

APROBAT

Secția AȘM Științe ale Vieții

Coordonator științific *Recenzia Comisia*

Dr. hab. Acad. Bogdan GAINA

Academia de Științe a Moldovei

Data: *16.03.2022*

L.S. *[Signature]*



APROBAT

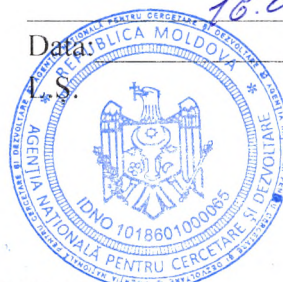
Agencia Națională pentru Cercetare și Dezvoltare

Director general

Dr. hab. Olga TAGADIUC *[Signature]*

16.03.2022

Data:



RAPORT FINAL

privind executarea proiectului de inovare și transfer tehnologic

21.80015.8007.244T

„Procedeu de cultivare a materiei prime pe baza de Pichia pastoris cu expresia
hormonului de crestere”

04.01.2021-31.12.2021

Conducătorul proiectului

Liliana RUSNAC *[Signature]*

Conducătorul instituției-contractor

Emil CEBAN *[Signature]*



Chișinău 2021

1. Scopul, obiectivele, activitățile și rezultatele propuse spre realizare în cadrul proiectului și cele obținute în cadrul proiectului

Scopul (uri) propus(e)	Scopul (uri) realizat(e)
Crearea WCB (working cell bank) a culturii de Pichia pastoris pentru stocare de durată scurtă și lungă, cu preparare ulterioară a inocului (inoculum) pentru creșterea culturii de Pichia pastoris cu expresia hormonului de creștere uman.	A fost creată banca celulelor de lucru (WCB - working cell bank) a culturii de Pichia pastoris pentru stocare de durată scurtă și lungă, ulterior a fost preparat inocul (inoculum) pentru creșterea culturii de Pichia pastoris cu expresia hormonului de creștere uman.
Obiectivele propuse	Obiectivele realizate
1. Elaborarea sarcinii tehnice a proiectului	1. A fost elaborată sarcina tehnică a proiectului și scris caietul de sarcini al proiectului
2. Achiziționarea echipamentului, reactivelor și consumabilelor necesare executării proiectului	2. Au fost achiziționate echipamente și utilaje (20 unități de echipamente și fermentatorul Biorus BLBio-30SJDA pentru creșterea biomasei de Pichia pastoris), reactivi și reagenți (45 poziții), precum și consumabile necesare pentru executarea proiectului
3. Crearea WCB (working cell bank)	3. Au fost stabilite condițiile necesare pentru crearea WCB în cadrul întreprinderii Balkan Pharmaceuticals, s-a elaborat Procedura Standart de Operare "Crearea băncii celulelor de lucru", au fost formulate Regulamentele Tehnologice ale proceselor de stocare pe termen scurt și pe termen lung a tulpinilor de Pichia pastoris cu expresia hormonului de creștere uman recombinat.
4. Prepararea inocului și creșterea culturii de Pichia pastoris în paharul Erlenmeyer	4. Au fost stabilite condițiile necesare pentru prepararea inocului, mediului de creștere a coloniilor și procesului de inoculare cu scopul creșterii culturii de Pichia pastoris în paharul Erlenmeyer în cadrul întreprinderii Balkan Pharmaceuticals. A fost elaborată Procedura Standart de Operare BIOASSAY – Activitatea biologică a preparatului hormon de creștere uman recombinat. A fost elaborat Regulamentul Tehnologic al procesului de pregătire, inoculare și creștere a tulpinii de Pichia pastoris cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer.
Activitățile propuse	Activitățile realizate

<p>1. Elaborarea sarcinii tehnice a proiectului cu stipularea principalelor obiective ca domeniul de aplicare, scopul și conținutul lucrărilor, rezultatele scontate, metode și mijloace de realizare a proiectului.</p>	<p>1. A fost elaborat caietul de sarcini ale proiectului cu stipularea obiectivului general, obiectivelor strategice și specifice; domeniului de aplicare, conținutului și duratei lucrărilor; rezultatelor scontate (inclusiv rezultatul general final al proiectului și rezultatele per etapă), precum și produselor livrabile, adaptate scopului proiectului; activităților contractuale etapizate; metodelor și mijloacelor de realizare; sustenabilității proiectului, asigurate de întreprinderea Balkan Pharmaceuticals care posedă capacitățile necesare de a asigura operarea și întreținerea investiției după finalizare.</p>
<p>2. Achiziționarea echipamentului, reactivelor și reagenților, consumabilelor necesare executării proiectului.</p>	<p>2.1. A fost perfectat demersul de achiziție a utilajului și echipamentului în cadrul proiectului. Au fost elaborate algoritmul și criteriile de selectare, stipulate caracteristicile căutate ale echipamentului pentru colectarea și procesarea probelor biologice (20 unități de echipamente).</p> <p>2.2. A fost perfectat demersul de achiziție a reactivelor și reagenților pentru scopuri științifice în cadrul proiectului. Au fost elaborate specificațiile tehnice depline solicitate și stipulate standardele de referință pentru reactive și reagenți (45 poziții de reactive și reagenți).</p> <p>2.3. A fost perfectat demersul de achiziție a consumabilelor în cadrul proiectului. Au fost elaborate algoritmul și criteriile de selectare, stipulate caracteristicile căutate ale consumabilelor pentru executarea proiectului.</p> <p>2.4. A fost selectat fermentatorul Biorus BLBio-30SJDA pentru creșterea biomasei de Pichia pastoris și petrecut procesului de procurare a bioreactorului de către cofinantator SC Balkan Pharmaceuticals SRL.</p>
<p>3. Elaborarea condițiilor de creare a Working Cell Bank.</p>	<p>3. A fost elaborată Procedura Standart de Operare "Crearea WCB (Working Cell Bank)" cu scopul de a stabili procedura corectă și principiile necesare pentru formarea băncii de celule de Pichia pastoris cu hormonul de creștere uman în cadrul laboratorului de microbiologie al întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL. Au fost stabilite echipamentele, materialele, reactivele și mediile necesare creării băncii de celule. A fost elaborat modul de lucru, inclusiv procesul de pregătire, igienizare a încăperii, mediilor, reactivelor, materialelor folosite, precum și pregătirea coloniilor de P.pastoris pentru stocare. Protocolul stipulează etapele, condițiile, durata, compoziția mediului de cultură etc. necesare</p>

4. Elaborarea Regulamentului Tehnologic al procesului de stocare de scurtă durată.

procesului de însămânțare a tulpinilor de *P.pastoris*.

4. A fost elaborat Regulamentul Tehnologic al procesului de stocare pe termen scurt a tulpinilor de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere uman recombinat cu scopul de a stabili pașii și principiile necesare pentru stocarea pe termen scurt a tulpinilor de *P. pastoris* în cadrul laboratorului de microbiologie al întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL. Au fost stabilite echipamentele, materialele, reactivele și mediile necesare executării etapei de stocare. A fost stabilit modul de lucru, inclusiv procesul de pregătire, igienizare și dotare a încăperii; pregătirea și deschiderea mediilor, reactivelor, materialelor necesare.

În procesul de pregătire a coloniilor de *P.pastoris* pentru stocare pe termen scurt se utilizează YPD agar cu adaos de geneticin, G418 (pentru GS115- HGH ClonaB9) turnat în plăci Petri sau eprubete (încălzit). Protocolul descris stipulează etapele, condițiile, durata de incubare și durata de stocare cu concretizarea condițiilor de temperatură optimă pentru procesul de stocare a tulpinilor de *P.pastoris* pe termen scurt timp de 2-4 zile la 30°C sau câteva săptămâni sau luni la temperatura 4°C.

5. Elaborarea Regulamentului Tehnologic al procesului de stocare pe termen lung.

5. A fost elaborat Regulamentul Tehnologic al procesului de stocare pe termen lung a tulpinilor de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere uman recombinat cu scopul de a stabili pașii și principiile necesare pentru stocarea pe termen lung a tulpinilor de *P. pastoris* în cadrul laboratorului de microbiologie al întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL. Au fost stabilite echipamentele, materialele, reactivele și mediile necesare executării etapei de stocare. A fost stabilit modul de lucru, inclusiv procesul de pregătire, igienizare și dotare a încăperii; pregătirea și deschiderea mediilor, reactivelor, materialelor necesare.

