

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

Декан факультету

(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

(підпис) Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична
біотехнологія»

на тему: «Технологічні аспекти виробництва імунобіологічних препаратів на
основі бактеріофагів»

Виконав: здобувач(-ка) II курсу, групи I

КОВАЛЬ Руслан Васильович
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я, як здобувач(-ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач(-ка) _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ ” 202__ року ”

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КОВАЛЯ Руслана Васильовича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Технологічні аспекти виробництва імунобіологічних препаратів на основі бактеріофагів»

керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, д.т.н., професор,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 07.10. 2024 року № 875-КС

2. Строк подання здобувачем роботи _____

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент *Escherichia coli*, бактеріофаг Т4, фаготерапія, лікарський засіб на основі бактеріофагів

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

РОЗДІЛ 1. Практичне застосування бактеріофагів. Фаготерапія. РОЗДІЛ 2.

Біотехнологія одержання препаратів на основі бактеріофагів. РОЗДІЛ 3.

Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу. РОЗДІЛ

4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Підбір

технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.

РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання. РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми.

РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема виробництва-2 аркуші

формату А3 та Апаратурна схема виробництва-1 аркуш формату А3.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 08.10.2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання роботи	Примітка
1	Розділ 1.Огляд літератури. Практичне застосування бактеріофагів. Фаготерапія	01.10.24 р.- 10.10.24 р	
2	Розділ 2. Огляд літератури. Біотехнологія одержання препаратів на основі бактеріофагів	11.10.24 р.- 14.10.24 р	
3	Розділ 3.Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	15.10.24 р.- 18.10.24 р	
4	Розділ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми	19.10.24 р.- 20.10.24 р	
5	Розділ 5.Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях.	21.10.24 р.- 24.10.24 р	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання	25.10.24 р.- 29.10.24 р	
7	Розділ 7.Опис технологічної схеми	30.10.24 р.- 04.11.24 р	
8	Розділ 8. Контроль виробництва (Опис концентрату для лікарського засобу згідно МКЯ)	05.11.24 р.- 08.11.24 р	
9	Розділ 9. Контроль виробництва (Опис лікарського засобу згідно МКЯ)	09.11.24 р.- 11.11.24 р	
10	Оформлення апаратурних та технологічних схем	12.11.24 р.- 19.11.24 р	
11	Оформлення вступу та реферату	20.11.24 р.- 22.11.24 р	

Здобувач _____
(підпис)

Руслан КОВАЛЬ
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячено розробці одержання бактеріофагів Т4 кишкової палички *Escherichia coli* для одержання їх препарату у флаконах.

Технологічна схема виробництва складається з допоміжних робіт (Підготовка сировини та пакувальних матеріалів, приготування розчинів для коригування рН) з технологічного процесу (виділення, ультрафільтрація, внесення хіноліну сульфату, зберігання концентрату бактеріофагів, приготування розчину допоміжних речовин та розчину бактеріофагів, стерилізуюча фільтрація, наповнення та закупорювання флаконів, стадії інспектування на наявність видимих механічних включень) та стадії пакування, маркування, відвантаження (маркування флаконів, упаковка флаконів у коробки, складання коробок з ЛЗ у гофрокороб та відвантаження). У проекті було проведено техніко-економічний розрахунок потреби у препараті для населення Європи, а саме для пацієнтів, які хворіють на дисбактеріоз.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, дев'яти розділів, дванадцяти таблиць, двох рисунків, та графічної частини (технологічної схеми формату А3 та апаратурної схеми-формату А3), списку використаних джерел. Загальний обсяг роботи – 129 сторінок.

Ключові слова: бактеріофаги, фаги, *Escherichia coli*, Т4, фаголізат, лізат, фільтрація, флакони.

ABSTRACT

The diploma project is devoted to the development of obtaining bacteriophages T4 of the *Escherichia coli* colibacillus for obtaining their drug in vials.

The technological scheme of production consists of auxiliary works (preparation of raw materials and packaging materials, preparation of solutions for pH adjustment) from the technological process (isolation, ultrafiltration, introduction of quinoline sulfate, storage of bacteriophage concentrate, preparation of a solution of excipients and a solution of bacteriophages, sterilizing filtration, filling and capping of vials, inspection stage for the presence of visible mechanical inclusions) and the stage of packaging, labeling, shipment (labeling of vials, packaging of vials in boxes, assembling boxes with drugs in a corrugated box and shipment). The project carried out a feasibility study of the need for the drug for the population of Europe, namely for patients suffering from dysbacteriosis.

The diploma project consists of an introduction, nine chapters, twelve tables, two figures, and a graphic part (technological scheme of A3 format and equipment scheme of A3 format), a list of sources used. The total volume of the work is 129 pages.

Keywords: bacteriophages, phages, *Escherichia coli*, T4, phagolysate, lysate, filtration, vials.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ.....	2
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ.	
ФАГОТЕРАПІЯ.....	11
1.1.Сучасні аспекти використання бактеріофагів.....	11
1.2.Переваги використання бактеріофагів перед антибіотиками.....	19
1.3.Стан дослідження проблеми вітчизняними вченими.....	27
РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ПРЕПАРАТІВ НА	
ОСНОВІ БАКТЕРІОФАГІВ	32
2.1. Особливості виробництва бактеріофагів. Продукція у біореакторах.....	32
2.2. Роль умов культивування на вихід фагів.....	35
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	
ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	43
3.1.. Обґрунтування біосинтетичної здатності біологічного агента для отримання субстанції.....	43
3.2.Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання, потреби у цільовому продукті.....	48
3.3. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ, потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції, розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік	55
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ .	
59	
4.1. Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту.....	59
4.2. Вибір способу відокремлення бактеріофагів від лізату	60
4.3. Обґрунтування кінцевої форми та упаковки вибору форми випуску лікарського засобу (ЛЗ).....	66
4.4. Обґрунтування необхідних умов виробництва (класів чистоти).....	75
РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З	
ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....	79
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	87
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....	92
7.1. Опис технологічної схеми після ферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ	93

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	101
8.1. Опис концентрату для лікарського засобу згідно МКЯ.....	101
РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	106
9.1. Опис лікарського засобу згідно МКЯ.....	106
ВИСНОВКИ	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	112

ВСТУП

Багаторічне застосування антибіотиків для лікування різних захворювань призвело до виникнення множинної лікарської стійкості бактеріальних штамів до таких лікарських засобів. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) вже понад 60% збудників стійкі до основних антибіотиків, а через 10–20 років практично всі набудуть резистентність до антимікробних препаратів. Станом на сьогодні, інфекційні захворювання займають перше місце у світі за смертністю, що становить близько 18 млн осіб щорічно, тоді як причиною смерті 22 млн осіб на рік є хронічні захворювання, що зумовлені інфекційними агентами різних таксонометричних груп (Волк, Бойченко, Матвєєва, Жук, & Бойченко, 2017).

Ситуація погіршується також через те, що розробка нових антибіотиків не встигає за швидкістю розвитку антибіотикорезистентності. Так, за останні 30 років синтез нових антибактеріальних засобів навіть знизився: лише у 2000-х роках з'явилися препарати класу циклічних ліпопептидів і оксазолідинонів, але стійкі до них мутанти почали виявлятися у клініках менш ніж через рік (Жмілько, Федченко, & Зінов'єва, 2015; Henein, 2013).

Зазначена проблема є однією з найсерйозніших загроз для сучасної системи охорони здоров'я, оскільки впливає на підвищення рівня смертності (Понятовський, Ширококов, Бобир, & Харіна, 2023).

Саме тому **актуальним** на сьогодні є застосування альтернативних засобів лікування запальних захворювань мікробного генезу, які були б позбавлені побічних реакцій та мали високий протимікробний ефект. Одним з таких альтернативних методів є фаготерапія – застосування бактеріофагів для лікування інфекційних захворювань (Антушева, Калініченко, Антушева, Торянік, & Гейдеріх, 2020).

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Коваль Р.В.			Вступ	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					7	129
Консультант						Кафедра БТМ 8		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Бактеріофаги являють собою віруси, що вибірково вражають бактеріальні клітини. Згідно з сучасною класифікацією бактеріофагів за морфологічними особливостями вірусних частинок - віріонів існує 13 родин, поділених на понад 140 родів, що містять понад 5300 видів фагів. Віруси бактерій є стародавніми мешканцями планети, для яких характерною є висока поширеність: кожен грам ґрунту, кожен мілілітр води та повітря, продукти харчування, рослини, тварини містять мільйони фагових частинок, які, крім того, виявляються у великих кількостях на шкіряному покриві та слизових оболонках, в травному тракті тварин і людини, тобто усюди, де присутні відповідні бактерії (Жмілько, Федченко, & Зінов'єва, 2015).

