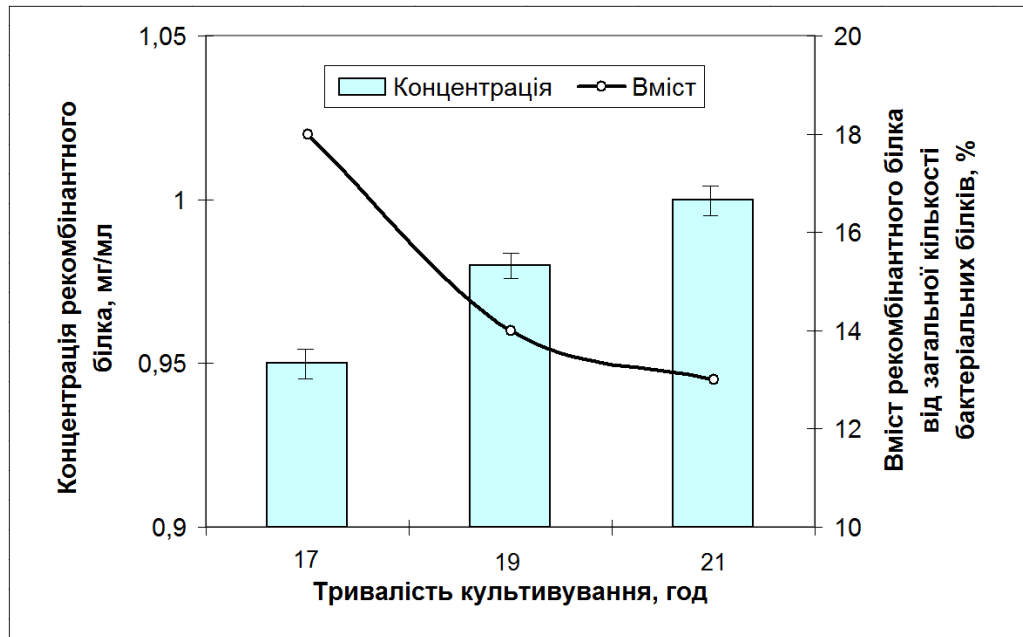


Рис. 2. Вихід рІЛ-7 при різній тривалості культивування

На рис. 3 наведено результати робіт із культивування продуцента рІЛ-7 на середовищах для індукції, склад яких вказано вище. Проведення процедури індукції біосинтезу рекомбінантного білка проводили шляхом культивування продуценту в круглодонних колбах об'ємом 1 л на орбітальній качалці. Процес оцінювали за значенням оптичної густини культуральної рідини та концентрації цільового білка, що розраховувалась методом денситометрії.

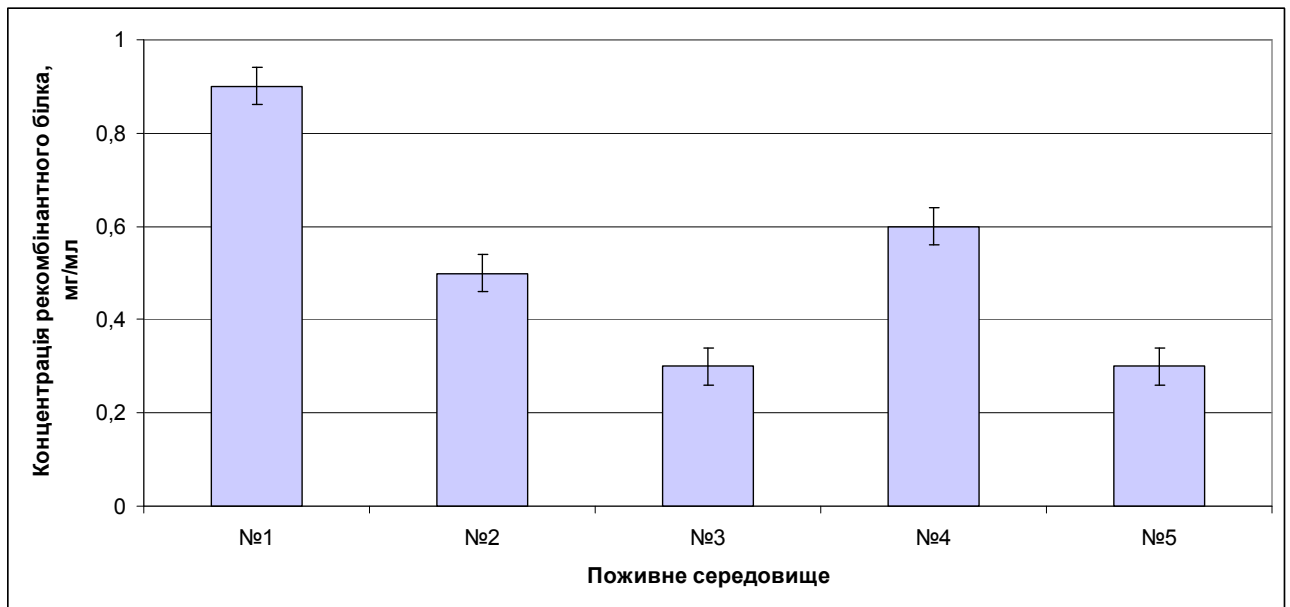


Рис. 3. Визначення оптимального складу середовища для індукції

Отже, найкращим виявилось середовище №1, а найгірші результати було отримано при використанні поживних середовищ №3 та №5.

Подальші дослідження були направлені на визначення оптимальної швидкості перемішування. Дані дослідження проводили при сталій температурі культивування 37,5°C, тривалість процесу складала 17 годин, для дослідження

використовували середовищ для індукції №1. На рис. 4 наведено результати культивування продуцента рІІ-7 на середовищі для індукції, при різній швидкості перемішування. Процес оцінювали за значенням концентрації цільового білка, що розраховувалась методом денситометрії. Найкращі результати синтезу цільового білка були отримані за швидкості перемішування 200 об/хв.



Рис. 4. Визначення оптимальної швидкості перемішування під час біосинтезу рІІ-7

Подальшим етапом було виділення та очистка ТВ за вищевказаною методикою, паралельно відбирали проби для електрофорезу в ПААГ, щоб мати змогу контролювати кожен етап. Вміст цільового білка в отриманих тільцях включення досягав 30-35% від сумарного вмісту білків клітин *E. coli*. Отримані тільця включення містили в середньому 0,7 мг/мл рІІ-7 в перерахунку на вихідну культуру *E. coli*.

Розчинення ТВ проводилося в буферному розчині, що містить 7М гуанідину гідрохлорид, 100мМ Тріс-НСІ, 0,2% Твін-20 та 50мМ дітіотрієтолу. Інкубували з обертанням протягом 1 год при температурі 22°C. Після інкубації отриманий розчин ТВ центрифугували при 13,2 об/хв протягом 15 хв. Надосад відбирали для подальшої ренатурації та очистки.