În procesul de pregătire a coloniilor de *P.pastoris* pentru stocare pe termen lung se utilizează YPD agar cu adaos de geneticin, G418 (pentru GS115- HGH ClonaB9) în 30 ml de YPD bullion într-un pahar Erlenmeyer, după care se plasează pe un Shaker la viteza 150 rpm și se incubează 24 ore la 30°C, apoi se adaugă 5% glicerol (steril, de 99%), se amestecă bine și se toarnă în criovase de 2 ml câte 1ml de soluție. Criovasele se congelează și se pastrează în azot

<p>6. Elaborarea procedurii pentru determinarea activității biologice a hormonului de creștere recombinat uman pentru biotestare <i>in-vitro</i>.</p>	<p>lichid sau la -80°C. La maximum 2 ani Working Cell Bank se reinnoiește. Protocolul descris stipulează etapele, condițiile, durata de incubare și durata de stocare cu concretizarea condițiilor de temperatură optimă pentru procesul de stocare a tulpinilor de <i>P.pastoris</i> pe termen lung timp de 2 ani maximum la -80°C sau în azot lichid.</p> <p>6. A fost elaborată Procedura Standart de Operare BIOASSAY – Activitatea biologică a preparatului hormonul de creștere uman recombinat, având ca scop stabilirea unei proceduri pentru determinarea activității biologice a hormonului de creștere recombinat uman prin biotestare <i>in-vitro</i>, care ține de controlul calității produsului finit solicitată de Farmacopeea Europeană (Monografia Somatropin 0951), această testare urmând să fie realizată în cadrul laboratorului de microbiologie al întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL. A fost stipulat modul de lucru, inclusiv procesul de pregătire, igienizare și dotare a încăperii; pregătirea și deschiderea mediilor, reactivelor, materialelor necesare.</p> <p>Analiza <i>in-vitro</i> urmează să utilizeze o linie celulară limfom adecvată, Nb2-11, a căror proliferare depinde de lactogeni de mamifere, iar creșterea celulelor și densitatea în prezența HGH este măsurată cu ajutorul unui colorant fluorescent sau a unei citiri vizibile cu colorant MTT sau colorant MTS. Au fost stabilite echipamentele, materialele, reactivile și mediile necesare determinării activității biologice a hormonului de creștere recombinat uman. Au fost stabilite etapele testării și metodologia testării, descrisă identificarea prin metoda cu MTS și MTT. A fost prezentată citirea și aprecierea rezultatelor în conformitate cu cerințele Farmacopeei Europene. Astfel, potența estimată a HGH trebuie să fie cuprinsă în limitele $> 80\%$ și $< 125\%$ din potența declarată. Limitele de încredere ($p = 0,95$) ale potenței estimate trebuie să fie incluse în limitele $64\% - 156\%$ din potența declarată.</p>
<p>7. Elaborarea Regulamentului Tehnologic al procesului de pregătire, inoculare și creștere a tulpinilor de <i>Pichia pastoris</i> cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer.</p>	<p>7. A fost elaborat Regulamentul Tehnologic al procesului pregătire, inoculare și creștere a tulpinilor de <i>Pichia pastoris</i> cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer, cu scopul de a stabili pașii și principiile necesare pentru pregătirea, inocularea și creșterea tulpinilor de <i>P. pastoris</i> în cadrul laboratorului de microbiologie al întreprinderii producătoare SC Balkan</p>

	<p>Pharmaceuticals SRL. Au fost stabilite echipamentele, materialele, reactivile și mediile necesare executării acestei etape. A fost stabilit modul de lucru, inclusiv procesul de pregătire, igienizare și dotare a încăperii: pregătirea și deschiderea mediilor, reactivelor, materialelor necesare. Au fost stabilite etapele testării și anume: i) dezghețarea coloniilor de P.pastoris din WCB, ii) prepararea mediului de creștere a coloniilor microorganismului, iii) primul proces de inoculare a coloniilor în paharul Erlenmeyer cu capacitatea 500ml pe mediu YPg timp de 24-26 ore, iv) al doilea proces de inoculare a coloniilor de P. Pastoris, obținute la etapa precedentă în paharul Erlenmeyer cu capacitatea de 4l pe mediu YPg timp de 20 ore, v) determinarea densității optice la 600nm. Pentru fiecare etapă a fost elaborată metodologia și condițiile de testare, a fost stabilit termenul de valabilitate a mediului utilizat.</p> <p>8. A avut loc ședința de lucru cu reprezentantul ICGEB (Dna doctor Natasa Scoco, Head of Biotech Development Unit, ICGEB, Italia) privind implicarea și aportul ICGEB în desfășurarea proiectului.</p> <p>9. A fost prezentat raportul "Perspectives of biosimilars research and manufacturing in Republic of Moldova" în cadrul conferinței științifico-practice cu participare internațională "Perspective în cercetarea produselor farmaceutice de origine sintetică și naturala" din 14.05.2021, autori V.Grigoriev, V.Valica, R.Cazacu, V. Cazacu, L.Rusnac.</p>
<p align="center">Rezultatele propuse</p>	<p align="center">Rezultatele obținute</p>
<p>Rezultatul general: elaborarea procesului tehnologic de cultivare a vectorului Pichia pastoris cu expresia hormonului de creștere uman: elaborarea condițiilor de creare a working cell bank, condițiilor de preparare a inocului și de creștere a culturii Pichia pastoris. Elaborarea documentației aferente acestor activități.</p> <p>Rezultate:</p>	<p>Rezultatul general: a fost realizată elaborarea procesului tehnologic de cultivare a vectorului Pichia pastoris cu expresia hormonului de creștere uman: au fost elaborate condițiile de creare a working cell bank, condițiile de preparare a inocului și creștere a culturii de Pichia pastoris cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer. A fost elaborată documentația aferentă acestor activități (Caietul de sarcini al proiectului, 3 Regulamente Tehnologice, 2 Proceduri Standarde de Operare).</p> <p>Rezultate:</p>

<p>1. Achiziționarea echipamentelor și utilajelor, reactivelor, reagenților și consumabilelor necesare executării proiectului.</p> <p>2. Elaborarea procedurii de operare pentru condițiile de creare a working cell bank.</p> <p>3. Elaborarea Regulamentului Tehnologic de stocare pe durată scurtă și pe termen îndelungat al celulelor de Pichia pastoris.</p> <p>4. Elaborarea procedurii de operare pentru determinarea activității biologice a preparatului hormonul de creștere uman recombinat - BIOASSAY.</p> <p>5. Elaborarea Regulamentului Tehnologic al procesului de prerare a inocului, inoculare și creștere a tulpinilor de Pichia pastoris cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer.</p> <p>6. Elaborarea și aprobarea documentației tehnice de realizare a proceselor vizate.</p>	<p>1. În baza algoritmului și criteriilor de selectare elaborate, având în vedere caracteristicile necesare, specificațiile tehnice depline și standardele de referință, au fost achiziționate echipamente și utilaje, reactiv, reagenți și consumabile necesare executării proiectului.</p> <p>2. A fost elaborată Procedura Standart de Operare "Crearea băncii celulelor de lucru".</p> <p>3. A fost elaborat Regulamentul Tehnologic al procesului de stocare pe termen scurt a tulpinilor de Pichia pastoris cu expresia hormonului de creștere uman recombinat. A fost elaborat Regulamentul Tehnologic al procesului de stocare pe termen lung a tulpinilor de Pichia pastoris cu expresia hormonului de creștere uman recombinat.</p> <p>4. A fost elaborată Procedura Standart de Operare BIOASSAY – Activitatea biologică a preparatului hormonul de creștere uman recombinat.</p> <p>5. A fost elaborat Regulamentul Tehnologic al procesului de prerare a inocului, inoculare și creștere a tulpinilor de Pichia pastoris cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer.</p> <p>6. Au fost elaborate în cadrul proiectului de transfer tehnologic și aprobate în cadrul Întreprinderii Balkan Pharmaceuticals 3 Regulamente Tehnologice și 2 Proceduri Standarde de Operare.</p>
--	--

2. Descrierea detaliată a tehnologiei/serviciului/produsului obținut în cadrul proiectului (funcționalitatea, durabilitatea, parametri distinși/diferiți de cei existenți deja în sectorul respectiv al economiei țării)