Препарати бактеріофагів використовують в клінічній практиці наряду з антибіотиками; фагові препарати перемагають антибіотикорезистентні збудники. Бактеріофаги не викликають побічних токсичних та алергічних реакцій, а також не мають протипоказань. Крім того, вони застосовуються при лікуванні ряду захворювань вагітних жінок в поєднанні з іншими лікарськими препаратами. Використання препаратів бактеріофагів стимулює активізацію факторів специфічного та неспецифічного імунітету, тому фаготерапія особливо ефективна при лікуванні хронічних запальних захворювань. Бактеріофаги не заважають здійсненню лікувальної дії інших препаратів (антибіотиків, симбіотиків, пробіотиків) та не чутливі до їх впливу (Шеремет, Калюжная, Стрілець, & Стрельников, 2014).

Таким чином, можна зробити висновок, що питання фаготерапії є актуальним на сьогоднішній час і буде вивчатися у майбутньому, так як в умовах високої світової тенденції до формування антибіотикорезистентності в патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів саме препарати бактеріофагів можуть стати ефективними у боротьбі з інфекціями

Новизною магістерського проекту є використання бактерії *Escherichia coli* з якої одержують бактеріофаги T4 у найбільшій кількості ($1,2 \times 10^6$ БУО/мл) та виробництво препарату націленого на лізис кишкової палички *Escherichia coli*, яка є збудником кишкових інфекцій (Sochocka та ін., 2015).

Під час виготовлення лікарського засобу бактеріофагів пропонується додавати хінолін сульфат, який виступає в ролі антимікробного консерванту задля підвищення якості готового продукту.

РОЗДІЛ 1. ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ.

ФАГОТЕРАПІЯ

1.1. Сучасні аспекти використання бактеріофагів

У медицині препарати на основі бактеріофагів використовують із діагностичною метою. У 2019 році було повідомлено про перше успішне терапевтичне застосування сконструйованих фагів з посиленою бактерицидною активністю у пацієнта з дисемінованою резистентною *Mycobacterium abscessus* (Kilcher та ін., 2018). Ці науково-технічні досягнення допомагають отримувати різноманітні типи бажаних сконструйованих фагів, які є ключовими в сучасній медицині майбутнього (Dedrick та ін., 2019).

Відомий спосіб використання фагів - для лікування дисбактеріозів або проти стафілококових уражень. Існують як моно-, так і полівалентні препарати:

- Дизфаг (дизентерійний полівалентний бактеріофаг) – стерильний фільтрат фаголізату збудників бактеріальної дизентерії – *Shigella flexneri* I, II, III, IV та VI типів та *Shigella sonnei*.
- Колі-протейний бактеріофаг – фільтрат фаголізатів, активних відносно найпоширеніших ентеропатогенних ешерихій і протей.
- Бактеріофаг сальмонельозний – імунобіологічний препарат, лікувальна та санувальна дія якого заснована на лізисі сальмонел і близьких до них за антигенною структурою бактерій.
- Інтесті-бактеріофаг рідкий – імунобіологічний препарат з антимікробними властивостями, здатний специфічно лізувати бактерії.
- Бактеріофаг стафілококовий – імунобіологічний препарат, здатний лізувати стафілококи, виділені при гнійних інфекціях (Воронкова, Сірокваша, Полішко, & Вінніков, 2012).

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Практичне застосування бактеріофагів. Фаготерапія	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Коваль Р.В.						10	129
Перевір.	Стабніков В.П.					Кафедра БТМ ¹¹		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В.П.							

Було визначено, що використання фагових коктейлів, що націлені на різні бактеріальні рецептори, і комбіноване лікування фагами та антибіотиками перешкоджає розвитку резистентності до фагів (Ando, Lemire, Pires, & Lu, 2015). Крім позитивних результатів досліджень бактеріофагів, є ще дослідження, які досить цікаві у розробці та під час застосування фагів у різних галузях (рис.1.1).

Бактеріофагові частинки демонструють високий рівень організації, тому їх можна розглядати як складні наномашини. Бактеріофаги використовують для розробки нанотехнологій. Багато дослідників вивчають частинки бактеріофагів (Rios та ін., 2018) як векторів або як матриць для нових нанопристроїв із широким спектром застосувань у наномедицині (Karimi та ін., 2016). Ниткоподібні, MS2, лямбда та Т-бактеріофаги можуть бути використані як розроблені наноносії для цільової доставки як терапевтичних агентів, так і діагностичних репортерних молекул, отже представляючи новий аспект нанотехнологій у системах доставки ліків (Karimi та ін., 2016). Капсид бактеріофага складається з кількох білкових субодиниць, зібраних разом. Цей білковий каркас вже широко використовується для відображення молекул, його структуру також можна використовувати як наноклітку для вловлювання цікавих біомолекул.

Бактеріофаги зараз широко використовуються в різних сферах включаючи антивірусні дослідження, розробку нових терапевтичних засобів і вакцин, дослідження раку. Використання частинок бактеріофага для відображення екзогенних (гетерологічних) пептидів або білків має численні застосування, включаючи ідентифікацію епітопу, доставку антигенів, відкриття ліків, розробку вакцин, націлювання на еукаріотичні клітини, біовізуалізація та біосенсинг, дезактивація ферментів або розробку наноматеріалів (Henry, Debarbieux, 2012).

На даний момент для антигенів розроблено два різних підходи доставки завдяки фаговим вакцинам: «вакцини з фаговим дисплеєм» і «фагові ДНК-вакцини» (Rodríguez-Rubio та ін., 2016; Adhya та ін., 2014 рік).

Вакцини з фаговим дисплеєм спрямовані на виробництво імуногенних частинок бактеріофага. Бактеріофаг ДНК-вакцини, утворюються шляхом включення генів чужорідних антигенів геном бактеріофага під контролем сильних еукаріотичних промоторів (Adhya та ін., 2014 ; Golkar та ін., 2014; Наг та ін., 2012). У ДНК-вакцинах бактеріофагів частинка фагу діє як пасивний носій для перенесення чужорідної ДНК в клітини ссавців, де потім експресується ген антигену. Ці два підходи часто комбінують для отримання частинок бактеріофага які несуть ген чужорідного антигену та демонструють білок або пептид на їх поверхні. Таким чином, бактеріофаги можуть бути використані як носії вакцини завдяки двом різним способам, а саме:

- шляхом прямої вакцинації частинки бактеріофага, що несуть вакцинні антигени, «прикрашаючи» їх поверхні;
- за допомогою частинок бактеріофага для доставки ДНК вакцини, яка є експресійною касетою, вбудованою в бактерію геном фага (Adhya та ін., 2014; Golkar та ін., 2014 ; Наг та ін., 2012).

Доставка генів за допомоги бактеріофагів як особливий тип нанотранспортного засобу (Karimi та ін., 2016). Під час упаковки ДНК, було досліджено, що капсула бактеріофага Phi29 є ефективним для упаковки вірусної ds-ДНК, її РНК мала високу тенденцію до утворення димерів, тримерів та гексамерів.

Розробляючи цей молекулярний механізм РНК бактеріофага Phi29, (Нао та ін., 2014) було розроблено наноклітку. Завдяки, особливій анізотропна форма бактеріофага M13 (Karimi та ін., 2016) разом із довгою стержнеподібною архітектурою має властивості, подібні до рідкого кристалу. Завдяки високому співвідношенню сторін цієї частинки бактеріофага, її проникнення в клітини-мішені покращується завдяки більшій кількості взаємодій ліганд-рецепторів на відміну від бактеріофагів сферичної форми. Таким чином, частинки теріофага можна використовувати як розроблені наноносії (Karimi та ін., 2016) для цільової доставки як терапевтичні агенти, так і генетичні послідовності, представляючи собою новий інструмент

нанотехнологій у системах доставки ліків. Фагова оболонка захищає ДНК від деградації після ін'єкції.

Автор статті (Uyanga, 2015) описав два нових шляхи розробки M13 бактеріофага, що призначений для лікування раку, використовуючи унікально біологію нитчастого бактеріофага M13. Нитчасті бактеріофаги, через невелику вірусну ssДНК є меншими, та інженерно були упаковані у капсидні білки M13. Малі частинки бактеріофага зберігали основну та мінорну оболонку M13, якими раніше маніпулювали, щоб служили прив'язками для перенесення різних терапевтичних агентів, які націлені на конкретні ділянки раку.

Новітньою розробкою є отримання біоматеріалів на основі фагів для регенерації тканин (Сао та ін., 2019). Ця ідея виникла на основі того, що фаги можна використовувати як відповідні нанокаркаси, особливо ниткоподібні фаги завдяки їх унікальній морфології, схожій на нановолокна. Цей тип фагів може самостійно збиратися у впорядкований каркас, відображати кілька сигнальних пептидів і служити платформою для скринінгу нових сигнальних або самонаведених пептидів. Крім того, генеруючи фагові бібліотеки, що експресують широкий спектр пептидів, за допомогою техніки, відомої як біопанінг, вчені змогли успішно скринінгувати багато пептидів, які специфічно зв'язуються з селективними мішенями, включаючи клітини, тканини, полімери, білки та неорганічні кристали (Li та ін., 2016).

Майбутній напрямок цієї галузі включає розробку сконструйованого субстрату на основі фагів для контролю долі індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPSC), враховуючи унікальну перевагу використання iPSC у регенерації тканин, і реалізацію *in vivo* дослідження регенерації тканин за допомогою біопанінгу *in vivo* (Azam, Tan, Veerananarayanan, Kiga, & Cui, 2021).