Отриманий після розчинення ТВ супернатант наносили на колонку ХК26/40 (GE Healthcare), запаковану Sephadex G-25 fine (100 мл сорбенту). Сорбент попередньо врівноважували 5 обсягами розчину Кларка-Лабса. На колонку наносили 10 мл супернатанту попереднього етапу, що містить 7,5-8 мг цільового білка. Нанесення і всі процедури хроматографічного фракціонування і подальшого центрифугування проводилися при 20-22°C. Швидкість нанесення розчину білка, а також подальшої подачі елюючого буфера становила 15 мл/хв. Обсяг елюату варіював в діапазоні від 20 до 25 мл. Отриманий елюат фільтрували через фільтр MF MembraneFilters (діаметр пор 0,45 мкм), а потім через фільтр з діаметром пор 0,22 мкм. Після фільтрування в препарати додавали по 1мМ окисленого та відновленого глутатіону і піддавали подальшій очистці.

Очищення рІЛ-7 після його ренатурації на колонці для гель – фільтрації проводили у два етапи з використанням Q сефарози – перший етап, і SP сефарози – другий етап. На першому етапі для проведення очистки рІЛ-7 в колонку упаковували 20 мл Q сефарози, і під'єднували до автоматизованої хроматографічної системи ВЕРХ.

Фракцію рІЛ-7, яку пропускали через Q сефарозу використовували для подальшого очищення на SP сефарозі. Елюцію рІЛ-7 проводили двохступінчастим градієнтом NaCl (0,2 і 0,7 М) в буфері 0,05 М $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ рН 6,0; 0,1 М L-аргініну; 0,1 % Твін-80 (рис. 5).

Всі фракції отримані в результаті хроматографічного очищення рІЛ-7 збирали і аналізували в 12% поліакриламідному гелі (ДСН-ПААГ) і з використанням спектрофотометра NanoDrop. Вихід цільового білка після всіх етапів очистки становив 10%. Чистота препарату складала близько 95% (рис. 6). Після отримання, фракція, в котрій знаходився рІЛ-7 була використана вивчення його біологічної активності.

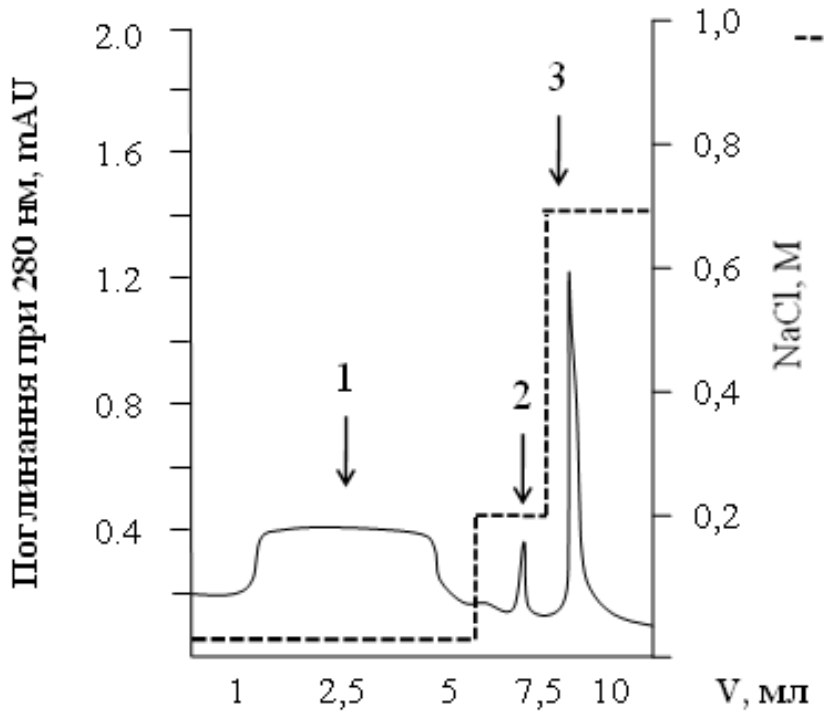


Рис. 5. Профіль елюції рІЛ-7 при хроматографічній очистці на Q та SP сефарозах:

- 1 – незв'язана фракція, яка пройшла через Q та SP сефарозу;
 - 2 – фракція, елюйована 0,2М NaCl;
 - 3 – фракція, елюйована 0,7М NaCl.
- Суцільна лінія – оптична густина;
пунктирна лінія – зміна полярності NaCl.

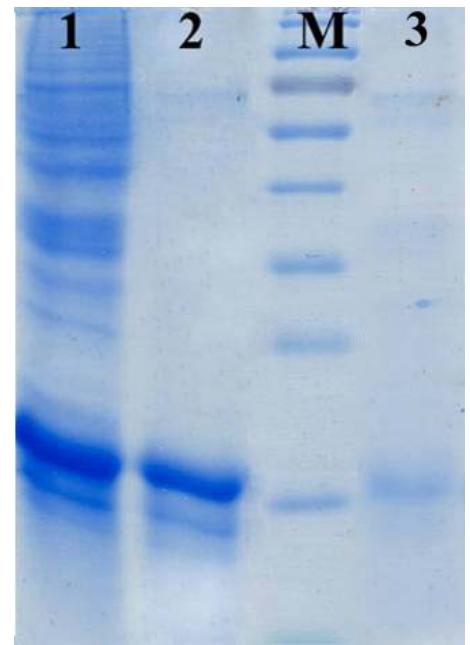


Рис. 6. Електрофореграма фракцій під час очистки рІЛ-7 на Q та SP сефарозі:

- 1 – фракція рІЛ-7 після ренатурації;
- 2 – фракція рІЛ-7 після очистки на Q і SP сефарозі;
- 3 – незв'язана фракція;
- M – маркери ММ (250, 130, 100, 70, 55, 25, 15 кДа)

Розділ 4. БІОЛОГІЧНА ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНА СТАНДАРТИЗАЦІЯ СУБСТАНЦІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ

За основу для біологічної стандартизації рІЛ-7 було взято наступні дослідження його біологічної активності на різних моделях *in vitro*.

Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на різних моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С. Для визначення цитотоксичної концентрації рІЛ-7, яка призводить до зниження виживаності тест-клітин на 50 % (CC_{50}), використовували клітини МДВК. Діапазон досліджуваних концентрацій рІЛ-7 становив від 0,09 до 6,0 мкг/мл. В результаті проведених досліджень цитодеструктивні зміни відмічені для концентрації препарату 6,0 мкг/мл, тобто CC_{50} рІЛ-7 становить 3,0 мкг/мл.