Creșterea gradul de conștientizare cu privire la eficacitatea hormonilor de creștere, cererea de terapii cu hormoni de creștere eficiente din punct de vedere al costurilor; creșterea prevalenței

bolilor cronice grave, cum ar fi bolile renale cronice și retardul de creștere și disfuncțiile hipofizare; și creșterea conformității pentru formulările de hormoni de creștere sunt principalii factori care determină creșterea pieței globale a acestora. Proiectul s-a soldat cu crearea în cadrul întreprinderii Balkan Pharmaceuticals în procesul de skale-up de la faza de laborator la faza pilot a WCB (working cell bank) a culturii de *Pichia pastoris* pentru stocare de durată scurtă și lungă, cu prepararea ulterioară a inocului și creșterea culturii *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere uman în paharul Erlenmeyer, care constituie o etapă incipientă indispensabilă producerii biosimilarelor. Întrucât administrarea medicamentului de sinteză chimică s-a dovedit a fi adesea devastatoare asupra sănătății populației umane, utilizarea produselor biosimilare constituie o alternativă superioară de necontestat, anume grație faptului că medicamentele biologice conțin substanțe active provenite dintr-o sursă biologică, de exemplu din celule sau organisme vii și sunt mult mai apropiate organismului viu, și respective posedă o eficiență și inofensivitate sporită. Menținerea unei linii celulare în cultură continuă sau extinsă prezintă în sine o practică cu multe puncte slabe printe care se numără:

- riscul de contaminare microbiană;
- pierderea caracteristicilor de interes (de exemplu, expresia antigenului de suprafață sau a anticorpilor monoclonali);
- deriva genetică, în special în celulele cunoscute ca având un cariotip instabil; pierderea liniei celulare din cauza depășirii duratei de viață finite (de exemplu, celule diploide umane, cum ar fi MRC-5);
- risc de contaminare încrucișată cu alte linii celulare;
- creșterea consumabilelor și a costurilor cu personalul

Toate aceste riscuri sunt minimizate sau excluse prin utilizarea working cell bank. Implementarea WCB asigură: calitate constantă a materialului, efectuarea experimentelor folosind culturi din același interval de numere de trecere, prezența celulelor în cultură numai atunci când este necesar, păstrarea caracteristicilor liniei celulare originale. Utilizarea working cell bank reduce, de asemenea, costul proceselor de cultură celulară, oferind o alternativă rentabilă pentru păstrarea constantă a celulelor în cultură. De asemenea, acesta reduce în mod eficient frecvența eșantioanelor de celule care se diversifică de la diviziunile celulare naturale în timp.

Pe piața autohtonă crearea working cell bank are loc în premieră, analogi și concurenți locali realizarea acestui proiect nu are. Perioada redusă de desfășurare a proiectului a permis inițierea cercetării conceptului și implimentării locale a experienței internaționale împărtășite de partenerii proiectului, identificarea unor metode de implimentare în practică, mijloace adecvate de mentenanță, documentarea modului de lucru și condițiilor optime de funcționare. Actualmente pe piața Republicii Moldova este autorizat un singur produs medicamentos din grupul hormonilor lobului hipofizar anterior și analogi, anume Saizen®, pulbere și solvent pentru soluție injectabilă, 8 mg, deținător certificat de înregistrare Ares Trading S.A., Elveția, producător Merck Serono S.P.A., Italia. Astfel putem concluda că piața farmaceutică autohtonă nu se confruntă cu fenomenul de concurență la capitolul produse medicamentoase din grupul ATC H01AC01. Dat fiindcă terapia cu rhGH are de regulă o durată recomandată de câțiva ani și un regim de dozare individualizat cu un calcul al dozei bazat pe greutatea corporală a pacientului o problemă prioritară este creșterea aderenței și complianței la tratament a pacienților. Avantajul oferit

sistemului național de sănătate de concurența dintre medicamentele biosimilare constă în îmbunătățirea accesului pacienților la medicamente biologice sigure și eficiente, de o calitate dovedită și preț mai mic. Finalizarea proiectului nu presupune și finalizarea explorării și exploatării subiectului. Scopul global al activității constă nu doar în fabricarea primului biosimilar din Republica Moldova – un scop exhaustiv în sine, dar și în producția internă fără precedent a hormonului de creștere uman recombinant (rhGH). Acest fapt asigură explorarea empirică a celui mai promițător segment al industriei farmaceutice globale cu cea mai rapidă rată a creșterii. Realizarea proiectului a permis dotarea uzinei locale și USMF "N. Testemițanu" cu echipamentele și utilajele corespunzătoare, reactivile, reagenții și consumabilele necesare. Pe baza acestora se planifică implementarea unui șir de metode analitice și de control actuale și performante. Adiutantă acestei misiuni a fost atinsă creșterea gradului de calificare a angajaților ambilor parteneri de proiect. Per se domeniul biosimilarelor este unul eminent nemărginit pentru diverse cercetări științifice locale și internaționale în diapazonul imens al disciplinelor de medicină și farmacie și cu certitudine poate fi afirmat că pașii interprinși în cadrul proiectului sunt un start reușit și promițător atât pentru industria farmaceutică autohtonă cât și pentru cercetarea științifică în cadrul USMF.

Pentru obținerea hormonului de creștere recombinat a fost selectat în calitate de sisteme de expresie *Pichia pastoris*, care are multe avantaje în comparație cu alte organisme. Printre ele putem enumera prelucrarea, folding-ul proteinelor și modificările posttranslaționale ale proteinelor, dar în același timp, acest organism este la fel de ușor de manipulat ca *E. coli*. *Pichia pastoris* este o drojdie metilotrofă, capabilă să metabolizeze metanolul ca singura sursă de carbon. Primul pas în metabolizarea metanolului este oxidarea lui cu formarea de formaldehidă folosind oxigen molecular. Enzima care catalizează această reacție este alcool oxidază. Pe lângă formaldehidă, această reacție generează peroxid de hidrogen și din acest motiv reacția are loc în peroxizomi pentru a proteja celula de efectul toxic a peroxidului de hidrogen. În același timp alcool oxidaza are o afinitate slabă pentru O₂, iar *Pichia pastoris* compensează aceasta prin expresia mărită a acestei enzime. Promotorul care reglează producția de alcool oxidaza este unul din cei mai utilizați pentru producția proteinelor recombinante. La *Pichia pastoris* alcool oxidaza este codificată de două gene AOX1 și AOX2. Deși similitudinile dintre aceste gene este de 97%, se știe că drojdiile care au doar gena AOX2 activă cresc foarte încet. Ele sunt cunoscute ca tulpine Mut^s. Produsul genei AOX1 reprezintă cea mai mare parte a alcool oxidazei din celulă. Expresia genei AOX1 este strict reglată și indusă de metanol ajungând la niveluri foarte ridicate (până la 30% din proteina totală solubilă).

În dependență de necesități, *Pichia pastoris* poate exprima proteina de interes atât intracelular cât și extracelular în forma secretată. Secreția necesită prezența unei secvențe semnal pe proteina expresată. În acest context, *Pichia pastoris* are un avantaj major fiind folosită în calitate de sisteme de expresie prin aceea că ea secretă niveluri foarte scăzute de proteine native, ceea ce înseamnă că în mediul de cultură în mare parte se va afla proteina recombinată. Tipul vectorilor utilizați are influențe asupra locului de concentrare a proteinelor. Dacă dorim să avem o expresie intracelulară vom utiliza vectorii pHIL-D2 și pPIC3.5, iar dacă una extracelulară – vectorii pHIL-S1 și pPIC9. În proiectul "Procedeu de cultivare a materiei prime pe bază de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere", gena somatotropinei umane recombinantă a fost introdusă în genomul

culturii de *Pichia pastoris*. În calitate de vector a servit plasmidul pPIC9K care este predistinat pentru proteine secretate în interiorul căruia a fost introdusă gena somatropinei.