Включення частинок бактеріофага в медичні матеріали з метою забезпечити антибактеріальну дію при контакті цього матеріалу з цільовою бактерією буде мати величезне значення в умовах охорони здоров'я. Є

дослідження, що підтверджують дієвість фагів щодо знищення біоплівки бактеріальних патогенів, таких як *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* (Song та ін., 2021; Liu та ін., 2022). Такі «біоматеріали» можуть реагувати на виниклу інфекцію завчасно до того, як клінічні ознаки стануть очевидними. Отже, просочені бактеріофагами «біоматеріали» можуть бути використані як медичні імпланти та в застосуванні мають відношення до лікарняної гігієни. Іншим прикладом можуть бути пов'язки з бактеріофагами на рани та замітники шкіри для таргетної терапії що дозволило б виробляти такі «біоматеріали», які реагують на інфекції як біологічно розкладані та біосумісні плівки та високопористі кріогелі, для лікування та відновлення пошкоджень шкіри: опіки та виразки, де високий ризик інфікування. Бактеріофаги мають високу специфічність до бактерій, що робить їх хорошими природними біорецепторами. У недавньому дослідженні автора (Tlili та ін. 2013), бактеріофаги були хімічно прив'язані до SAM-функціоналізованих золотих електродів для кількісного визначення *Escherichia coli*.



Рис. 1.1 Застосування бактеріофагів у різних галузях

У статті (Gordillo Altamirano, & Barr, 2019) повідомляється, що через наявність багатьох невідомих генів у фаговому геномі вчені вирішують проблему безпеки погано охарактеризованих фагів. Дослідники заявляють, що похідні фагів вважаються безпечнішими, ніж природні фаги. Таким чином, замість використання природних фагів, що розмножуються, досліджуються похідні фагів, такі як фаговий ендолізін, як альтернатива терапевтичним варіантам природним фагам. Ендолізін широко використовувався для терапевтичного застосування і навіть пройшов фазу I/II клінічних випробувань у деяких країнах (Gordillo Altamirano, & Barr, 2019). Однак застосування ендолізіну проти грамнегативних бактерій не є добре дослідженим явищем через наявність бактеріального зовнішнього мембранного шару, який захищає пептидоглікан клітинної стінки від доступу та пошкодження ферментом, тим самим перешкоджаючи очікуваному знищенню бактерій (Azam, Tan, Veerananarayanan, Kiga, & Cui, 2021).

Нещодавно були досліджені фагові частинки (фагеміди), що інкапсулюють генетичні елементи, відмінні від власного геному фага. Фагеміда — це тип плазміди, що містить фагову точку початку реплікації (ORI), включаючи сайти упаковки фага. Фагеміду можна запакувати в капсид фага, утворюючи неінфекційні дочірні фагові частинки, які несуть ДНК-фагеміди. Для запобігання зростаючій загрозі антимікробній резистентності бактерій (AMR), вчені вирішили розробити синтетичний фаг, який може спеціально націлюватися на такі бактерії та вбивати їх. Науковці застосовували систему CRISPR-Cas, (інструмент для редагування генів, який редагує потрібні гени за допомогою РНК CRISPR (crRNA) для керування ендонуклеазою та білком Cas для розщеплення цільової нуклеїнової кислоти). У даному дослідженні використовували CRISPR-Cas13a для розробки генно-специфічного бактерицидного агента, який має потенціал для застосування для різних цілей. Дослідження показало, що Cas13a, розпізнавши цільову РНК у клітинах-господарях, виявляє свою дію, не лише пригнічуючи ріст бактерій-господарів, але й вбиваючи їх (Kiga та ін., 2020;

Watanabe та ін., 2019). Далі у 2015 та 2017 роках були запрограмовані помірні фаги, з Cas9 або Cas3 для націлювання на *E. coli* та *S. aureus* відповідно, вони ефективно блокували передачу генів стійкості до ліків (Yosef, Manor, Kiro, & Qimron, 2015; Park, 2017). Що цікаво, у 2019 році компанія Johnson & Johnson зі Сполучених Штатів Америки інвестувала величезну суму коштів у Locus Bioscience для оцінки ефективності завантажених Cas3 фагів (Selle та ін., 2020) для лікування інфекцій дихальних шляхів та інших органів.

Цікавим напрямком є використання бактеріофагів як консервантів у харчовій промисловості. Поштовхом таким чином використовувати фаги стали спалахи патогенів *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* і *Staphylococcus aureus* після вживання людьми зеленні, салатів та грибів, які зберігалися у пакетах. Управління з контролю за якістю харчових продуктів (FDA), схвалили використання фагів після збору врожаю або перед пакуванням їх у пакети (рис. 1.1).

Зараз загальновизнано, що більшість видів бактерій живуть у спільнотах, які називаються біоплівками. Біоплівки складаються з позаклітинних полімерних матеріалів (тобто матриці), навколишніх бактеріальних клітин, і зазвичай вони безпосередньо пов'язані з серйозними проблемами зі здоров'ям, викликані бактеріальними інфекціями при таких захворюваннях, як вагіноз, кістоз, фіброз, зубний наліт і бактеріальні інфекції, які передаються через медичні інструменти. Проблемою є вільно плаваючі бактеріальні клітини, що виявляють різні фенотипи порівняно з їхніми аналогами всередині спільнот біоплівок. Бактерії, що вбудовані в біоплівки, є менш чутливими до антибіотиків і дезінфікуючих засобів, через обмежений доступ антибактеріальних речовин до бактеріальних клітин у біоплівці (Rodríguez-Rubio та ін., 2016). Оскільки бактеріальна біоплівка несе загрозу здоров'ю, використання інноваційних антимікробних засобів, отриманих з бактеріофагів, або сконструйованих частинки бактеріофагів розробляються (Harada та ін., 2018).

Також фагові препарати можна застосовувати у лікарнях для знезараження поверхонь. Є дослідження, що підтверджують дієвість фагів щодо знищення біоплівки бактеріальних патогенів, таких як *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* (Song та ін., 2021; Liu та ін., 2022) (рис. 1.1).

Здатність бактеріофагів лікувати дисбактеріоз та модулювати мікробом людини описано у багатьох наукових доробках. Відомо, що навіть незначна зміна мікробіому у людини викликає різні захворювання: ожиріння, дисбактеріоз, ентероколіти, діабет, аутоімунні захворювання, рак. Бактеріофаги можна застосовувати для контролю *Helicobacter pylori*, основного агента, що викликає виразку шлунка та шлунка, особливо тому, що поточні потрійні та чотириразові терапії антибіотиками спрямовані на його усунення, але докази захисної ролі цієї бактерії проти різноманітних таких захворювань, як астма, алергія та рак стравоходу, зростає (Zuo та ін., 2021). Іншою не менш патогенною бактерією є *Clostridium difficile*, яка зустрічається у людей похилого віку після довгого прийому антибіотиків та викликає діарею. Було виявлено, що фаги здатні знищувати *C. difficile* і для передбачення її появи приймати фагові препарати у профілактичних цілях (Hargreaves, Clokie, 2014).

Не менш поширеною хворобою, яку викликає бактерія *Cutibacterium acnes* є акне. Нещодавно було виділено декілька фагів, які здатні інфікувати *C. acnes*, що може стати новим протоколом для лікування пацієнтів з вираженою шкірною хворобою (Golembo та ін., 2022).

Бактеріофаги можна також додавати у пребіотики та пробіотики. Така добавка підсилює позитивні характеристики продукту та зменшує ризик розвитку потенційно небезпечних бактерій (Kiani та ін., 2020). Дисбактеріози ротової порожнини (пародонт, зубний наліт, карієс) які спричинені *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, також можуть лікуватися літичними фагами, що знищують ці бактерії у біоплівках (Dalmaso та ін., 2015; García-Cruz та ін., 2023).

Повідомляється про застосування бактеріофагів під час лікування хвороб Паркінсона та Альцгеймера. Особливістю цих хвороб є накопичення неправильно згорнутих білкових агрегатів які мають амілоїдну складку. Капсидний білок бактеріофага M13 має зданість взаємодіяти з цією складкою. Тобто, даний бактеріофаг використовували для зворотнього утворення бляшок, що утворюються з амілоїд них структур мозку (Krishnan та ін., 2014).

Також цікавим способом є використання бактеріофагів для боротьби з бактеріальними захворюваннями в сільському господарстві. Крім типового застосування фагів для знищення бактерій, можна застосовувати їх для боротьби з комахами-шкідниками (фаги впливають на бактерії роду *Buchnera*), які є облігатні ендосимбіонтами попелиць і беруть участь у виробленні триптофану (фактор для підтримання харчового балансу комах) (Zhang та ін., 2021) (рис. 1.1).

1.2. Переваги використання бактеріофагів перед антибіотиками

Стійкість до антибіотиків стала серйозною глобальною проблемою охорони здоров'я, оскільки зростання поширеності цього явища ставить під загрозу ефективність антимікробної терапії. Пошук нових ліків стає критичним через зростаюче занепокоєння з приводу невдалої розробки антибіотиків.