Антивірусну активність вивчали в культурі МДВК, яку оброблювали різними розведеннями препарату рІЛ-7 і додавали ВБВД в дозі 100 ТЦД₅₀ (ТЦД₅₀ – тканинна цитопатогенна доза, що викликає загибель 50 % клітин моношару). Культури інкубували в термостаті до специфічної цитопатогенної дії в контролі вірусу, а потім в культуральному середовищі різних розведень визначали інфекційний титр вірусу. Для встановлення ефективної дози (ED_{50}) досліджуваного препарату проводили визначення інфекційного титру вірусу грипу для кожного розведення сполуки. Індекс селективності (IS) препарату визначали шляхом встановлення співвідношення CC_{50} до ED_{50} , яка являє собою мінімальну кількість препарату, що гальмує розвиток вірусспецифічної цитопатичної дії (ЦПД) на 50 %.

Аналізуючи одержані результати, слід відмітити, що препарат рІЛ-7 пригнічував репродукцію сурогатного вірусу гепатиту С на 3-5 lg ID₅₀. Згідно результатів досліджень, було показано, що препарат рІЛ-7 є ефективними інгібітором сурогатного вірусу гепатиту С – ВБВД з високим показником IS.

Таблиця 1

Результати визначення CC_{50} , ED_{50} , IS препарату рІЛ-7

Характеристика	Значення
CC_{50}	3,0 мкг/мл
ED_{50}	0,0047 мкг/мл
IS	640

Наступним етапом досліджень було визначення впливу різних доз рІЛ-7 на динаміку росту культур *Jurkat* не інфікованих гепатитом С та інфікованих ВГС. В культури клітин *Jurkat*, не інфікованих та інфікованих ВГС, у концентрації 550 тис. клітин в 1 мл додавали рІЛ-7 в дозах 2,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,025 мкг/мл на 1-у, 2-у та 3-ю добу. рІЛ-7 у досліджуваних дозах не мав цитотоксичного впливу на клітини *Jurkat*. Максимального росту клітини досягали на 14 добу для всіх варіантів досліду. Виражений проліферативний вплив на неінфіковані клітини *Jurkat* досягався при найменшій дозі рІЛ-7 – 0,025 мкг/мл. Вірус гепатиту С також мав проліферативний вплив на клітини *Jurkat*. рІЛ-7 у досліджуваних дозах на інфіковані ВГС культури клітин по різному впливав на проліферацію клітин у перші 3 доби та через 2-3 тижні.

Для вивчення мітотичного режиму клітин під впливом рІЛ-7 для всіх 8 варіантів досліду проведено вивчення на культурі клітин НГВЩ, інфікованих та неінфікованих ВГС. Мітотичний режим клітин під впливом репродукції ВГС набуває проліферативного характеру. рІЛ-7 в різних дозах нормалізує мітотичний режим інфікованих клітин. Це може бути пов'язано як з інгібіцією репродукції ВГС, так і з нормалізацією гомеостазу клітин.

В результаті проведених досліджень було показано, що тільки при внесенні рІЛ-7 в дозі 2,5 мкг/мл достовірно більше ніж на 50 % знижується вірусне навантаження на 3 добу. Але на 5 добу, коли в культуру клітин не вносили рІЛ-7, вірусне навантаження відновлюється. Тому було проведено нове дослідження по вивченню впливу рІЛ-7 на репродукцію ВГС з більш високими дозами препарату. Дослідження проведено за тією ж схемою, лише дози рІЛ-7 були 6 мкг/мл; 1,5 мкг/мл; 0,3 мкг/мл.

Вихідна концентрація клітин *Jurkat* була 500 тис./мл. Динаміка росту інтактних клітин була поступовою, збільшуючись в перші 3 доби. рІЛ-7 в дозі 0,3 мкг/мл з першої до четвертої доби значно збільшував проліферацію клітин. рІЛ-7 в дозі 1,5 мкг/мл на першу добу збільшував проліферацію клітин, на другу добу кількість клітин зменшувалася до значень вихідної кількості, але на 3 та 4 добу проліферація клітин збільшувалася. рІЛ-7 в дозі 6 мкг/мл збільшував проліферацію клітин в перші 2 доби, а на 3, 4 добу кількість клітин зменшувалася до вихідної.

ВГС поступово значно зменшував проліферацію клітин упродовж 4 доби рІЛ-7 в дозах 6 мкг/мл, 1,5 мкг/мл та 0,3 мкг/мл не впливав на проліферацію клітин, інфікованих ВГС.

Згідно з отриманими результатами рІЛ-7 в дозі 6 мкг/мл на 3-ю добу знижував вірусне навантаження ВГС на 89 %, а на 4-у добу повністю гальмував репродукцію вірусу гепатиту С. При додаванні рІЛ-7 в дозі 0,3 мкг/мл також відбувалась повна інгібіція репродукції ВГС на 4-у добу. Використання дози 1,5 мкг/мл у перші 3 доби навіть незначно збільшувало вірусне навантаження, але на 4-у добу вірусне навантаження зменшувалося на 55 %.

Дослідження біологічної активності рІЛ-7 на мононуклеарних клітин периферичної крові. Даний метод контролю біологічної активності базується на здатності рІЛ-7 викликати проліферацію Т-лімфоцитів. Клітини, що використовують для контролю попередньо стимулюють фітогемаглютиніном (ФГА). Оцінку проліферації проводили з використанням 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразол броміду (МТТ-тест).

З кожного окремого експерименту будували криві росту. Для побудовання кривих росту культури клітин по осі абсцис відкладали десятковий логарифм концентрації рІЛ-7, а по осі ординат – відношення поглинання контрольними зразками до поглинання експериментальних. Таких експериментів було проведено три. На кожній кривій визначали прямолінійну ділянку, що характеризується експоненціальним ростом культивованих клітин у відповідь на дію рІЛ-7. На цій ділянці вимірювали середню точку, проекція з якої на вісь абсцис визначає половину ефективної дози (Effective dose, ED₅₀).

Наступним етапом дослідження було проведення валідації методики визначення біологічної активності рІЛ-7 на основі МТТ-тесту. Валідація підтверджує, що представлений метод показує задовільні дані по всіх параметрах тестування, таких як специфічність, правильність, прецизійність та лінійність. На даному етапі роботи, було проведено адаптацію методики визначення біологічної активності рІЛ-7 із використанням МНПК. Результати здійсненої валідації даної методики за такими показниками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність довели можливість використання даного методу для рутинного аналітичного контролю якості препаратів рІЛ-7.