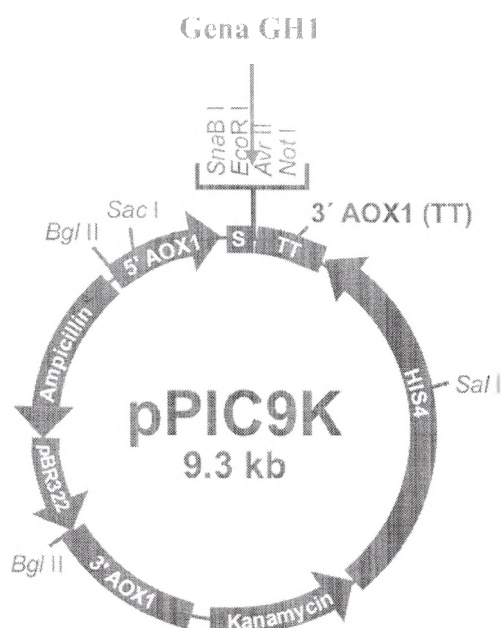


Fig. 1. Reprezentarea grafică a vectorului pPIC9K cu gena GH1 inserată

În organismul uman somatropina este codificată de către gena GH1, localizată pe cromozomul 17 și are 5 exoni. Pentru a fi introdusă în vectorul selectat (pPIC9K), gena GH1 a fost modificată. În primul rând au fost eliminați intronii, fiind păstrată doar secvența codificatoare. Mai apoi au fost înlocuiți unii codoni cu cei care sunt mai des utilizați de către *Pichia pastoris*, astfel încât să nu se modifice secvența de aminoacizi a somotropinei umane. În continuare, la secvența modificată s-a adăugat secvența "Prepro-alpha Factor Leader" de la *S. cerevisiae* pentru ca somatropina obținută să fie secretată în mediul de cultură.

Secvența de ADN ce conținea gena GH1 modificată a fost introdusă în vector cu ajutorul restricțazelor în apropierea de promotorul genei AOX1 (fig.1). În acest fel gena GH1 va fi activată de promotorul genei AOX1 care poate fi indus cu ușurință de prezența metanolului în mediul de cultură.

În cadrul colaborării între USMF "N.Testemițanu", întreprinderea farmaceutică Balkan Pharmaceuticals

și ICGEB (Centrul internațional pentru inginerie genetică și biotehnologie) au fost efectuate lucrări de transfer tehnologic a primelor etape de elaborarea a biomasei de *Pichia pastoris*. În cadrul ICGEB a fost obținut prin fermentare un număr de proteine recombinante farmaceutic active printre care și hormonul de creștere uman.

Conform Regulelor de Buna practică în Producere (GMP – Good Manufacturing Practice) transferul tehnologic în procesul de extrapolare (scale-up) de la faza de laborator la faza pilot permite trecerea ușoară și fără grijă a unui produs creat de serviciul de cercetare la faza de microproducție în cadrul întreprinderii producătoare de medicamente și ulterior la faza de producere a seriilor comerciale.

În procesul transferului tehnologic la etapa extrapolării de la faza de laborator la faza pilot a creării WCB - băncii celulelor de lucru și creșterii tulpinilor de *Pichia pastoris* în paharul Erlenmeyer au fost observate influența procedurii tehnologice ales asupra unor parametri ale produsului obținut, au fost elaborate Regulamente Tehnologice pentru procesele de stocare pe durată scurtă și pe termen lung al celulelor de *Pichia pastoris* și pentru procesul de preparare a inocului, inoculare și creștere a tulpinilor de *P. pastoris* cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer. Au fost elaborate Proceduri Standarde de Operare a proceselor de creare a băncii celulelor de lucru, determinării activității biologice a preparatului hormonul de creștere uman recombinat în cadrul întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL.

3. Descrierea infrastructurii și resurselor disponibile pentru continuarea proiectului și demonstrarea funcționalității acestuia (inclusiv utilajele procurate și/sau confecționate în cadrul proiectului)

Axa prioritară a proiectului "Procedeu de cultivare a materiei prime pe bază de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere" a fost implementarea inovațiilor și tehnologiilor noi, inclusiv prin transferul tehnologic, în scopul fabricării produselor competitive noi sau perfecționate, precum și în scopul utilizării unor procese, servicii și tehnologii progresive, în corespundere cu prioritățile și direcțiile strategice din Programul Național de Cercetare și Inovare pentru anii 2020-2023, aprobat prin Hotărârea Guvernului nr. 381/2019.

Proiectul se va susține financiar după încetarea finanțării solicitate prin prezentul proiect de cercetare și transfer tehnologic, întreprinderea Balkan Pharmaceuticals având capacitatea de a asigura operarea și întreținerea investiției după finalizare. Fondurile provin din veniturile proprii ale întreprinderii. Conducerea Balkan Pharmaceuticals SRL va lua măsurile necesare pentru asigurarea anuală a unor sume suficiente pentru acoperirea sustenabilității derulării ulterioare a proiectului. Compania Balkan Pharmaceuticals este prezentă pe piața din Republica Moldova din 2006. Din ianuarie 2009 înregistrează primele medicamente pe piața din Ucraina. În octombrie 2010, participă și câștigă prima licitație publică de achiziție a medicamentelor pentru necesitățile clinicilor și spitalelor din țară. La moment, compania Balkan Pharmaceuticals dispune de două fabrici de producere a medicamentelor, una în Chișinău și alta în or. Sîngera, amplasată pe un teritoriu de 2,5 hectare, în cadrul cărora activează peste 200 angajați – medici, chimiști, tehnologi, mecanici, programatori, ingineri. Fabrica permite creșterea semnificativă a volumului de producție și extinderea pe piața CSI și a Uniunii Europene. Compania are în portofoliul său actual peste 250 de medicamente în diferite forme și doze, printre care produse antitumorale, hormonale, medicamente cu efect asupra sistemului nervos, a celui cardio-vascular, digestiv, preparate cu efect antiinflamator, analgezic etc. Cu certitudine se poate afirma că Balkan Pharmaceuticals reprezintă una din întreprinderile care au cea mai mare pondere pe piața autohtonă. Compania dispune de avantaje competitive precum dimensiunea foarte mare, oferirea de produse la cele mai mici prețuri și la cel mai înalt nivel calitativ, domină segmentul de piață de medicamente antitumorale și hormonale. Realitățile din mediul de afaceri competitiv au demonstrat că elementul comun al avantajelor competitive menționate duc la crearea unui segment viabil și suficient de mare în atragerea utilizatorilor interesați de achiziționarea produselor oferite de companie, deoarece sunt percepute ca având o valoare globală superioară. Punctele forte ale companiei presupun oportunități potențiale precum: posibilitatea încheierii unor acorduri avantajoase cu parteneri din CSI și EU, în rezultat apariția de noi piețe, creșterea și liberalizarea celor deja existente, accesul la noi surse de investiții; investițiile străine directe; cererea din parte utilizatorilor de produse noi; accesul la tehnologii performante. Principalii factori ai competitivității companiei pot fi grupați în câteva categorii majore: financiare, comerciale, umane, tehnice, manageriale, organizaționale.

În baza algoritmului și criteriilor de selectare elaborate, caracteristicilor necesare a echipamentului pentru colectarea și procesarea probelor biologice (prezentare detaliată în tabelul de mai jos) și întocmirii demersului, a fost efectuată achiziția echipamentului prezentat, funcționalitatea și aria de implimentare a căruia depășește curentul proiectului și poate fi explorată în cadrul altor proiecte potențiale.

Echipament	Utilitatea	Caracteristicile
Laminar vertical cu UV și Hepa filtre.	Locul steril unde se va efectua manipulațiile cu materialul biologic. Locul de lucru are filtre de protecție speciale, iar suprafețele pot fi prelucrate cu UV, ceea ce diminuează șansa de contaminare a probele cu material străin și la apariția rezultatelor eronate	-Suprafață de lucru monolitică din oțel inoxidabil; -suport pentru laminar; -UV lămpi încorporate; -Hepa filtre; -prezența pre-filtrelor; -sistem de control cu afișaj digital pentru viteza fluxului de aer; -recircularea aerului filtrat; -2 sau mai multe prize electrice
Agitator termic pentru eprubete 1.5-2.0 ml și PCR placi.	În cadrul izolării ADN-ului, este necesar de a încălzi probele pentru a liza membranele celulare și pentru a elibera ADN din celululă. Versabilitatea acestui aparat crește dacă are încorporat și un agitator ceea ce mărește eficiența reacției.	- Diapazonul temperaturii disponibil +25°C- +99°C; - stabilitatea temperaturii în intervalul ±0.1°C; - viteza medie de încălzire 4°C/min sau mai mare; - prezența pre-filtrelor; -setarea timpului de lucru; -temperatura, viteza de amestecare și timpul de funcționare controlată de microprocesor; - diapazonul de viteze a agitatorului 250- 1400 rpm; - stativ pentru eprubete 1.5-2.0 ml și PCR placi
Vortex cu centrifugă pentru eprubete	Un echipament absolut indispensabil în orice laborator fiind utilizat la omogenizarea soluțiilor și mai apoi la eliminarea picăturilor de pe capac prin intermediul centrifugării.	-prezența capacului de protecție; -moduri de funcționare continuă și impulsive; -pentru eprubete 0.2ml, 0.5ml, 1.5ml, 2.0ml
Centrifugă cu răcire (14000RPM) pentru eprubete 1.5-2.0 ml	O etapă importantă în izolarea acizilor nucleici o reprezintă centrifugarea la viteze înalte a ADN/ARN precipitat de alcool. Aceasta centrifuga va fi utilă în procesul de extracție a acizilor nucleici din drojdiile Pichia pastoris, iar prezența sistemului de răcire va permite de izolat chiar și ARN total al celulelor.	-Rotor pentru 24 de eprubete de 1.5 / 2.0 ml; -viteza maximală de 14000RPM sau mai mare; -diapazonul de temperaturii de centrifugare de la -10 până la +40 °C.
Aspirator pentru soluții lichide	În urma centrifugării, de obicei, apar două sau mai multe faze. În cazul când noi avem nevoie numai de precipitat atunci noi vom folosi aspiratorul pentru soluții lichide care ne va ajuta să eliminăm supernatantul fără a risca să pierdem precipitatul necesar.	-Vacuum -500 mbar; -rezervor de 1 L; -filtru hidrofobic încorporat; -utilizează vârfuri de 200μl de unică folosință
Centrifugă pentru eprubete 15 ml	Această centrifugă va fi utilizată pentru selectarea celulelor de Pichia pastoris din mediul de cultură, care după centrifugare pot fi găsite la fundul eprubetei.	-Rotor pentru eprubete de 15 ml; -viteza maximală de 6000RPM sau mai mare
Cântar de laborator	Aparat necesar pentru prepararea diferitor soluții exacte necesare în procesul de	- Capacitate maximă 2100g sau mai mare; - scară de citire a greutății de