За даними Всесвітнього альянсу проти стійкості до антибіотиків (WAAR), звичайні антибіотики знаходяться на межі повної втрати своєї ефективності, здебільшого за рахунок поєднання самолікування, нераціонального призначення і надмірного вживання. Ці фактори призвели до появи мультирезистентних штамів бактерій (Rios та ін., 2016).

Бактеріофаг (або скорочено фаг) використовувався як антибактеріальний засіб більше століття, але від нього відмовилися в більшості країн після відкриття та широкого використання антибіотиків. Поява в усьому світі та висока поширеність бактерій, стійких до антимікробних препаратів (AMR), призвели до відновлення інтересу до

давно забутої антибактеріальної терапії з використанням фагів (фагова терапія) як альтернативного підходу до боротьби з бактеріями AMR. Швидкий прогрес, нещодавно досягнутий у молекулярній біології та генній інженерії, прискорив виробництво продуктів, пов'язаних із фагами, із чудовим терапевтичним потенціалом проти бактеріальної інфекції (Azam, Tan, Veerananarayanan, Kigab & Cui, 2021).

Бактерії AMR стали серйозною проблемою для охорони здоров'я в усьому світі. Ця криза разом із відсутністю нових антибіотиків відродила інтерес до фагової терапії. В епоху синтетичної біології основною відмінністю від традиційної фаготерапії є використання штучно створених фагів із покращеними терапевтичними властивостями. Сконструйований фаг може бути розроблений не тільки для антибактеріального лікування, але також для виявлення мікроорганізмів і як біоматеріал (Pizarro-Bauerle, Ando, 2020; Cao та ін., 2019). Фаги також можуть нести довголанцюгову ДНК або дисплеї білків і можуть функціонувати як ідеальна система доставки (Aghebati-Maleki, 2016; Tao, Zhu, Mahalingam, Batra, & Rao, 2019), обґрунтовуючи їхній потенціал для використання у розробці вакцин, генній терапії та придушенні вірусів.

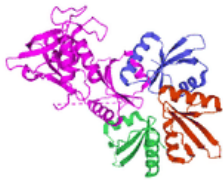
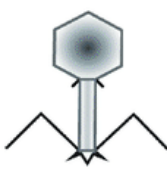
Через значний рівень резистентності до антибіотиків серед мікроорганізмів фаготерапія вірогідно незабаром стане важливим напрямом боротьби з інфекціями. Прогнозується, що протягом п'яти років виробництво бактеріофагів стане однією з лідируючих галузей фармацевтичної промисловості (Воронкова, Сірокваша, Полішко, & Вінніков, 2012).

Найважливіша властивість бактеріофагів – висока специфічність. Вони вибірково лізують бактерії не тільки певного виду, а навіть їх окремі серологічні групи. Бактеріофаги безпомилково знаходять і знищують тільки ті бактерії, проти яких спрямовано їх дію, не зачіпаючи нормальну мікрофлору організму, не кажучи вже про його власні клітини. Саме цим пояснюється відсутність побічних ефектів і протипоказань до застосування бактеріофагів, що робить особливо привабливим їх використання у

педіатричній практиці. Виникнення у бактерій стійкості до антибіотиків не впливає на їх чутливість до бактеріофагів, тому останні часто активні навіть щодо полірезистентної госпітальної мікрофлори. Слід урахувати специфічність бактеріофагів: кожен вид фага розпізнає як свою мішень тільки ті серотипи бактерій, які мають певні фагоспецифічні рецептори. Тому призначати бактеріофаги необхідно під мікробіологічним контролем чутливості до них даного збудника.

Бактеріофаги є специфічними до бактерій, що лізують, а антибіотики діють як на патогени, так і на нормальну мікрофлору пацієнтів, що спричинює вторинні інфекції. Також, бактеріофаги розмножуються саме у місці інфікування, а антибіотики «подорожують» по всьому тілу і не концентруються в місці інфікування. Не повідомлялося про побічні ефекти під час або після застосування фагів, на відмінну від антибіотиків, що спричиняють резистентність бактерій, алергію. До позитивних властивостей віднесемо, що бактеріофаги є екологічно чистими та засновані на природному відборі, ізоляції та ідентифікації бактерій у дуже швидкому процесі порівняно з розробкою нових антибіотиків, яка може тривати кілька років, може коштувати мільйони доларів на клінічні випробування, а також може бути не дуже дорогою альтернативою. Крім того, хоча бактерії можуть стати стійкими до фагів, резистентність до фагів не така тривожна, як стійкість до ліків (Golkar, Bagasra, & Pace, 2014) (табл.1.1).

**Порівняння наукових, клінічних і фармацевтичних характеристик
хімічних антибіотиків, ендолізинів і бактеріофагів при лікуванні
бактеріальних інфекцій**

Хімічні антибіотики	Ендолізини	Бактеріофаги
		
Хімічна молекула	Біологічна макромолекула	Біологічні утворення
Націлені на кілька класів (наприклад: грам-негативні)	Націлені на кілька класів (наприклад: грам-позитивні)	Високо селективні (на конкретний штам)
Складний процес дослідження	Помірний процес дослідження	Легкий процес дослідження (екологічне, дослідження in vitro)
Розвивається резистентність	Резистентність не досліджено	Розвивається резистентність
Низькі витрати виробництва	Високі витрати виробництва	Помірні витрати виробництва
Високі витрати на розробку	Помірні витрати на розробку	Низькі витрати на розробку

При підвищенні AMR і виснаженні ресурсу антибіотика, фагова терапія знову викликала інтерес у наукового співтовариства та фармацевтичної промисловості. Фаги та похідні від фагів (терапевтичні білки) мають переваги і недоліки в порівнянні з антибіотикотерапією (Manohar, та ін., 2020).

Властивостями бактеріофагів, що забезпечують можливість їхнього ефективного використання та надають їм переваги перед традиційними антибактеріальними засобами є (Wu, Zachary, Wells, & Loe-Carrillo, 2013):

– принцип самодозування: бактеріофаги є організмами, здатними до самовідтворення, самостійно регулюють свою чисельність (зменшуючи або

збільшуючи її), оскільки розмножуються, доки є чутливі бактерії, після чого елімінуються з організму або оточуючого середовища;

- фаги використовують в якості мішеней саме ті рецептори на бактеріальній поверхні, які беруть участь у патогенезі, тобто уражають високовірулентні бактерії;

- бактеріофаги мають бактерицидну дію: бактерія, одноразово уражена літичним фагом, не відновлює свою життєздатність;

- висока специфічність: здатність вибірково лізувати лише бактерії певного виду або їх окремі серологічні групи;

- ефективна дія на біоплівкову організацію бактерій: якщо антибіотики здатні знищувати біоплівку в концентраціях, що значно перевищують мінімальні пригнічуючі концентрації для планктонних культур, і можуть бути небезпечними для людини, то вплив фагів проявляється навіть при застосуванні звичайних терапевтичних доз;

- відсутність у фагів токсичного ефекту щодо нормальної симбіотичної мікрофлори організму людини, тому природний баланс внутрішнього середовища організму не порушується;

- наявність побічних ефектів та ускладнень для препаратів бактеріофагів не характерна (рідко — алергічні реакції, реакція вивільнення при масивному руйнуванні мікроорганізмів), в той час як, крім поширених дисбіотичних змін, антибактеріальні засоби часто викликають алергічні, токсичні та конкурентні ефекти (по відношенню до інших медикаментів) (Жмінько, Федченко, & Зінов'єва, 2015).

Відомі два шляхи інфікування бактерій помірними фагами. Під час літичного шляху виробляються нові віріони, після- вбивають господаря. У лізигенному циклі, вбудовують свою ДНК у хромосому господаря і переходять у літичний цикл. Отже, лізигенний цикл найкраще використовувати для переносу бажаної ДНК у бактерію. Так, у дослідженні (Yosef, Kiro, Molshanski-Mor, Edgar, & Qimron, 2014) науковці використовували помірні фаги задля зміни резистентності патогенна до

антибіотиків шляхом відновлення його чутливості до антибіотиків. Помірні фаги перенесли специфічні гени в бактерії та інтегрували їх у бактеріальний геном шляхом лізогенізації. Інтегровані гени надають чутливість до двох типів антибіотиків, стрептоміцину та хінолонів. Сенсibiliзація була досягнута просто за рахунок домінування чутливого алеля над стійким.

Існує кілька досліджень, які оцінюють вплив лікування фагами на конкретні інфекції. Однак існує кілька досліджень, які оцінюють ефект комбінованого лікування фагами з антибіотиками, і деякі з них є перспективними. Таким чином, у дослідженні курчат-бройлерів, інфікованих *E. coli*, лікування фторхінолонами (енрофлоксацином) призвело до зниження смертності з 68% до 3%, тоді як лікування фагами призвело до зниження смертності до 15%. Комбіноване лікування фторхінолонами та фагом одночасно призвело до 0% смертності. Інше дослідження показало, що на щурячій моделі ендокардиту, індукованого *P. aeruginosa*, комбіноване лікування ципрофлоксацином і фагом призвело до 10 000-кратного зниження бактеріального навантаження порівняно з лікуванням лише ципрофлоксацином або фагом; тим часом та сама комбінація показала синергію у знищенні *P. aeruginosa* як *in vitro*, так і *in vivo*. Таким чином, незважаючи на те, що тема лікування фагами є багатообіцяючою, дослідження, що оцінюють як *in vitro*, так і *in vivo* ефекти фагів при комбінованому лікуванні антибіотиками, виправдані (Oechslin та ін., 2017).