Таблиця 2

Специфікація якості субстанції рІЛ-7 (для виробництва нестерильних лікарських форм)

Показник контролю	Встановлені значення
Опис	Прозора безбарвна рідина, можлива слабка опалесценція, без механічних включень видимих неозброєним оком.
Ідентифікація	Метод А. Ідентифікацію проводять за наявністю специфічної активності у тесті «Специфічна активність». Метод Б. На електрофореграмі, одержаній в тесті на домішки, методом ДСН-ПААГ, основна смуга досліджуваного зразка повинна співпадати із основною смугою стандартного зразка
рН	6,8 ± 0,2
Концентрація білка	Від 0,03 до 0,06 мг/мл
Стерильність	Субстанція повинна бути стерильною
Специфічна активність	Від 3 до 6 нг/мл. Метод А. МТТ-тест із використанням МНПК стимульованих ФГА. Метод Б. МТТ-тест із використанням клітинної лінії 2E8. Метод В. Методика із використанням клітинної лінії 2E8 та радіоактивного тимідину.
Домішки із ММ, відмінною від ММ ІЛ-7	На електрофореграмі не має виявлятися смуга, інтенсивніша за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (1,0 %), і не більше 3 смуг можуть бути інтенсивнішими за основну смугу на електрофореграмі розчину порівняння (0,2 %)
Чистота	Сума площ усіх піків, крім основного, не має перевищувати 5,0 % суми площ усіх піків

Обґрунтування параметрів аналітичної стандартизації субстанції рІЛ-7 та методів контролю якості. З огляду на наукові дані отримані нами та описані раніше щодо прямої противірусної активності рІЛ-7 вірусологічні тести можливо використовувати при вивченні стабільності субстанції під час фармацевтичної розробки. Проте, для рутинного аналізу доцільно використовувати менш громіздкі та більш дешеві імунологічні методи. У даному випадку це метод із використанням МНПК, у той же час доцільно передбачити використання й альтернативних методик.

Отже, на основі проведеного аналізу літературних даних та власних досліджень розроблено специфікації на субстанцію на основі рІЛ-7 (табл. 2).

Розділ 5. РОЗРОБКА СКЛАДУ, ТЕХНОЛОГІЇ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-7 ЛЮДИНИ ТА ЙОГО СТАНДАРТИЗАЦІЯ

Обґрунтування складу та технології назальної форми препарату на основі рІЛ-7. Для розроблюваного препарату, діючою речовиною якого є рІЛ-7, як лікарську форму насамперед можна обрати водні розчини. Склад препарату у формі назального спрею вибрано відповідно до розробленого цільового профілю якості. Враховуючи форму рІЛ-7, в який діюча речовина застосовується в дослідженнях, було обрано такі допоміжні речовини: антимікробні консерванти – ніпагін та бензиловий спирт; посилювач антимікробної дії консервантів та синергіст антиоксидантної дії – едетат натрію; стабілізатори – полівінілпіролідон (ПВП), поліетиленгліколь 400 (ПЕГ-400), гіпромелоза (ГПМЦ). Більшість обраних допоміжних речовин добре розчинні у воді при кімнатній температурі, і їх розчинність набагато вища, ніж обрані концентрації. Водночас кожна речовина завдяки фізико-хімічним властивостям має свої особливості. Для розроблення оптимальних параметрів технологічного процесу з врахуванням фізико-хімічних і технологічних властивостей діючих і допоміжних речовин (розчинність, змочуваність, час розчинення) ми визначили температурний і часовий режими приготування та порядок введення компонентів до розчину.

На підставі проведення досліджень було розроблено наступні склади препарату (табл. 3) та технологічну схему виробництва (рис. 7).

Таблиця 3

Рецептури препарату та їх фізико-хімічна характеристика

Допоміжні речовини, <i>фізико-хімічні показники</i>	Концентрація, г/л			
	Рецептура 1	Рецептура 2	Рецептура 3	Рецептура 4
Натрію ацетат	0,41	0,41	0,41	0,41
Оцтова кислота 1 М	0,021	0,021	0,021	0,021
Аргініну гідрохлорид	2,1	2,1	2,1	2,1
Натрію хлорид	0,818	0,818	0,818	0,818
Полісорбат 80	0,1	0,1	0,1	0,1
Динатрію едетат	0,54	0,54	0,54	0,54
Ніпагін	1,71	1,71	1,71	–
ПВП	18,0	–	–	–
ГПМЦ	–	9,0	–	–
ПЕГ 400	–	–	18,0	18,0
Бензиловий спирт	–	–	–	16,2
Вода очищена	до 1 л	до 1 л	до 1 л	до 1 л
<i>Осмолярність</i>	<i>22,1</i>	<i>22,1</i>	<i>22,1</i>	<i>160,7</i>
<i>pH</i>	<i>4,0</i>	<i>5,0</i>	<i>5,0</i>	<i>5,0</i>

Примітка: вміст рІЛ-7 для всіх варіантів складу 5-20 мг/л.