	extracție a acizilor nucleici	0.01g
Agitator magnetic	Este necesar pentru a agita soluțiile preparate pentru a facilita dizolvarea reagenților.	-Viteza de agitare de 3000 rpm sau mai mare; -volum maxim de agitare de 20L sau mai mare; - placă de lucru din oțel inoxidabil; - dimensiunile plăcii de lucru o 160mm
Congelator de laborator, orizontal, -60-80 °C, cu accesorii pentru stocarea probelor (rafturi, boxe, etc.)-	Problele de ADN și în deosebi de ARN obținute în urma studiului vor fi stocate la temperaturi joase de -80 °C.	-Volumul congelatorului 200L sau mai mare; -diapazonul temperaturii disponibil -70...-80°C; -congelator orizontal; -alarmă de întrerupere a alimentării; -alarmă de temperatură ridicată /scăzută; -zgomot 55dB sau mai jos
Congelator biomedical, -30°C - 40°C,	Acest congelator este predestinat pentru stocarea reactivilor, cât și a celulelor de Pichia pastoris care urmează a fi analizate.	-Volumul congelatorului 400l. sau mai mare; -diapazonul temperaturii disponibil -30...-40°C; -congelator orizontal; -alarmă de întrerupere a alimentării; -alarmă de temperatură ridicată /scăzută.
Pipetă manuală cu un singur canal cu diapazonul de volum 2-20 μl 20-200 μl 100-1000 μl 500-5000 μl	Pentru manipulările cu soluții lichide și pentru lucru de laborator în general sunt necesare un set de pipete de diferite volume.	-Prezența certificatului CE; -un singur canal; -prezența ejectorului de vârfuri; -diapazonul de volum 2-20 μl / 20-200 μl / 100-1000 μl / 500-5000 μl; -treapta de modificare a volumului de 0.5 μl / 1.0 μl / 5.0 μl / 50 μl
Frigider cu congelator încorporat	Stocarea reactivelor și probelor biologice pentru o scurtă durată de timp	- Dotare obligatorie cu congelator încorporat; -diapazonul de temperaturi a frigiderului - +4... +8°C; -temperatura congelatorului -20°C; -volumul total cel puțin 340L; -sitem NoFrost în congelator și frigider
Imprimantă pentru etichete cu barcoduri	Etichetarea bioprobelor cu barcoduri și coduri	-Termoimprimarea de etichete cu barcoduri pe suport cu lipici pentru marcarea eprubetelor; - rezoluția minimală - 203DPI; - conexiune la calculator; -posibilitate de imprimare barcoduri 1D și 2D

<p>Incubator de laborator</p>	<p>Incubarea probelor la temperaturi anumite necesare pentru izolarea ADN</p>	<p>-Capacitatea 30L; - diapazonul de temperatura: 5...70°C; - termoizolare satisfăcătoare; - posibilitate de programare;- indicator de alarmă; - cel puțin 2 rafturi reglabile verticale; - precizia controlului temperaturii: +/- 0.3°C la 37°C și +/- 0.4°C la 70°C; - convecție naturală; -uși duble (permițând vizualizarea mostrelor printr-o ușă din acril); -protecție la supraîncălzire; - perete dublu</p>
<p>Congelator de laborator, orizontal, -60-80 °C, cu accesorii pentru stocarea probelor (rafturi, boxe, etc.)-</p>	<p>Problele de ADN și în deosebi de ARN obținute în urma studiului vor fi stocate la temperaturi joase de -80 °C.</p>	<p>-Volumul congelatorului 200L sau mai mare; -dimensiuni maxime admise: 2010 x 1265 x 1070 mm; - lățimea sau înălțimea congelatorului nu trebuie să depășească 900 mm; -diapazonul temperaturii disponibil pentru lucru -70...-80°C; -diapazonul temperaturii minim/maxim -60...-86°C;-congelator orizontal; -alarmă de întrerupere a alimentării; -alarmă de temperatură ridicată /scăzută; - zgomot 60dB sau mai jos</p>

Pentru desfășurarea proiectului a fost selectat și se află în proces de achiziționare de către co-finanțatorul proiectului bioreactorul de creștere a biomasei Biorus BLBio-30SJDA, în baza considerentelor: preț avantajos, raport satisfăcător calitate/cost și durata satisfăcătoare de livrare a bioreactorului. Fermentatorul de creștere a biomasei de *P.pastoris* întrunește următoarele criterii:

1. Este prevăzut pentru cultivarea microorganismelor și culturilor celulare
2. Vasele de cultură au volumele de lucru minim 10 l și maxim 30 l
3. Există posibilitatea de a opera și de a ajusta parametrii operaționali la distanță
4. Prezența unei valve în partea inferioară, ce permite preluarea probelor zilnice, cu funcție adițională de sterilizare a părții ei exterioare
5. Prezența cămășii termoreglatoare și bioreactor aerob
6. Mecanism de agitare a mediului: cu amestecare mecanică
7. Software este prevăzut cu funcția de auto-sterilizare
8. Prezența a doua porturi predestinate pentru senzorii de pH și O₂
9. Vasul este confecționat din oțel inoxidabil

Pentru necesitățile proiectului au fost selectate reactive și reagenți maxim apropiați celor produse de Sigma Aldrich în materie de calitate și înalte standarde conforme pentru producerea produselor biologice. Din cauza incapacității de a alege un anumit producător, ci doar a parametrilor necesari au fost elaborate specificațiile tehnice depline solicitate, precum și standardele de referință pentru reactive și reagenți în documentele de achiziții.

4. Descrierea succintă a activităților de diseminare a rezultatelor obținute

1. În baza studiului literaturii de specialitate și datelor științifice obținute în urma activităților de cercetare efectuate în cadrul proiectului a fost pregătit și prezentat raportul "Perspectives of biosimilars research and manufacturing in Republic of Moldova" în cadrul conferinței științifico-practice cu participare internațională "Perspective în cercetarea produselor farmaceutice de origine sintetică și naturală" din 14.05.2021, raportor V.Grigoriev, coautori V.Valica, R.Cazacu, V. Cazacu, L.Rusnac.
2. În baza raportului la conferința cu participare internațională a fost scris articolul "Perspectives of rhGH biosimilar research and manufacturing in Republic of Moldova", V.Grigoriev, V.Valica, R.Cazacu, V. Cazacu, L.Rusnac, publicat în Revista Farmaceutică a Moldovei, vol-45, Nr. 1, iulie 2021.
3. A fost publicată teza "Dezvoltarea hormonului de creștere biosimilar". în cadrul Conferinței științifice anuale "Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță", autori R.Cazacu, L.Rusnac, V.Valica, C. Scutari, 20-22 octombrie 2021. Chișinău: Medicina, 2021, p. 434.
4. A fost scris articolul "Dezvoltarea biosimilarelor și hormonului de creștere biosimilar", autori C.Scutari, L.Rusnac, V.Valica, M.Todiraș, R. Cazacu. Se găsește în proces de publicare în Revista Sănătate publică, Economie și Management în Medicină, 2022, Chișinău, R. Moldova. ISSN 1729-8687.