Антибіотики та фаги діють дуже по-різному на бактеріальну клітину, оскільки фаги зазвичай є штам-специфічними, навпаки, антибіотики є мультиспектральними препаратами, які лікують низку видів бактерій. Тим не менш, фаги мають перевагу перед антибіотиками. Крім того, фаг може з'являтися та мутувати відповідно до стресу та умов, що робить їх краще, ніж антибіотики, тому що у випадку використання антибіотиків бактерії зазвичай розвивають резистентність, що призводить до обмеження антибіотичної дії всередині біоплівки. Він також продемонстрував зниження ймовірності появи подвійної резистентності у бактеріальних патогенів, що означає, що

одночасна резистентність проти антибіотиків і фагів мало ймовірна. Крім того, було встановлено, що поетапне застосування антибіотиків і фагового коктейлю є більш ефективним у знищенні біоплівки. У своїй статті (Morrisette та ін., 2020) детально обговорили взаємодію між фагом і антибіотиками та результуючий вплив на покращену ерадикацію біоплівки, зниження росту бактерій і зміни моделей резистентності бактерій.

Бактеріофаги використовувалися для лікування бактеріальних інфекцій, що охоплюють різні ділянки тіла. Найбільша кількість цих досліджень присвячена використанню фагів для місцевого лікування шкірних бактеріальних інфекцій. Так, під час та після Другої світової війни у Східній Європі повідомлялося про сприятливий вплив застосування бактеріофагів для лікування локалізованих інфекцій у ранах, опіках та трофічних виразках, включаючи діабетичну стопу (Morozova та ін., 2018).

Реалістична точка зору полягає в тому, що фаготерапія не є «ліками від усього». Вона має свої властиві обмеження:

- Фаготерапія як точна медицина передбачає ідентифікацію та культивування збудника інфекції, щоб можна було перевірити його на чутливість до фагів.
- Взаємодія фага з цільовим патогеном може різко відрізнятися *in vitro* та *in vivo* в рідинах організму, і це можна перевірити лише за допомогою сурогатних систем.
- Щоб задовольнити попит, лабораторія фаготерапії повинна мати колекцію фагів, яка охоплює всі найпоширеніші патогени. Це може включати кілька тисяч фагів, управління якими вимагає кваліфікованого персоналу та спеціального лабораторного простору. Усі фаги повинні пройти ретельну характеристику, перш ніж їх можна буде схвалити для фагової терапії (Pirnay та ін., 2018).
- Виробництво безпечних фагових продуктів, навіть у невеликому персоналізованому масштабі лікування, вимагає наявності затверджених заходів контролю якості. Має бути забезпечена

стерильність, стабільність і відсутність ендо- та екзотоксинів або інших шкідливих сполук.

- Незважаючи на те, що природні фаги відносно легко виділити від багатьох патогенів, все ще існує багато видів бактерій, для яких фаги є рідкісними або навіть відсутніми
- Робота над фагами проти анаеробних бактерій або патогенів BSL класу 3 представляє додаткові проблеми (Skurnik, 2022).

Феномен стимуляції вироблення деякого вірулентного фага бактеріальною клітиною-господарем після обробки сублетальною концентрацією антибіотиків отримав термін синергія фаг-антибіотик (PAS). Показано, що продукція фага фMFP збільшується більш ніж у сім разів в уропатогенному штамі *E. coli*, коли його обробляють субінгібіторною концентрацією цефотаксиму. Подібну стимуляцію спостерігали у T4-подібних фагах з β -лактамами та хінолоновими антибіотиками. Ідея полягає в посиленні комбінованого бактерицидного ефекту (Singh, Padmesh, Dwivedi, & Kostova, 2022).

Хоча PAS показав багатообіцяючі результати в лікуванні бактеріальних інфекцій, існує також кілька проблем і обмежень, які необхідно вирішити. Головним з них є можливість взаємодії між антибіотиками та фагами. Антибіотики можуть перешкоджати реплікації фагів і знижувати ефективність фагової терапії. І навпаки, фаги також потенційно можуть перешкоджати активності антибіотиків (Chang, Wang, Regev-Yochay, Lipsitch, & Hanage, 2014). Таким чином, для максимізації ефективності PAS необхідний ретельний вибір антибіотиків і фагів, а також оптимізація часу та дозування лікування. Іншою проблемою є можливість розвитку стійкості як до антибіотиків, так і до фагів. Хоча PAS може допомогти запобігти виникненню стійких до фагів бактерій, використання антибіотиків також може підвищити ризик розвитку резистентності до антибіотиків (Kortright, Chan, Koff, & Turner, 2019). Тому важливо стежити за розвитком резистентності та розробляти стратегії для мінімізації ризику резистентності.

У цьому відношенні PAS може базуватися на взаємовиключних механізмах резистентності, наприклад, коли фаги використовують ефлюксні насоси як рецептори, бактерії зі зниженою адсорбцією фагів є більш чутливими до антибіотиків. Використання PAS також має значення для зменшення появи резистентних штамів.

1.3. Стан дослідження проблеми вітчизняними вченими

Бактеріофаги (БФ) - це віруси прокаріот. Вони є у всіх видів бактерій, що зустрічаються на нашій планеті. Немає жодного відомого мікроорганізму, для якого б не було хоча б одного бактеріофага. Щоб зрозуміти роль бактеріофагів в житті планети, потрібно відмітити, що кожної секунди відбувається 1023 актів інфікування БФ бактерій. Кількість всіх штамів БФ близько 10^{15} , а сумарна кількість - 10^{32} , тобто на кожну бактерію припадає приблизно по 1000 бактеріофагів.

БФ - це захищена форма нуклеїнової кислоти, дуже добре націлена, яка має оболонку із різними можливостями розпізнавання і факторами, що сприяють проникненню в бактерійну клітину (Завіднюк, 2015).

Проаналізувавши пошукові в Україні в широкому масштабі не вивчають виробництво бактеріофагів та їх препаратів. Проте є достатньо статей з вивчення їх властивостей у фаготерапії.

Фаготерапія – використання вірусів бактерій для специфічного лікування інфекційних хвороб, що практикується у світі більше 100 років. Застосування фагів з лікувальною метою в багатьох випадках використовується для терапії хронічних бактеріальних інфекцій, які найчастіше є толерантними до антибіотикотерапії. В умовах *in vitro* та *in vivo* було показано, що бактеріофаги ефективні у відношенні мультиекстремально- та панрезистентних бактерій, також вони активні у відношенні біоплівкоутворюючих штамів мікроорганізмів. Авторами статті (Лютко, Вітрак, & Митякіна, 2020) було досліджено спектр збудників, що викликали інфекційні ускладнення у пацієнтів з травмами та патологією опорно-рухового апарату.

Матеріалом для дослідження слугували вміст ран, операційний матеріал та пунктат з суглобів. Всього було проаналізовано 73 клінічні штами мікроорганізмів. З них: 57 штамів – *Staphylococcus aureus* (78%), 1 – *Klebsiella aerogenes* (1,8%), 2 штами – *Klebsiella pneumonia* (3,5%), 1 – *Klebsiella oxytoca* (1,8%), 8 – *P. Aeruginosa* (14,0%) та 4 – *E.coli* (7,0%).

Ізоляцію бактеріофагів проводили з використанням класичних мікробіологічних методів. Матеріалом для дослідження виступали стічні води. Було виділено, очищено та накопичено 30 штамів бактеріофагів, які проявляли специфічну активність у відношенні до раніше виділених бактерій (Лютко, Вітрак, & Митякіна, 2020).

16 штамів бактеріофагів були активні у відношенні *Staphylococcus aureus*, 7 лізували *P. aeruginosa*, 2 штами – *Klebsiella pneumoniae*, по одному штаму до *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes* та 3 штами – *E.coli*. (Воробей, Воронкова, & Вінніков, 2014; Волк, Бойченко, Матвєєва, Жук, Бойченко, 2017).

Приготовлені розчини на основі виділених бактеріофагів активно лізували всі бактерії, включаючи антибіотикорезистентні штами. Спостерігалася специфічна активність у відношенні MRSA та панрезистентного штаму *P. aeruginosa*. Не була зафіксована перехресна резистентність у мікроорганізмів між антибактеріальними засобами та бактеріофагами, що дозволяє їх використовувати як поодинці, так і в необхідних комбінаціях. Проведені попередні експериментальні дослідження дозволяють зробити висновок, що препарати на основі бактеріофагів мають значну перспективу для використання їх в ортопедії та травматології з метою лікування інфекційних ускладнень, що викликані резистентними мікроорганізмами (Лютко, Вітрак, & Митякіна, 2020; Воробей, Воронкова, & Вінніков, 2014; Волк, Бойченко, Матвєєва, Жук, & Бойченко, 2017).