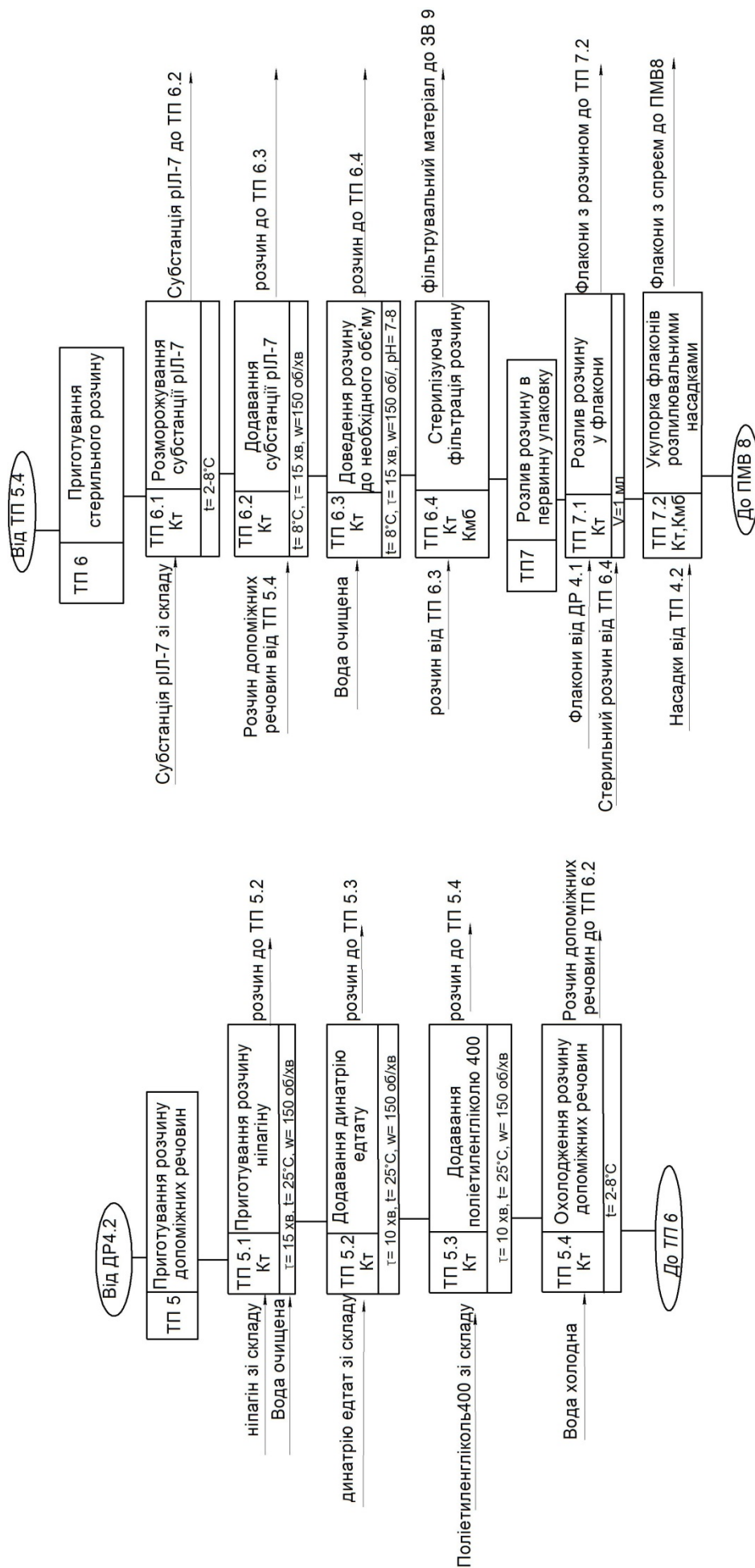


Рис. 7. Фрагмент технологічної схеми отримання назального спрею на основі рЛЛ-7

Дослідження стабільності назальної форми препарату на основі рІЛ-7.

Дослідження проводили для двох пропонованих складів стабілізуючих розчинів (допоміжних речовин) (табл. 3): Склад №3 (трилон Б, ніпагін, поліетиленгліколь 400) та Склад №4 (трилон Б, бензиловий спирт, поліетиленгліколь 400).

Дослідження антивірусної активності препаратів рІЛ-7 проти сурогатного вірусу гепатиту С та вірусу простого герпесу II типу. Антивірусну активність вивчали в культурі MDBK, яку оброблювали різними концентраціями препарату рІЛ-7 у розчинах різних допоміжних речовин і додавали ВБВД в дозі 100 ТЦД₅₀. Було встановлено, що рІЛ-7 у досліджуваних розчинах та культуральному середовищі через 1 тиждень зберігання був активним до розведення 0,003 мкг/мл проти вірусу ВБВД, тому що інгібування інфекційного титру було на 2 ID₅₀.

Таблиця 4

Антивірусна активність різних рецептур назального препарату проти сурогатного вірусу гепатиту С та вірусу простого герпесу II типу при зберіганні за температури 4 °С

Концентрації препаратів рІЛ-7, мкг/мл	Термін зберігання	Антигепатитна активність			Антигерпетична активність		
		Рецептура №3 + рІЛ-7	Рецептура №4 + рІЛ-7	рІЛ-7	Рецептура №3 + рІЛ-7	Рецептура №4 + рІЛ-7	рІЛ-7
		Інфекційні титри вірусу в lg ID ₅₀					
0,05	2 тижні	6,0	4,0	5,0	2,0	2,0	3,0
0,025		5,0	5,0	5,0	2,0	2,0	3,0
0,012		5,0	5,0	5,0	2,0	3,0	3,0
0,006		4,0	3,0	5,0	4,0	5,0	3,0
0,003		7,0	6,0	7,0	4,0	5,0	3,0
КВ*		8,0	8,0	8,0	4,0	4,0	4,0
0,05	1 місяць	3,0	4,0	7,0	4,0	2,0	4,0
0,025		5,0	4,0	7,0	3,0	2,0	6,0
0,012		6,0	5,0	7,0	6,0	3,0	6,0
0,006		6,0	7,0	7,0	6,0	4,0	8,0
0,003		7,0	8,0	7,0	7,0	7,0	6,0
КВ		8,0	8,0	8,0	7,0	7,0	7,0
0,025	2 місяці	3,0	3,0	4,0	2,0	3,0	4,0
0,012		3,0	2,0	4,0	2,0	2,0	4,0
0,006		3,0	3,0	4,0	2,0	3,0	4,0
0,003		3,0	2,5	5,0	2,0	3,0	4,0
КВ		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
0,05	3 місяці	4,0	4,0	4,0	–	–	–
0,025		5,0	3,0	4,0	–	–	–
0,012		3,0	6,0	4,0	–	–	–
0,006		4,0	6,0	3,0	–	–	–
0,003		3,0	6,0	3,0	–	–	–
КВ		6,0	6,0	3,0	–	–	–

Примітки: *«КВ» – контроль вірусу; **«←» – дослідження не проводили.

Дослідження антивірусної активності при зберіганні препаратів рІЛ-7 при температурі 4 °С в буферних стабілізуючих розчинах упродовж 2 тижнів та 1, 2, 3 місяців проводили проти вірусів герпесу II типу та ВБВД (гепатит С). Відповідні дані представлено в табл. 4. Отже, склад №3 забезпечував більший рівень залишкової активності препаратів рІЛ-7.

Дослідження довгострокової стабільності препарату рІЛ-7 на основі ММТ-тесту. На наступному етапі роботи проводили дослідження довгострокової стабільності препарату рецептури №3 при зберіганні за температури 4 °С із застосуванням методики кількісного визначення рІЛ-7 на основі ММТ-тесту (табл. 5).

Таблиця 5

Стабільність назальної форми препарату рІЛ-7 рецептури №3 при довготривалому зберіганні за температури 4 °С

Вихідна концентрація рІЛ-7	Концентрація виражена у відсотках від вихідної концентрації для різних строків зберігання*					
	1 міс.	3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.	13 міс.
0,05 мкг/мл	101%	100%	98%	97%	95%	95%
0,025 мкг/мл	98%	99%	95%	94%	92%	93%

*Представлено результати тестування зразків препарату у 3-х повторах.

Таким чином, на даному етапі роботи було обґрунтовано профіль якості спрею назального на основі рІЛ-7, що відповідає вимогам керівних документів, проведено розробку рецептур препарату та технології його виготовлення. Шляхом визначення зміни біологічної активності рІЛ-7 *in vitro* протягом 1 року (протівірусна дія; проліферація МКПК людини) встановлено рецептуру препарату, що забезпечує найкращі показники стабільності (рецептура на основі консерванту ніпагіну та стабілізатору ПЕГ-400).