5. Descrierea colaborării între organizația executor și organizația partener/alte organizații în cadrul proiectului și a perspectivelor de extindere în viitor (specificul și continuitatea colaborării)

Cercetările din cadrul proiectului au fost realizate în colaborare cu instituții și întreprinderi din țară:

- Catedrele de profil ale USMF "N.Testemițanu", IMSP Institutul Mamei și Copilului, Întreprinderea farmaceutică industrială Balkan Pharmaceuticals SRL, și de peste hotare:
- ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) - Centrul internațional pentru inginerie genetică și biotehnologie, Organizația Națiunilor Unite.

Derularea acestui proiect de cercetare - dezvoltare complex a contribuit la dezvoltarea cercetării fundamentale pentru dobândirea de cunoștințe avansate, pentru asigurarea rezervorului de metode, tehnici aplicative, proceduri, modele și teorii, pentru creșterea valorii și vizibilității științifice pe plan internațional.

Cu ajutorul experienței și expertizei împărtășite de ICGEB vor fi rezolvate probleme majore precum dezvoltarea și fabricația produsului biosimilar hormonul de creștere, asigurarea și optimizarea calității produsului biologic, obținerea și caracterizarea substratelor celulare utilizate pentru producția produsului biologic, etc.

Stagierea angajaților Balkan Pharmaceuticals și cercetătorilor din cadrul USMF "N.Testemițanu" în cadrul laboratoarelor specializate de cercetare ale ICGEB a permis dobândirea unui know-how intern, stabilirea unei noi direcții în dezvoltarea competențelor specialiștilor autohtoni, prevenirea erorilor grosolane în inițierea activităților, realizarea și minimizarea riscurilor, însușirea practică a noi echipamente și proprietăților reactivelor, familiarizarea cu cele mai noi tehnici și metode biotehnologice, fundamentarea și extinderea unor relații constructive a cercetătorilor autohtoni cu comunitatea științifică internațională, stabilirea vectorului de dezvoltare a activităților odată cu

înțisarea proiectului.

Implicarea catedrelor de profil ale USMF "N.Testemițanu" asigură o platformă solidă de cercetare și diseminare a rezultatelor obținute, standardizare și cuantificare a datelor, eficientizare a metodelor implimentate, dezvoltare a programului didactic dedicat biotehnologiilor.

Finalizarea proiectului nu presupune sistarea acestor colaborări, ci odată cu obținerea produsului finit implicarea organizațiilor precum IMSP Institutul Mamei și Copilului ș.a. în etapa de cercetări clinice.

6. Descrierea activităților de comercializare și/sau utilizare a rezultatelor obținute în cadrul proiectului la moment și perspectivele în viitorul apropiat (date cu privire la beneficiari de rezultate, volumul de produse/servicii/ comercializate/utilizate, efect economic obținut, obiecte de proprietate intelectuală comercializate/implementate, alte beneficii cuantificabile).

Partea narativă:

Realizările principale care constituie obiecte de proprietate intelectuală implimentate în cadrul proiectului sunt crearea WCB, prepararea inocului și creșterea culturii de *Pichia pastoris* în paharul Erlenmeyer. Rezultatele au fost documentate în Procedura Standart de Operare pentru crearea Băncii celulelor de lucru, Regulamentul Tehnologic al procesului de stocare de scurtă durată și pe termen lung al celulelor. Procedura Standart de Operare pentru determinarea activității biologice a hormonului de creștere recombinat uman prin biotestare *in-vitro*, precum și Regulamentul Tehnologic al procesului de pregătire, inoculare și creștere a culturii de *Pichia pastoris* în paharul Erlenmeyer. În cadrul proiectului au fost elaborate diverse algoritme, protocoale, regulamente necesare desfășurării activităților preconizate. Elaborarea a început cu studiul literaturii de specialitate, comunicare cu partenerii ICGEB pentru a stabili lista de echipamente și materiale, reactive și medii, studiul pieții pentru a identifica echipamente și materiale, reactive și medii de la diverși producători, a le compara după parametri și corespundere activităților preconizate, precum și raportul pret/calitate. A urmat sistematizarea informației obținute, organizarea ședințelor de consiliere cu implicare consultanților proiectului și experților externi care s-au soldat cu ședința operațională pentru a lua decizia asupra listei finale, drept consecință listei de echipamente și materiale, reactive și medii indispensabile derulării activităților planificate. În cadrul colaborării între USMF "N.Testemițanu", întreprinderea farmaceutică Balkan Pharmaceuticals și ICGEB au fost efectuate lucrări de transfer tehnologic a primelor etape de creștere a biomasei de *Pichia pastoris*. În cadrul ICGEB a fost obținut prin fermentare un număr de proteine recombinat farmaceutic active printre care și hormonul de creștere uman. Conform Regulelor de Buna practică în Producere (GMP – Good Manufacturing Practice) transferul tehnologic în procesul de extrapolare (scale-up) de la faza de laborator la faza pilot permite trecerea ușoară și fără grijă a unui produs creat de serviciul de cercetare la faza de microproducție în cadrul întreprinderii producătoare de medicamente și ulterior la faza de producere a seriilor comerciale. În procesul transferului tehnologic în cadrul scale-up de la faza de laborator la faza pilot al creării băncii celulelor de lucru și procesului de inoculare și creștere a tulpinii de *Pichia pastoris* în paharul Erlenmeyer au fost elaborate Regulamente Tehnologice și Proceduri Standarte de Operare a proceselor vizate, care urmează să fie implementate în procesul de producere al hormonul de creștere biosimilar uman recombinat în cadrul întreprinderii producătoare

SC Balkan Pharmaceuticals SRL. În Moldova nu există un precedent în producția de biosimilare. Dimensiunea pieței globale a rhGH este estimată la 2.840,70 milioane USD în 2018 și se așteaptă să ajungă la 5.563,60 milioane USD până în 2026, înregistrând o rată anuală compusă de creștere (CAGR) de 8,6% din 2019 până în 2026. În Moldova anual se desfășoară licitația publică centralizată cu obiectul achiziționării medicamentelor pentru tratarea pacienților cu insuficiența hipofizară/nanism hipofizar. Pentru perioada bugetară 2021 în scopul realizării Programului Național «Combaterea maladiilor rare» autoritatea contractantă Centrul pentru achiziții publice centralizate în sănătate a lansat invitația de prezentare a ofertelor pentru Somatropinum 1.33 mg sau 3.33 mg sau 8 mg sau 10 mg în cantitate de 21827.00 bucăți de către operatorii economici interesați. Acesta trebuie să corespundă specificării tehnice depline solicitate: forma farmaceutică – pulbere și solvent pentru soluție injectabilă/soluție injectabilă, modul de administrare – subcutanat. unitatea de măsură – milligram. Volumul estimativ al producției bazat pe inovație care va fi comercializat pe piața internă va fi calculat reieșind, în primul rând, din cantitatea solicitată în licitația publică pentru a acoperi toate cerințele sau așa numitul “consumul intern” al țării, atingând 100% în materie de coeficient de autoaprovizionare. Volumul estimativ al producției bazat pe inovație care va fi comercializat pe piața externă se va axa pe cererea piețelor CSI și UE la momentul respectiv. Raportând cantitatea de Somatropină solicitată actualmente de 21827,00 bucăți la numărul de locuitori din Republica Moldova obținem un coeficient de 0,006. Extrapolând, de exemplu, la numărul de locuitori al Ucrainei (41,98 milioane), obținem o cantitate de 251.880 bucăți, pentru Federația Rusă (144,5 milioane) această cifră ar fi de 867.000. Cifrele obținute poartă un caracter pur estimativ și teoretic, necesitând ajustări considerabile. Scopul este elucidarea faptului că cantitățile destinate exportului nu vor coborâ pragul de 1 milion de bucăți.