Нині багато лікарів намагаються змінити концепцію лікування інфекційних захворювань. Основні позитивні властивості бактеріофагів – висока чутливість бактерій до них, відсутність протипоказань до

фагопрофілактики та фаготерапії для макроорганізмів. Крім того, використання фагів одночасно з антибіотиками збільшує ефективність лікування (Смотров, Несміян, & Громов, 2021).

В ході ряду досліджень бактеріофаги продемонстрували високу ефективність при лікуванні інфекції, що знаходиться в складі біоплівки, боротьба з якими є на даний момент одним з пріоритетних напрямків клінічної медицини та мікробіології. За рахунок самореплікації бактеріофаги діють до моменту повного зникнення інфекції, а за відсутності специфічних бактерій фаги стають неактивними та видаляються з організму. Фаготерапія безпечна для вагітних жінок та дітей - навіть для немовлят, так як за рахунок вищезазначеної специфічності фаги не можуть стати причиною подальшого розвитку алергії чи імунної недостатності (Смотров, Несміян, & Громов, 2021).

В даному літогляді розглянемо історію вивчення бактеріофагів у сусідніх країнах та при Радянському Союзі.

Основоположником фаготерапії у Радянському Союзі прийнято вважати грузинського мікробіолога Георгія Еліаву – учня Фелікса д'Ереля. За його ініціативою у 30-ті роки був створений Інститут дослідження бактеріофагів у Тбілісі, який у 1951 р. увійшов до складу групи Інститутів вакцин і сироваток СРСР (Воробей, Воронкова, Сірокваша, & Вінніков 2014).

Розробка і застосування лікувальних фагових препаратів ніколи не припинялися у Радянському Союзі, а надалі у Польщі та Чехії. Накопичений у цих країнах великий досвід свідчить про високу ефективність і безпеку препаратів бактеріофагів (Воробей, Воронкова, & Вінніков, 2014). Останні дані свідчать про відновлення інтересу до фаготерапії, внаслідок чого докладаються деякі зусилля, спрямовані на відродження практики використання препаратів бактеріофагів. Протягом останніх десятиліть дослідження з вивчення ефективності й розробки нових препаратів бактеріофагів тривали у Франції, Чехії та Польщі, а в кінці ХХ ст. – і у

Великобританії, США, а також Ізраїлі (Воробей, Воронкова, Сірокваша, & Вінніков 2014).

На початку 2000 року Глен Моріс, співробітник Університету Меріленд (США) спільно з НДІ бактеріофагів, мікробіології та вірусології у Тбілісі почали дослідження фагових препаратів для отримання ліцензії на їх застосування у США. На сьогодні масове виробництво препаратів бактеріофагів, зареєстрованих національними органами охорони здоров'я, зберігається в росії та у Грузії (де з 1930-х рр. діє Інститут бактеріофага, мікробіології та вірусології (нині ім. Г. Еліави), створений за особистої участі Ф. д'Ереля). У Польщі препарати фагів виробляються і застосовуються у спеціалізованому центрі в Інституті імунології та експериментальної терапії у Вроцлаві (Воробей, Воронкова, Сірокваша, & Вінніков 2014).

Закордонні компанії Biophage Inc. (Canada), Exponential Biotherapies Inc. (USA), Intralytix Inc. (USA), Phage Biotech Ltd (Israel), Phage Tx. Inc. (USA) досліджують можливості використання фагів як антибактеріальних препаратів, проте промислове виробництво ще не налагоджене. На території України випуск бактеріофагів лише починається, тому основна потреба ринку закривається за рахунок імпортованих як моно-, так і комплексних фагів, що широко реалізуються в аптечній мережі більшості великих міст країни Вроцлаві (Воробей, Воронкова, Сірокваша, & Вінніков 2014).

Україна також має власних виробників бактеріофагів. Так, на підприємстві ТОВ «Фармекс Груп» виробляються полівалентні препарати, що являють собою коктейль з бактеріофагів специфічних до різних збудників. Лікарські засоби на основі бактеріофагів виробляються на ТОВ «НЕОПРОБІОКЕАР-УКРАЇНА», для компанії НеоПробіоКеар Інк., Канада. Досліджуються бактеріофаги в інституті Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України Вроцлаві (Воробей, Воронкова, Сірокваша, & Вінніков 2014).

Станом на сьогодні, наукових статей вітчизняних вчених щодо розробки або вдосконалення біотехнологій одержання бактеріофагів для

виробництва антибактеріальних медичних імунобіологічних препаратів майже немає. Тому, це відкрита та перспективна ніша для досліджень в Україні.

РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ БАКТЕРІОФАГІВ

2.1. Особливості виробництва бактеріофагів. Продукція у біореакторах

Найпоширеніший спосіб виробництва бактеріофагів - в біореакторі з перемішуванням з різними режимами роботи:

- Періодичний;
- Напівбезперервний;
- Безперервний.

Для отримання оптимальної безперервної продукції бактеріофагів, слід контролювати режим роботи, а також робочі умови (такі як температура, рН, режиму подачі, розмір біореактора), що впливають на середовище росту бактерій і цим опосередковано утворення фагів.

Опис виробництва фагів при різних режимах роботи, їх переваги та недоліки були нещодавно представлені науковцями (Agboluaje, Sauvageau, 2018). Було виявлено, що під час періодичного режиму можна досягти високих концентрацій фагів, але мінливість умов під час процесу та особливо тривалий час підготовки, (включаючи очищення), знижують його загальну продуктивність. Кінцевий титр як функція початкового МОІ для інфікування бактеріофагом T4 *Escherichia coli*. У біореакторі 1 л інфекційне навантаження становило 4×10^7 КУО/мл (Agboluaje, Sauvageau, 2018).

Дана проблема може бути вирішена впровадженням безперервного виробництва. Проте процес переходу на безперервні біотехнологічні процеси, особливо у виробництві біофармацевтичних препаратів, є вимогливим через підвищену складність (Rathore, 2015). Але при реалізації цей недолік компенсується вищою продуктивністю і зниженням витрат. Крім того, забезпечується краща якість продукту та його консистенція завдяки

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Біотехнологія одержання препаратів на основі бактеріофагів	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Коваль Р.В.					31	129
Перевір.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ 32		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

легшому контролю (Rathore, 2015).

У своїй статті науковці Jin-Sun Lee у співавторстві, описали модифікований метод масового виробництва бактеріофагів шляхом впровадження двостадійного самоциклічного процесу (TSSC), який давав висококонцентровані розчини бактеріофагів шляхом поповнення живильного середовища на початку кожного процесу без додаткового підживлення. *Під час росту Cronobacter sakazakii* та розмноження бактеріофага CS01 у режимі реального часу відстежували рН культурального середовища та оцінювали зміни різних параметрів. Після порівняння процесу TSSC у біореакторах баночного типу та процесу періодичного культивування у шейкерних колбах було встановлено, що концентрація розчину титру фагів, отриманого за допомогою процесу TSSC, була в 24 рази вищою, ніж під час процесу періодичного культивування. Загалом, цей модифікований процес TSSC може спростити великомасштабне виробництво бактеріофага CS01 і знизити собівартість одиниці розчину титру фагів (Lee та ін., 2021).

Біологічна природа бактеріофагів полягає у їх розмноженні в клітині господаря. Тому, виробництво бактеріофагів вимагає участі принаймні двох операційних блоків: перший для росту бактерій-господарів і другий-розмноження або зараження бактеріофага (García, Latz, Romero, Higuera, García, & Bastías, 2019). Важливо також враховувати основні параметри росту бактерій та фагової інфекції: субстрати для бактерій, оптимальні температури як для росту бактерій, так і для фагової інфекції, оскільки ці фактори можуть впливати на інфекційність фагів (Tokman, Kent, Wiedmann, & Denes, 2016). Також рекомендується вибирати невірулентний штам бактерій в ролі господаря. Промислова продукція потребує великої кількості клітин бактерії господаря, тому необхідно уникати використання вірулентних стійких до ліків, і особливо мультирезистентних патогенів (Torres-Barceló, 2018).

Ученими Mancuso та ін. було доведено, що безперервне виробництво високих титрів фагів надійно досягається за допомогою двох біореакторів

безперервного перемішування, з'єднаних послідовно, і останнього резервуара з перемішуванням, який працює в напівперіодичному режимі для завершення процесу інфікування. Для дослідження використовували облігатно-літичний фаг *E. coli* T3 (належить до родини *Podoviridae*, ATCC11303-B3) та бактерію-господар *E. coli* (ATCC 11303). Перший біореактор забезпечує стаціонарне розмноження бактерій-господарів, а далі бактерії-господарі відокремлюють від реактора виробництва фагів, розташованого нижче за ним, тим самим пригнічуючи пов'язану з фагом мутацію хазяїна. Маніпуляція швидкостями розведення реактора-господаря дозволяла контролювати фізіологічний стан бактеріального хазяїна, який подавався в реактор фагової інфекції (Mancuso, Shi, & Malik, 2018). Чітко визначена концентрація за різних умов вказує на те, що фізіологічний стан бактерій впливає на швидкість утворення фагів. З цієї причини під час дослідження були створені неоптимальні умови росту бактерій (Golec, Karczewska-Golec, Łoś, & Węgrzyn, 2014; Nabergoj, Modic, & Podgornik, 2018). Отримані результати важливі не тільки для проектування виробничого процесу, а й для застосування різних фагів. Крім того, дуже важливо дослідити вплив композиції середовища, оскільки певні компоненти, такі як концентрація та тип солі іонів, а також присутність органічних кофакторів, таких як амінокислий L-триптофан впливає на адсорбцію фагів (Mojica, Brussaard, 2014). У разі екстремального обмеження субстрату формування фагів може бути повністю зупинено, незважаючи на інфекцію, як у випадку глибокого сну (Bryan, El-Shibiny, Hobbs, Porter, & Kutter, 2016).