Обґрунтування параметрів аналітичної стандартизації препарату на основі рІЛ-7 та методів контролю його якості. При формуванні специфікації якості на готовий препарат використовували одночасно підходи, що застосовуються як для лікарських засобів, так і для медичних виробів. Обрано наступні показники стандартизації: органолептичні показники; вихід вмісту контейнера; перевірка механічного насосу; середня маса однієї дози; кількість доз, що витягаються; водневий показник (рН 6,5-7,5); ідентифікація; специфічна активність (від 80 % до 125 % від номінального значення); стерильність (на момент випуску): має бути стерильним; мікробіологічна чистота (на момент закінчення строку придатності): загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС), КУО/мл, не більше: 10²; загальне число дріжджових і пліснявих грибів (ТУМС), КУО/мл, не більше: 10¹; *Staphylococcus aureus* в 1 мл: відсутні; *Pseudomonas aeruginosa* в 1 мл: відсутні); термін придатності (12 місяців за температури від 2 °С до 8 °С. Після розкриття флакону – 1 місяць за температури від 2 °С до 8 °С).

Проведено оцінку придатності методик визначення мікробіологічної чистоти. Встановлено, що досліджуваний препарат за стандартних методів дослідження володіє антимікробною активністю по відношенню до тест-мікроорганізмів *Bacillus subtilis* АТСС 6633 (на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який

містить антибіотик), *Candida albicans* ATCC 10231 (на соєво-казеїновому агарі та Сабуро-декстрозному агарі, який містить антибіотик) і не володів антимікробною дією по відношенню до тест-мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (на соєво-казеїновому агарі) та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (на соєво-казеїновому агарі). З метою нейтралізації антимікробної активності було запропоновано та доведено ефективність використання лецитину та полісорбату як речовин, що знімають антибактеріальний ефект, у поєднанні із розведенням досліджуваного зразка у 50 разів. Розроблена методика визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів для досліджуваного препарату відповідає критеріям придатності, що пред'являються ДФУ 2.0 (2.6.12) та може бути використана при контролі його мікробіологічної чистоти.

Оцінка ризиків у технології препарату на основі рІЛ-7 та її перспективна валідація. В рамках даного етапу досліджень було теоретично обґрунтовано доцільність оцінки ризиків у технології отримання препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини у формі назального спрею відповідно до ДСТУ ISO 14971:2009 «Вироби медичні. Настанови щодо управління ризиком» із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок. Було встановлено, що найбільш критичним етапом виробництва є ділянка приготування стерильного розчину (табл. 6), що включає приготування напівпродукту та стерилізуючу фільтрацію препарату. Проведена перспективна валідація найкритичніших етапів технології засвідчила її стабільність та відповідність встановленим критеріям прийнятності.

Таблиця 6

**Перелік контрольних точок виробництва стадії
ТП 6 Приготування стерильного розчину**

Підстадія технологічного процесу	Контрольна точка	Параметр для контролювання	Нормативне значення параметру	Методи контролю і/або прилад	Періодичність контролю
ТП 5.1 Додавання субстанції рІЛ-7	Кт 5.1.1	Температура розчину	2÷8 °С	Термометр	Кожна серія
	Кт 5.1.2	Кислотність розчину	pH 7÷8	ДФУ 2.0, 2.2.3, рН-метр	Кожна серія
ТП 5.2 Стерилізуюча фільтрація розчину	Кт 5.1.3	Цілісність фільтрів*	Відсутність механічних дефектів	Дифманометр	Періодично
	Кт 5.1.4	Стерильність	Стерильно	ДФУ 2.0, 2.6.1	Періодично
	Кт 5.1.5	Температура розчину	2÷8 °С	Термометр	Кожна серія
	Кт 5.1.6	Осмоляльність	60÷80 мосмоль/л	ДФУ 2.0, 2.2.35	Періодично

* У процесі фільтрації послідовно використовуються фільтри із розміром пор 0,45 мкм та 0,22 мкм.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведені теоретичне узагальнення і нові шляхи вирішення наукової задачі, що стосується розробки біотехнології створення різних форм препарату рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини (рІЛ-7) та його стандартизації. Результати досліджень дають змогу зробити наступні висновки.

1. Було обґрунтовано раціональні параметри біотехнології отримання та очистки рІЛ-7, що дозволяє одержувати останній із високою біологічною активністю *in vitro* (поживне середовище складу №1, 37,5 °С, 17 годин, індукція на основі *lacUV5* промотора). Показано, що рІЛ-7 накопичується у клітинах *E. coli* штаму BL21 (DE3) у вигляді тілець-включень; частка цільового білку становить 15-20% від всіх бактеріальних білків, а вихід складає 0,9 мг/мл біомаси. Розроблена схема очистки цільового продукту передбачає поєднання гель-фільтрації на сефедексі G-25 та іонообмінної хроматографії на сефарозах Q і SP.

2. Вперше було показано, що рІЛ-7 ефективно інгібує репродукцію сурогатного вірусу гепатиту С (ВГС) в умовах *in vitro* (CC₅₀ – 3 мкг/мл, ED₅₀ – 4,7 нг/мл, IS – 640). Найвища проліферація інтактних Т-клітин визначається при дозах рІЛ-7 0,3 і 0,025 мкг/мл. рІЛ-7 по-різному впливав на інфіковані ВГС культури: в перші 3 доби кількість клітин зменшувалася або не змінювалася, а через 2-3 тижні – збільшувалася майже в 2 рази.

3. Проведено адаптацію методики визначення біологічної активності рІЛ-7 із використанням мононуклеарних клітин периферичної крові людини. Результати здійсненої валідації даної методики за такими показниками як специфічність, лінійність, правильність та прецизійність довели можливість застосування даного методу для рутинного аналітичного контролю якості препаратів рІЛ-7.

4. Обґрунтовано профіль якості спрею назального на основі рІЛ-7, що відповідає вимогам керівних документів, розроблено склад препарату та технологію його виготовлення. Шляхом визначення зміни біологічної активності рІЛ-7 *in vitro* протягом 1 року (противірусна дія щодо ВГС, вірусу простого герпесу II типу та вірусу грипу; проліферація мононуклеарних клітин периферичної крові людини) встановлено склад препарату, що забезпечує найкращі показники стабільності (рецептура на основі консерванту ніпагіну та стабілізатору поліетиленгліколю 400).

5. Обґрунтовано технологічну та апаратурну схеми виготовлення спрею назального на основі рІЛ-7.

6. Науково обґрунтовано параметри аналітичної стандартизації субстанції рІЛ-7 та препарату назального застосування на його основі, а також розроблено методи контролю їх якості. Встановлено, що розроблений препарат володіє антимікробною активністю по відношенню до тест-мікроорганізмів (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*). З метою нейтралізації антимікробної активності було запропоновано та доведено ефективність використання лецитину та полісорбату як речовин, що знімають антибактеріальний ефект, у поєднанні із розведенням досліджуваного зразка у 50 разів під час перевірки його мікробіологічної чистоти.