Indicatori măsurabili:

<i>Indicatori de monitorizare</i>	<i>Cantitatea și unitatea de măsură (a se introduce cantitatea)</i>
Volumul producției inovatoare comercializate sau a serviciilor inovatoare prestate	<i>cca. 21827 unități (în R. Moldova) cca. 300000000 lei</i>
Efectul economic în urma implementării tehnologiei inovatoare	<i>cca. 1358300000 lei</i>
Numărul locurilor de muncă nou create	<i>cca. 25 locuri în cadrul întreprinderii</i>
Volumul investițiilor atrase suplimentar pentru dezvoltarea proiectului	<i>cca. 7000000 lei</i>
Volumul exporturilor din volumul vânzărilor producției inovatoare	<i>cca. 77000 unități (în Ucraina, Rusia) cca. 1058300000 lei</i>
<i>... (a se introduce alți indicatori după caz)</i>	<i>....</i>

7. Dificultățile în realizarea proiectului

În procesul de realizare al proiectului au fost întâlnite următoarele dificultăți: financiare – semnarea retardată a Contractului de finanțare a proiectului de cercetare și respectiv inițierea finanțării târzii a proiectului, salarizarea joasă a echipei proiectului (este admis doar salariul de bază, fără sporuri); organizaționale – procesul anevoios de achiziționare a utilajului, reagenților, reactivelor și consumabilelor pentru proiect, ca rezultat riscul înalt de a nu reuși finalizarea proiectului în termenii propuși.

8. Concluzii

În cadrul colaborării între USMF "N.Testemițanu", întreprinderea farmaceutică Balkan Pharmaceuticals și ICGEB a fost efectuat transferul tehnologic la etapa extrapolării de la faza de laborator la faza pilot a proceselor creării băncii celulelor de lucru și creșterii tulpinilor de *Pichia pastoris* în paharul Erlenmeyer. Pentru obținerea hormonului de creștere recombinat în calitate de sistem de expresie a fost selectat *Pichia pastoris*, care posedă numeroase avantaje comparativ cu alte organisme, inclusiv folding-ul proteinelor, modificările posttranzlaționale ale proteinelor și manipularea ușoară. Gena modificată GHI a somatropinei umane recombinante a fost introdusă în genomul culturii de *Pichia pastoris* cu ajutorul restrictazelor în apropierea promotorului genei AOX1, în calitate de vector servind plasmidul pPIC9K. Gena GHI a fost activată de promotorul genei AOX1 care poate fi indus cu ușurință de prezența metanolului în mediul de cultură. Ulterior, la secvența modificată s-a adăugat secvența "Prepro-alpha Factor Leader" de la *Saccharomyces cerevisiae* pentru ca somatropina obținută să fie secretată în mediul de cultură. În cadrul proiectului "Procedeu de cultivare a materiei prime pe bază de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere" au fost examinate influența procedeele tehnologice alese asupra unor parametri ale produsului obținut, au fost elaborate Regulamente Tehnologice pentru procesele de stocare pe durată scurtă și pe termen lung al celulelor de *Pichia pastoris* și pentru procesul de preparare a inoculului, inoculare și creștere a tulpinilor de *P. pastoris* cu hormonul de creștere uman recombinat în paharul Erlenmeyer. Au fost elaborate Proceduri Standarte de Operare ale proceselor de creare a băncii celulelor de lucru, determinării activității biologice *in-vitro* a preparatului hormonul de creștere uman recombinat, cu implementarea ulterioară în procesul de producere a biosimilarului rhGH la întreprinderea SC Balkan Pharmaceuticals SRL.

In collaboration of SUMPh "N.Testemițanu", the pharmaceutical company Balkan Pharmaceuticals and ICGEB the technology transfer during scale-up from the laboratory phase to the pilot phase of the processes of creating the working cell bank and growing *Pichia pastoris* strains in the Erlenmeyer flask were carried out. *Pichia pastoris* was selected for recombinant growth hormone as an expression system, which has many advantages over other organisms, including protein folding, post-translational changes in protein, and easy handling. The GHI altered recombinant human somatropin gene was introduced into the genome of *Pichia pastoris* culture using restriction near the AOX1 gene promoter as a vector serving the pPIC9K plasmid. The GHI gene was activated by the AOX1 gene promoter which can be easily induced by the presence of methanol in the culture medium. Subsequently, the "Prepro-alpha Factor Leader"

sequence from *Saccharomyces cerevisiae* was added to the modified sequence so that the obtained somatropin could be secreted into the culture medium. In the project "Cultivation process of raw material based on *Pichia pastoris* with the expression of growth hormone" the influence of the chosen technological processes on some parameters of the obtained product were examined. Technological Regulations were developed for short and long term storage processes of *Pichia pastoris* cells and for the process of inoculum preparation, inoculation and growth of *P. pastoris* strains with recombinant human growth hormone in the Erlenmeyer flask. Standard Operating Procedures were developed for the processes of creating the working cell bank, determining the *in-vitro* biological activity of the recombinant human growth hormone preparation, with subsequent implementation in the process of producing rhGH biosimilar at CS Balkan Pharmaceuticals Ltd.

Executarea devizului de cheltuieli, conform anexei nr. 2.3 din contractul de finanțare
Cifrul proiectului: 21.80015.8007.244T

Denumirea	Cheltuieli, mii lei					
	Cod		Anul de gestiune			
	Eco (k6)	Aprobat	Modificat +/-	Precizat	Executat	Sold
Remunerarea muncii temporare	211200	219,5	-	-	219,5	-
Contribuții de asigurări sociale de stat obligatorii	212100	52,7	-	-	52,7	-
Procurarea mașinilor și utilajelor	314110	2173,2	-	-	2173,2	-
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri	335110	174,6	-	-	174,6	-
Total		2620,0			2620,0	



Conducătorul organizației E. Ceban / Emil CEBAN

Economist șef S. Lupasco / Svetlana LUPASCO

Conducătorul de proiect L. Rusnac / Liliana RUSNAC

Data: 29 decembrie 2021

Componența echipei proiectului

Cifrul proiectului 21.80015.8007.244T

Echipa proiectului conform contractului de finanțare (la semnarea contractului)						
Nr	Nume, prenume (conform contractului de finanțare)	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării	Data eliberării
1.	Rusnac Liliana	1970	d.ș.	0.5	04.01.2021	31.12.2021
2.	Scutari Corina	1973	d.ș.	0.5	04.01.2021	31.12.2021
3.	Cazacu Radu	1995	f.g.	0.5	04.01.2021	31.12.2021
4.	Organ Adina	1996	f.g.	0.5	04.01.2021	31.12.2021
5.	Grigoriev Valeria	1994	f.g.	0.5	04.01.2021	31.12.2021
6.	Boiciuc Chiril	1990	f.g.	0.5	04.01.2021	31.12.2021
7.	Cazacu Vasile	1973	d.ș.	-	04.01.2021	31.12.2021
8.	Beșliu Alexandrina	1989	f.g.	-	04.01.2021	31.12.2021
9.	Gligor Olga	1997	f.g.	-	04.01.2021	31.12.2021
10.	Valica Vladimir	1956	d.h.ș.	-	04.01.2021	31.12.2021
11.	Todiraș Mihai	1964	d.h.ș.	-	04.01.2021	31.12.2021

Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor conform contractului de finanțare **67%**

Modificări în componența echipei pe parcursul anului 2021					
Nr	Nume, prenume	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					

Ponderea tinerilor (%) din numărul total al executorilor la data raportării



Conducătorul organizației E. Ceban / Emil CEBAN

UȘ
Economist șef S. Lupășco / Svetlana LUPAȘCO

Conducătorul de proiect L. Rusnac / Liliana RUSNAC

Data: 29 decembrie 2021



EXTRAS DIN DECIZIE

25.01.2022

nr. 1/7

┌ Cu privire la aprobarea rapoartelor științifice finale ale ┐
proiectelor din cadrul implementării proiectelor de
transfer tehnologic, în anul 2021

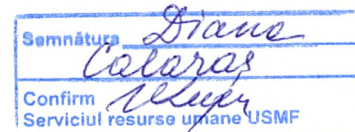
În conformitate cu Hotărârea Guvernului Nr. 382 din 1 august 2019 *Cu privire la aprobarea Metodologiei de finanțare a proiectelor din domeniile cercetării și inovării*, precum și în rezultatul audierii publice a rapoartelor științifice finale ale proiectelor din cadrul implementării proiectelor de transfer tehnologic în anul 2021, Consiliul științific

A DECIS:

1. A lua act de informația prezentată.
2. A aproba raportul științific final al proiectului „*Procedeu de cultivare a materiei prime pe baza de Pichia pastoris cu expresia hormonului de creștere*”, cifrul 21.80015.8007.244T, conducător de proiect Rusnac Liliana, dr. șt. farm., conf. cercetător, din cadrul implementării proiectelor de transfer tehnologic în anul 2021.
3. A prezenta raportul științific final ale proiectului din cadrul implementării proiectelor de transfer tehnologic în anul 2021 Agenției Naționale pentru Cercetare și Dezvoltare.
4. Responsabilitatea pentru realizarea prezentei decizii se atribuie dnei Daniela Galea-Abdușa, șef secție, Secția de planificare, evidență și raportare în cercetare, Departamentul Cercetare a INCMS.
5. Controlul pentru realizarea prezentei decizii se atribuie dnei Elena Raevschi, șef departament, Departamentul de Cercetare.