Автори статті Storms та ін. (Storms, Brown, Cooper, Sauvageau, & Leask, 2013) вивчали кількість утворених фагів з бактеріальних клітин, вилучених на різних стадіях під час періодичного процесу культивування, особливо під час експоненціальної та лімітаційної фази бактерій. Бактеріальні зразки заражали фагами та за кількістю новоутворених фагів проводили визначення. Виявилося, що проби вилучені під час фази експоненціального росту демонстрували подібну кількість новоутворених фагів, тоді як їх кількість

була значно нижчою, коли клітини перебували у фазі обмеженого росту. Крім того, дослідження утворення фагів із синхронізованою культурою бактерій у фазі експоненціального росту продемонструвало відмінності навіть під час циклу росту клітин. Новоутворені клітини виробляли меншу кількість фагів, ніж клітини, які ближче до клітинного поділу (Storms, Brown, Cooper, Sauvageau, & Leask, 2013).

Вчені Kick у співавт. вивчали утворення бактеріофагів у хемостаті. Після досліджень, було виявлено, що хемостат не підходить для постійного промислового виробництва фагів внаслідок мутацій, крім того, апарат призначений для коеволюційних досліджень. Проте це чудовий інструмент для дослідження впливу фізіологічного стану бактерій на фагоформування, оскільки умови росту можна точно регулювати і залишати незмінними протягом тривалого часу (Kick, Behler, Severin, & Weuster-Botz, 2017).

У статті описано пілотну ампліфікацію бактеріофагів *E. coli* для бактеріофагової терапії (Pirnay, Merabishvili, Van Raemdonck, De Vos, & Verbeken, 2017). Автори використовували різні виробничі системи, такі як: хвилові мішки, реактори з перемішуванням і навіть прості колби Ерленмейера, і були отримані з прийнятні пікові титри 10^9 – 10^{10} БУО/мл (Pirnay, Merabishvili, Van Raemdonck, De Vos, & Verbeken, 2017).

2.2. Роль умов культивування на вихід фагів

Для виробництва якісних лікарських засобів на основі бактеріофагів важливо щоб середовища, які використовуються для розмноження бактеріофагів, не містили потенційно небезпечних речовин, контамінантів, такі як пріони, віруси та алергени (Weber-Dąbrowska та ін., 2016). У роботі (Speck, & Smithyman, 2016) доведено, що для внутрішньовенного застосування фагів, якість середовища, що використовується для виробництва, є важливим критерієм.

Найпоширенішими системами фагів-господарів, що використовуються, є штами кишкової палички та їх фаги, через кількість інформації щодо цих бактеріофагових систем (фаги *E. coli* T3, T4 і T7) і відсутність інформації про

інші бактеріально-фагові системи. Відповідно до описаної статті (Sochocka, Tomczyk, Sobczynski, Szermer-Olearnik, & Boratyński, 2015) отримані титри можуть бути до $1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл в біореакторі періодичної дії (5 л). Цей рівень виробництва узгоджується з продукцією, необхідною для терапевтичних цілей ($>1 \times 10^{10}$ БУО/мл), враховуючи етапи очищення, швидкість розпаду фагів, стабільність та термін зберігання (Naghizadeh, KarimiTorshizi, Rahimi, & Dalgaard, 2018). Інші автори також повідомили про перспективні рівні виробництва 5×10^{12} БУО/мл в 1,2 л, і $2,4 \times 10^{13}$ БУО/мл в 1 л (Warner, Barker, Lee, & Perkins, 2014; Nabergoj, Kuzmic, Drakslar, & Podgornik, 2018).

У статті (Ali, Rafiq, & Ratcliffe, 2019) описується підхід повного факторного дизайну експериментів для вивчення ключових вхідних змінних процесу (температура, час зараження, множинність зараження, перемішування) щодо їх впливу на ключові результати процесу (вихід бактеріофага, кінетика зараження) для двох біопроцесів бактеріофаг-бактерія-господар (Т4 – *Escherichia coli*; Phage K – *Staphylococcus aureus*). Отже, температурна крива показала пік при 28°C для Т4, тоді як фаг К показав пік між 26°C і 31°C.

У табл. 2.1 наводяться дані щодо продукції фагів, умови їх виробництва, що проводилися експериментально.

Таблиця 2.1

Наявні дані про виробництво бактеріофагів, що оцінені експериментально

Мікроорганізм-господар	Продукція фагів та параметри	Джерело
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 – фаг Т3 ATCC 11303-B3	Продукція : 10^{11} БУО/мл Робочий об'єм: 1 л (біореактор)	Mancuso, Shi & Malik, 2018
<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655 – фаг Т4 (DSM 4505)	Продукція фагів: 1×10^9 БУО/мл/год Продукція: $2,4 \times 10^{13}$ БУО/день Робочий об'єм: 1 л Швидкість розведення : 2,0 год ⁻¹	Nabergoj, Modic, , Podgornik, 2018

Мікроорганізм-господар	Продукція фагів та параметри	Джерело
<i>Escherichia coli</i> B – бактеріофаг T4	Продукція : 1.2×10^{16} БУО/мл Робочий об'єм: 8 л (ферментер)	Sochocka, Tomczyk, Sobczynski, Szermer- Olearnik, & Boratyński, 2015
XL1-Blue MRF <i>Escherichia coli</i> – фаг M13KE	Продукція: 5×10^{12} БУО/мл Робочий об'єм: 1,2 л (фласки)	Warner, Barker, Lee, & Perkins, 2014

Під час іммобілізації бактеріальних клітин на альгінатному гелі, вченими Roy та ін.. продемонстровано значне збільшення продуктивності, завдяки легшому відділенню від фагів (Roy, Philippe, Loessner, Goulet, & Moineau, 2018).

Більшість фагів, особливо тих, які призначені для фаготерапії, виділяють із застосуванням невеликих варіацій за класичним протоколом збагачення.

Різновиди господарів бактеріофага може визначити корисність фага для фагової терапії. Деякі фаги інфікують лише декілька штамів (вужчий діапазон господарів), інші інфікують багато штамів того самого виду (ширший діапазон господарів), а інші фаги можуть інфікувати більше одного виду (полівалентний діапазон господарів).

Стандартні протоколи ізоляції не вибирають для певного діапазону господарів. Ізоляція зазвичай виконується на одному штамі бактерій, хоча деякі групи віддають перевагу використанню суміші кількох штамів господарів для відділення фагів (Hupman, 2019; Lobocka, 2018).

Основний метод виділення фагів залишився незмінним з тих пір, як він був розроблений Felixd'Herelle. Зразок бактерій змішують із зразком

навколишнього середовища та суміш інкубується протягом деякого часу, як правило, протягом ночі. Потім бактерії видаляють з культури центрифугуванням та/або фільтрацією, а фільтрат аналізують на наявність фагів. Будь-які ідентифіковані фаги потім характеризуються, щоб визначити, чи вони мають бажані властивості для фагової терапії як описано в Loboska та ін.(Loboska та ін., 2018) та Abedon та ін. (Abedon, Garcia, Mullany, & Aminov, 2017).

Наявність гелевих волокон у середовищі сприяє росту деяких фагів, які не лізують клітини в бульйонній культурі. Ця методика дуже корисна для пошуку фагів у дослідженнях навколишнього середовища, де існує широке розмаїття ізольованих фагів краще відображає вірусне співтовариство, але не має широкого використання у фаготерапії (Abedon, Garcia, Mullany, & Aminov, 2017).

Важливо для вибору і продукції бактеріофагів знати за якими характеристиками потрібно обирати продуцента. Хоча можна стверджувати, що широка біологічна характеристика фага є корисною, якщо вона має використовуватися для фаготерапії, на практиці існує обмежена кількість загальноприйнятих характеристик:

- Здатність очистити культуру від бактерій-мішеней або інший показник вірулентності фагів;
- Облігатно-літичний ріст або відсутність лізогенного потенціалу;
- Потенціал трансдукції;
- Скринінг генів токсинів;
- Діапазон хазяїв (Jo, Kwon, Kim, & Lee, 2023).