7. Обґрунтовано доцільність оцінки ризиків у технології отримання препарату на основі рІЛ-7 у формі назального спрею із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок. Встановлено, що найбільш критичним

етапом виробництва є ділянка приготування стерильного розчину, що включає приготування напівпродукту та стерилізуючу фільтрацію препарату. Проведена перспективна валідація найкритичніших етапів технології засвідчила її стабільність та відповідність встановленим критеріям прийнятності.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ Монографія

1. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Отримання рекомбінантних білків та їх використання у серодіагностиці / Біотехнологічні основи створення засобів серологічної діагностики інфекційних та неінфекційних захворювань: Монографія / О.Ю. Галкін, В.П. Широбоков, А.А. Григоренко, О.М. Дуган, Т.М. Луценко, А.Г. Комар; Під ред. В.П. Широбокова. - К.: НТУУ «КПІ», 2015. - 204 с. *(Здобувач провела аналіз та обговорення наукових даних щодо рекомбінантних білків та їх медичного використання)*

Статті у фахових наукових виданнях України та інших країн

2. Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Карпенко О.Я., Дуган О.М. Обґрунтування параметрів стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». - 2015. - Вип. 812. - С. 175-183. *(Здобувач провела аналіз даних літератури та власних наукових даних щодо параметрів стандартизації препаратів на основі рекомбінантних білків та рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини зокрема)*

3. Порва Ю.І., Рибалко С.Л., Дядюн С.Т., Луценко Т.М., Галкін О.Ю., Похолоenko Я.О., Горбатюк О.Б. Дослідження противірусної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини на різних моделях експериментальної вірусної інфекції гепатиту С // Наукові вісті НТУУ «КПІ». - 2015. - №3. - С. 52-60. *(Входить до міжнародних наукометоричних баз даних: DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, Ulrich's Periodicals Directory, BASE тощо) (Здобувач брала участь у плануванні експериментів, отриманні рекомбінантного білка, проведенні вірусологічних досліджень, аналізі отриманих результатів)*

4. Луценко Т.Н., Галкин А.Ю. Обоснование биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 человека рекомбинантного // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химия, технология органических веществ и биотехнология». - 2015. - № 4 (177). - С. 188-197. (Білорусь). *(Входить до міжнародної наукометоричної бази даних РІНЦ) (Здобувач провела аналіз даних літератури та власних наукових даних щодо технології отримання рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини)*

5. Луценко Т.М., Андрюкова Л.М., Фетісова Н.Г., Марінцова Н.Г., Галкін О.Ю. Обґрунтування складу та технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Вісник Національного університету «Львівська політехніка». Серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». - 2016. - Вип. 841. - С. 174-180. *(Здобувач брала участь у плануванні експериментів, отриманні готової лікарської форми rIL-7, провела аналіз отриманих даних)*

6. Луценко Т.М., Старосила Д.Б., Рибалко С.Л., Галкін О.Ю. Методи оцінки біологічної активності рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та дослідження

стабільності препарату на його основі // Наукові вісті НТУУ «КПІ». - 2016. - №3. - С. 48-54. (Входить до міжнародних наукометоричних баз даних: DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, Ulrich's Periodicals Directory, BASE тощо) *(Здобувай брала участь у плануванні експериментів, отриманні рекомбінантного білка, проведенні вірусологічних досліджень, аналізі отриманих результатів)*

7. Луценко Т.М., Горшунов Ю.В., Мотроненко В.В., Галкін О.Ю. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація // Наукові вісті НТУУ «КПІ». - 2017. - №3. - С. 56-63. (Наукове фахове видання України з технічних наук. Входить до міжнародних наукометоричних баз даних: DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, Ulrich's Periodicals Directory, BASE тощо) *(Здобувач провела аналіз технологічного процесу та його валідацію)*

8. Motronenko V.V., Lutsenko T.M., Ruzhynska L.I., Gorshunov Yu.V., Galkin A.Yu. Comparative analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия «Химические технологии, биотехнологии, геоэкология». - 2017. - № 2 (199). - С. 241-246. (Білорусь). (Входить до міжнародної наукометоричної бази даних РІНЦ) *(Здобувач брала участь у аналізі літературних та власних даних щодо особливостей культивування рекомбінантних бактерій)*

Статті у інших наукових виданнях

9. Galkin O.Yu., Lutsenko T.M., Gorshunov Yu.V., Motronenko V.V. Development of the method for microbiological purity testing of recombinant human interleukin-7-based product // Ukr. Biochem. J. - 2017. - Vol. 89, 3. - P. 52-59. (Входить до міжнародних наукометоричних баз даних: **Scopus**, PubMed, CrossRef, Medline, DOAJ, Embase, CAS, Google Scholar, CAS, РІНЦ тощо) *(Здобувач проводила планування роботи, виконувала мікробіологічні дослідження, провела аналіз отриманих даних)*

10. Lutsenko T.N., Kovalenko M.V., Galkin O.Yu. Validation of biological activity testing procedure of recombinant human interleukin-7 // Ukr. Biochem. J. - 2017. - Vol. 89, 1. - P. 82-89. (Входить до міжнародних наукометоричних баз даних: **Scopus**, PubMed, CrossRef, Medline, DOAJ, Embase, CAS, Google Scholar, CAS, РІНЦ тощо) *(Здобувач проводила планування роботи, виконувала імунологічні дослідження, провела аналіз отриманих даних)*

Тези доповідей

11. Lutsenko T.N., Galkin A.Yu. Biotechnological approaches of producing recombinant interleukin-7 human // Тези доповідей міжнародної наукової конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи в XXI столітті» (14-15 квітня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 47-48.

12. Луценко Т.М. Біологічна стандартизація препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Тези X Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття», присвяченої 135-й річниці від дня народження Олександра Флемінга (22 квітня 2016 р., м. Київ). – К.: 2016. – С. 53.

13. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Питання стандартизації субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Збірник тез V Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (12-13 травня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 47-48.

14. Луценко Т.М., Галкін О.Ю. Основні аспекти біологічної стандартизації препаратів на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини // Тези VII Науково-практичної конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2016. Молодіжний форум з нанобіотехнологій-2016» (25-26 травня 2016 р., м. Київ). – К., 2016. – С. 81.

АНОТАЦІЯ

Луценко Т. М. Біотехнологія препаратів рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та їх стандартизація. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, Київ, 2018.