Secretar științific,
dr. șt. med., conf.univ.

Diana Calaraș



AVIZUL

Comisiei mixte a Academiei de Științe a Moldovei și Agenției Naționale pentru Cercetare și Dezvoltare

de audiere publică repetată a rapoartelor finale privind implementarea proiectelor de inovare și transfer tehnologic finalizate în 2021, create prin Hotărârea Prezidiului nr. 14 din 15.02.2022, asupra raportului final de inovare și transfer tehnologic 21.80015.8007.244t „Procedeu de cultivare a materiei prime pe baza de *Pichia Pastoris* cu expresia hormonului de creștere”, director de proiect: dr. RUSNAC Liliana, USMF „Nicolae Testemițanu”.

Comisia de audiere a rapoartelor finale privind implementarea proiectelor de inovare și transfer a fost formată în temeiul art. 61 lit. h) din Codul cu privire la știință și inovare al Republicii Moldova nr. 259 din 15.07.2004 (republicat), subpunctul 20 al punctului 7 din Statutul Academiei de Științe a Moldovei, aprobat prin Hotărârea Adunării Generale nr. I/2 din 24 ianuarie 2019 și al punctului 13 al Instrucțiunii privind raportarea finală a implementării proiectelor din domeniile cercetării și inovării, aprobat de ANCD prin Ordinul nr. 105 din 7 decembrie 2020 și în baza Fișei de evaluare, elaborate și aprobate de ANCD.

Ca urmare a audierilor publice repetate privind implementarea proiectelor de inovare și transfer tehnologic, desfășurate în data de 1 martie 2022 în format online (disponibil la link-ul <https://www.youtube.com/watch?v=GxSEafSDHFE>, experții și-au expus opiniile.

Avizul Comisiei este perfectat în baza avizelor experților în domeniul tehnologic, științific și economic.

Pe domeniul științifico-tehnologic:

1. Atingerea scopului, obiectivelor și rezultatelor declarate în propunerea de proiect în corelare cu cele obținute după implementarea proiectului

Scopul de bază al proiectului a fost atins integral. A fost creată banca celulelor de lucru (WCB - working cell bank) a culturii de *Pichia pastoris* pentru stocare de durată scurtă și lungă, ulterior a fost preparat inocul (inoculum) pentru creșterea culturii de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere uman.

2. Funcționalitatea tehnologiei/serviciului/produsului obținut în cadrul proiectului

Funcționalitatea tehnologiei a fost confirmată prin elaborarea Procedurii Standard de Operare „Crearea băncii celulelor de lucru”; Regulamentului Tehnologic al procesului de stocare pe termen scurt a tulpinilor de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere uman recombinat; Procedurii Standard de Operare BIOASSAY – activitatea biologică a preparatului hormonul de creștere uman recombinat; Regulamentului Tehnologic al procesului de preparare a inocului. În cadrul întreprinderii Balkan Pharm au fost elaborate și aprobate trei Regulamente Tehnologice și două Proceduri Standarde de Operare.

3. Infrastructura disponibilă pentru continuarea proiectului și funcționalitatea acesteia

Întreprinderea Balkan Pharm are capacitatea de a asigura întreținerea investiției după finalizarea proiectului datorită achizițiilor de echipament performant. Compania dispune de 2 fabrici moderne de producere a medicamentelor, fapt ce permite extinderea vânzărilor pe piața CSI și UE.

4. Diseminarea rezultatelor obținute (acțiuni de diseminare întreprinse)

Au fost întreprinse 4 acțiuni de diseminare a rezultatelor obținute în cadrul a 2 conferințe; publicate 2 articole și 1 teză.

5. Colaborarea între organizația executivă și organizația partener/alte organizații (specificul și continuarea colaborării)

Colaborarea cu instituții și companii din țară și de peste hotare cum ar fi catedrele de profil ale USMF „Nicolae Testemițanu”, Institutul Mamei și Copilului, Centrul Internațional de inginerie genetică și biotehnologie a contribuit la creșterea vizibilității științifice pe plan național și internațional, stagiunea și creșterea competențelor specialiștilor autohtoni, extinderea relațiilor de colaborare cu comunitatea științifică internațională.

6. Comercializarea și/sau utilizarea rezultatelor obținute în cadrul proiectului la moment și în viitorul apropiat

Volumul estimativ al producției inovatoare în viitorul apropiat pur teoretic se așteaptă să ajungă până la 21827 unități pentru RM (cca 300 mln lei MD), efectul economic – 1358,3 mln lei MD, volumul exporturilor – cca 7700 unități (cca 1058,3 mln lei MD).

Concluzii

Scopul de bază al proiectului a fost atins integral.

Pe domeniul economic:

1. Atingerea scopului, obiectivelor și rezultatelor declarate în propunerea de proiect în corelare cu cele obținute după implementarea proiectului

Scopul proiectului a fost atins, obiectivele planificate și rezultatele obținute corespund celor planificate. A fost creată banca celulelor de lucru (WCB - working cell bank) a culturii de *Pichia pastoris* pentru stocare de durată scurtă și lungă, ulterior a fost preparat inocul (inoculum) pentru creșterea culturii de *Pichia pastoris* cu expresia hormonului de creștere uman.

2. Funcționalitatea tehnologiei/serviciului/produsului obținut în cadrul proiectului

În cadrul colaborării între USMF „N. Testemițanu”, întreprinderea farmaceutică Balkan Pharmaceuticals și ICGEB (Centrul internațional pentru inginerie genetică și biotehnologie) au fost efectuate lucrări de transfer tehnologic a primelor etape de elaborare a biomasei de *Pichia pastoris*. Au fost elaborate Regulamente Tehnologice pentru procesele de stocare pe durată scurtă și pe termen lung al celulelor de *Pichia pastoris*, Proceduri Standarte de Operare a proceselor de creare a băncii celulelor de lucru, determinării activității biologice a preparatului hormonul de creștere uman recombinat în cadrul întreprinderii producătoare SC Balkan Pharmaceuticals SRL.

3. Infrastructura disponibilă pentru continuarea proiectului și funcționalitatea acesteia

Proiectul va avea continuitate și va fi susținut financiar de către întreprinderea Balkan Pharmaceuticals care are capacitatea de a asigura operarea și întreținerea investiției pe direcția respectivă. La moment, compania Balkan Pharmaceuticals dispune de două fabrici de producere a medicamentelor.

4. Diseminarea rezultatelor obținute (acțiuni de diseminare întreprinse)

Rezultatele au fost diseminate prin raportarea la 2 conferințe științifico-practice cu participare internațională; prin publicarea a 2 articole și a 1 teze.

5. Colaborarea între organizația executor și organizația partener/alte organizații (specificul și continuarea colaborării)

Cercetările din cadrul proiectului au fost realizate în colaborare cu catedrele de profil ale USMF „N. Testemițanu”, IMSP Institutul Mamei și Copilului, întreprinderea farmaceutică industrială Balkan Pharmaceuticals SRL, și instituții de peste hotare: ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) – Centrul internațional pentru inginerie genetică și biotehnologie, Organizația Națiunilor Unite.

6. Comercializarea și/sau utilizarea rezultatelor obținute în cadrul proiectului la moment și în viitorul apropiat

Volumul estimativ al producției bazat pe inovație care va fi comercializat pe piața internă și externă se va axa pe cererea piețelor la momentul respectiv. Estimativ necesarul este de 21827,00 bucăți în Republica Moldova, pentru Ucraina – o cantitate de 251.880 bucăți, pentru Federația Rusă – 867.000. Efectul economic estimat în urma implementării tehnologiei inovaționale constituie cca. 1,36 mld lei.

Concluzii

Scopul și obiectivele planificate au fost atinse integral.

Proiectul este apreciat cu calificativul **Excelent, punctaj final 29,18 puncte.**

Președintele Comisiei



dr. hab. Liliana Condricova

Secretarul Comisiei



dr. Leonid Chișlaru