Робота присвячена науковому обґрунтуванню та розробленню біотехнології субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини (рІЛ-7) людини та назального препарату рІЛ-7 людини, а також параметрів їх технологічної та аналітичної стандартизації. Розроблено оптимізовану технологію біосинтезу, виділення та очистки рІЛ-7 із високою біологічною активністю *in vitro*. Вперше показано наявність безпосередньої противірусної активності рІЛ-7 по відношенню до вірусу гепатиту С в умовах *in vitro* та доведено можливість використання відповідної методики для стандартизації препаратів на основі рІЛ-7. Вперше науково обґрунтовано технологію отримання назальної форми препарату на основі отриманого рІЛ-7, а також принципи його аналітичної стандартизації із застосуванням фізико-хімічних, мікробіологічних та імунологічних методів. Проведено адаптацію та валідацію методики визначення біологічної активності рІЛ-7 із використанням моноклеарних клітин периферичної крові людини, що дозволило використовувати запропонований метод для рутинного аналітичного контролю якості препаратів на основі рІЛ-7. Проведено перспективну валідацію технології отримання назального спрею на основі рІЛ-7 із застосуванням системи аналізування ризиків та критичних контрольних точок, яка підтвердила стабільність процесу та його відповідність критеріям прийнятності.

Ключові слова: рекомбінантний інтерлейкін-7 людини, технологія, стандартизація, біологічна активність, валідація.

АННОТАЦИЯ

Луценко Т.Н. Биотехнология препаратов рекомбинантного интерлейкина-7 человека и их стандартизация. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского» МОН Украины, Киев, 2018.

Работа посвящена научному обоснованию и разработке биотехнологии субстанции рекомбинантного интерлейкина-7 человека (рИЛ-7) человека и назального препарата рИЛ-7 человека, а также параметров их технологической и аналитической стандартизации. Разработана оптимизированная технология

биосинтеза, выделения и очистки рИЛ-7 с высокой биологической активностью *in vitro*. Впервые показано наличие непосредственной противовирусной активности рИЛ-7 по отношению к вирусу гепатита С в условиях *in vitro* и доказана возможность использования соответствующей методики для стандартизации препаратов на основе рИЛ-7. Впервые научно обоснована технология получения назальной формы препарата на основе полученного рИЛ-7, а также принципы его аналитической стандартизации с применением физико-химических, микробиологических и иммунологических методов. Проведено адаптацию и валидацию методики определения биологической активности рИЛ-7 с использованием моноклеарных клеток периферической крови человека, что позволило использовать предложенный метод для рутинного аналитического контроля качества препаратов на основе рИЛ-7. Проведено перспективную валидацию технологии получения назального спрея на основе рИЛ-7 с применением системы анализа рисков и критических контрольных точек, которая подтвердила стабильность процесса и его соответствие критериям приемлемости.

Ключевые слова: рекомбинантный интерлейкин-7 человека, технология, стандартизация, биологическая активность, валидация.

SUMMARY

Lutsenko T.M. Biotechnology of preparations of recombinant human interleukin-7 and its standardization. – On the rights of manuscripts.

Thesis for the degree of a candidate of technical sciences in the specialty 03.00.20 – biotechnology. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”, Kyiv, 2018.

Interleukin-7 (IL-7) was first isolated nearly 30 years ago. However, a complete set of physiological functions of this cytokine, especially those involved in the regulation of homeostasis of lymphocytes, was only recently discovered. IL-7 is a central cytokine of the immune system, which plays an important role in the modulation of T- and B-cell development and T-cell homeostasis. Potentials and a wide range of effects suggest that IL-7 operation will stimulate immunity in patients with lymphocytic exhaustion, autoimmune diseases, etc. In terms of therapeutic potential, there is a strong interest in the development of technologies for the production of a biologically active polypeptide IL-7. Referring to modern advances in molecular biology, genetics and biotechnology, the optimal solution in developing the technology of human IL-7 production is to create a recombinant producer for the synthesis of the described cytokine. The benefits of receiving and using a recombinant protein are the ability to synthesize significantly larger amounts of target protein, sufficient for the production of the finished dosage forms, its viral safety, and obtaining protein with improved properties. The development of biotechnologies for the preparation of drugs based on recombinant human interleukin-7 and its bioanalytical standardization are extremely topical and priority tasks of modern industrial and analytical biotechnology.

The purpose of the work was to provide scientific substantiation and development of biotechnology of substance of rIL-7 and nasal preparation of rIL-7, as well as parameters of its technological and analytical standardization. To achieve the goal, the following tasks were set. To develop a technology for the production of a substance of rIL-

7, suitable for the manufacture of non-sterile drugs from it. To develop the technology of obtaining the finished preparation of nasal application on the basis of the substance of rIL-7. To investigate the biological activity of rIL-7 on various *in vitro* models as a basis for biological standardization of preparations. To substantiate the parameters of analytical standardization of various preparations of rIL-7, to develop methods to control its quality and to validate it. Conduct a study of the stability of various drugs of rIL-7. To carry out the perspective validation of the technology of manufacturing the finished preparation of rIL-7 on the basis of risk assessment of the manufacturing process.

An optimized biosynthesis technology, isolation and purification of rIL-7 with high biological activity *in vitro* were developed. For the first time, the presence of direct antiviral activity of rIL-7 in relation to the hepatitis C virus *in vitro* and the possibility of using an appropriate method for standardizing drugs based on rIL-7 was demonstrated. For the first time, the technology of obtaining the nasal form of the drug on the basis of the received rIL-7, as well as the principles of its analytical standardization with the use of physico-chemical, microbiological and immunological methods, is scientifically substantiated. The results of the work were supplemented with modern scientific and methodical approaches for the preparation of preparations of recombinant proteins for therapeutic purposes. The adaptation and validation of the method of determining the biological activity of rIL-7 with the use of mononuclear cells of human peripheral blood has been carried out, which allowed using the proposed method for routine analytical quality control of drugs based on rIL-7. Perspective validation of the technology for the preparation of nasal spray on the basis of rIL-7 with the use of the system of risk analysis and critical control points has been proven, which confirmed the stability of the process and its compliance with the eligibility criteria. For the nasal form of rIL-7, technical specifications TU U 20.4-34414427-013:2017 “Prophylactic and hygienic product” have been developed, for which the positive conclusion of the state sanitary-and-epidemiological examination from the State Service of Ukraine for Food Safety and Consumer Protection was received. The scientific and methodological recommendations for the analysis of the risks of nasal spray technology on the basis of recombinant proteins are used by the State Medical Enterprise of the Ukrainian Medical Certification Center of the Ministry of Health of Ukraine (Kyiv) in assessing the conformity of medical products regulated by the Decree of the Cabinet of Ministers of Ukraine dated October 2, 2013 No. 753 “On Approval of the Technical Regulations Regarding Medical Products”. The results of the work were introduced in teaching medical biotechnology courses “Medical biotechnology” and “Development of biopharmaceutical products and production organization”.

Keywords: recombinant human interleukin-7, technology, standardization, biological activity, validation.