Як у лабораторному, так і в терапевтичному контексті, ретельна ізоляція та ретельна характеристика штамів фагів служать фундаментальною основою для розуміння їхніх властивостей і перспективної ролі у боротьбі з бактеріальними інфекціями. На сьогодні виділено численні фаги, кожен з яких націлений на відомі бактеріальні патогени, такі як *Acinetobacter*, *Aeromona*, *Erwinia*, *Mycobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomona*, *Salmonella*,

Staphylococcus, *Streptococcus*, *Vibrio* та *Xanthomonas* (Bagińska та ін., 2023; Akmal, Rahimi-Midani, Hafeez-ur-Rehman, Hussain, & Choi, 2020; Park, Kim, Song, Lee, & Roh 2022; Hatfull, 2018; Zreløvs, Jansons, Kazaka, Kazaks, & Dislers, 2023; Sharma та ін., 2021; Teklemariam та ін., 2022; Shimamori та ін., 2021; Ben-Zaken та ін., 2021; Yang та ін., 2020; Dong та ін., 2018).

Фагова інженерія, також відома як фагова модифікація або біоінженерія, передбачає маніпуляції з фагами для посилення їхніх терапевтичних можливостей або розширення їх корисності (Anyaegbunam та ін., 2022; Barnard, & Fairhead, 2021; Kilcher, & Loessner, 2019). Цей процес використовує різноманітні методи для зміни фагів, спрямовуючи їх до конкретних бактеріальних штамів, підвищуючи їхню стабільність під час зберігання та транспортування, підвищуючи їхню ефективність і полегшуючи транспортування додаткового вантажу, включаючи терапевтичні гени. Фагова інженерія має значний потенціал для налаштування фагової терапії, охоплюючи застосування від діагностики до персоналізованої медицини та посилюючи ефективність фагів проти мультирезистентних бактерій (Kilcher, & Loessner, 2019; Hatoum-Aslan, 2018).

Останні досягнення в системі CRISPR-Cas започаткували трансформаційну еру розробки бактеріофагів (Duong, Carmody, Ma, Peters, & Nugen, 2020; Yehl та ін., 2019). Ця система дозволяє точно маніпулювати геномами фагів, використовуючи направляючу РНК для спрямування ферменту Cas на розрізання ДНК у певних місцях, дозволяючи цілеспрямовані генетичні модифікації, такі як видалення, вставка або зміна генів. Цей підхід покращує властивості фагів, розширюючи літичну активність, діапазон господарів і здатність переносити терапевтичний вантаж (Yehl та ін., 2019; Zhang та ін., 2022). Крім того, він вміщує більше кодування генів через збільшену упаковку геному порівняно з меншими фагами, такими як M13, які часто використовуються у фагових дисплеях. Цей прогрес розширив гнучкість фагових дисплеїв і підтримав презентацію більших білків або складних генних конструкцій на поверхні фагів. Крім того,

традиційний трудомісткий скринінг із застосуванням радіоактивних ізотопів або афінних міток для рекомбінантних фагів може бути спрощений за допомогою направляючої РНК, призначеної для націлювання на неінженерні (дикого типу) фагоспецифічні послідовності (Nethery, Hidalgo-Cantabrana, Roberts, & Barrangou, 2022).

Тим не менш, обережний підхід є обов'язковим у фаговій інженерії, враховуючи можливу безпеку та регуляторні наслідки. Цей підхід забезпечує розумне та безпечне використання сконструйованих фагів у терапевтичному та сільськогосподарському контекстах. Оскільки поточні дослідження розширили межі фагової інженерії, її здатність трансформувати лікування хвороб і пом'якшення інфекцій продовжує привертати увагу біотехнологічної та медичної промисловості (Jo, Kwon, Kim, & Lee, 2023; Nethery, Hidalgo-Cantabrana, Roberts, & Barrangou, 2022).

Узагальнена інформація до Розділу 2 «Біотехнологія одержання препаратів на основі бактеріофагів» представлена у табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Характеристика отримання бактеріофагів за допомогою різних мікроорганізмів-господарів

Мікроорганізм-господар	Бактеріофаг	Умови культивування	Режим культивування	Вихід бактеріофагів	Джерело
<i>Escherichia coli</i>	T4	37 °C, аерація 0,4 л/хв, 200 об/хв	Безперевний	4×10^7 БУО/мл	Agboluaje, Sauvageau, 2018
<i>Cronobacter sakazakii</i>	CS01	pH 5,8 24 год 37 °C	Двостадійний самоциклічний процес (TSSC)	5.0×10^{10} БУО/мл	Lee та ін., 2021
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	T3	37 °C, 16 год	2 безперевних біореактра з'єднаних послідовно	1×10^{11} БУО\мл	Mancuso, Shi & Malik, 2018

Мікроорганізм-господар	Бактеріофаг	Умови культивування	Режим культивування	Вихід бактеріофагів	Джерело
<i>Escherichia coli</i> JM109	M13	pH 6,7, 37 °C	У хемостаті	50 БУО/КУО	Kick, Behler, Severin, & Weuster-Botz, 2017
<i>Escherichia coli</i>	T4	37 °C, pH 7,0 4 год	У біореакторі	10^9 – 10^{10} БУО/мл	Pirnay, Merabishvili, Van Raemdonck, De Vos, & Verbeken, 2017
<i>Escherichia coli</i>	T4	37 °C, pH 7,0 6 год	У біореакторі 5 л	$1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл	Sochocka, Tomczyk, Sobczynski, Szermer-Olearnik, & Boratyński, 2015
<i>Escherichia coli</i>	T4	37 °C, pH 7,0 6 год	У біореакторі 1,2 л	5×10^{12} БУО/мл	Warner, Barker, Lee, & Perkins, 2014
<i>Escherichia coli</i>	T4	37 °C, pH 7,0 6 год	У біореакторі 1 л	$2,4 \times 10^{13}$ БУО/мл	Nabergoj, Kuzmic, Drakslar, & Podgornik, 2018

Отже, провівши аналіз наукових досліджень за останні роки щодо одержання бактеріофагів, можемо зробити висновок, що проблема вивчалася досить широко. На даний час бактеріофаги є цікавою темою для досліджень у всьому науковому світі. Як можна побачити у літературному огляді, бактеріофаги можна використовувати не тільки під час фаготерапії, а й у різних інших галузях (агропромисловість, безпосередньо на виробництвах для обробки поверхонь, на фермерствах для лікування худоби, для очищення стічних вод). Також багато досліджень бактеріофагів і в нано-напрямку. Вчені експериментують з будовою капсидів фага і таким чином створюють нанокаркаси. Застосування фагів для генної інженерії також має місце. За допомогою фагів як векторів створюють специфічні вакцини. Зважаючи на

все вищесказане, виробництво та продукція бактеріофагів є актуальною та потрібною для людства, адже з кожним роком все більше розвивається резистентність бактерій до антибіотиків, а бактеріофаги, як показують дослідження, є чудовою альтернативою.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1. Обґрунтування біосинтетичної здатності біологічного агента для отримання субстанції

Група бактеріальних видів, широко відомих як — *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacter spp* — (ESKAPE), часто спричиняють важкі інфекції. Ця група бактерій здатна уникнути бактерицидної дії антибіотиків за допомогою багатьох механізмів. За підрахунками, зростання резистентності до антимікробних препаратів призведе до смерті 10 мільйонів людей щорічно до 2050 року (що перевищуватиме кількість смертей, пов'язаних із раком), і коштуватиме глобальній економіці приблизно 100 трильйонів доларів США, що викличе необхідність негайної розробки альтернативного лікування (Piddock, 2016).

На основі аналізу літературних джерел (див. розділ 1 та 2), зробимо узагальнюючу таблицю (табл. 3.1) технологічних особливостей одержання бактеріофагів *Escherichia coli*, як одного з компонентів препарату «Піофаг».

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу				Літ.	Арк.	Акрушів	
Розроб.		Коваль Р.В.										
Перевір.		Стабніков В.П.									42	129
Консультант									Кафедра БТМ ₄₃			
Н. Контр.												
Затверд.		Стабніков В.П.										

Таблиця 3.1

Особливості одержання бактеріофагів *Escherichia coli*

Мікроорганізм-господар	Бактеріофаг	Середовище культивування г/л	Вихід фагів БУО/мл	Спосіб культивування	Параметри культивування	Джерело
<i>Escherichia coli</i>	T4	Глюкоза - 20 , MgSO ₄ ·7H ₂ O - 2, Na ₂ HPO ₄ -6 г, NH ₄ NO ₃ - 4, K ₂ HPO ₄ - 4 г, C ₁₀ H ₁₈ N ₂ Na ₂ O ₁₀ ·0,014, CaCl ₂ ·2H ₂ O - 0,01, FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,01, дріжджовий екстракт 0,05	4×10 ⁷	Безперервний режим	37 °C, аерація 0,4 л/хв, 200 об/хв	Agboluaje M, Sauvageau D. (2018). Bacteriophage Production in Bioreactors. <i>Methods Mol Biol.</i> 1693:173-193. doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_15. PMID: 29119441.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	T3	Глюкоза - 2,94, KH ₂ PO ₄ - 13,3, MgSO ₄ - 0,586, (NH ₄) ₂ HPO ₄ - 4, лимонна кислота - 1,5, цитрат Fe(III) - 0,1008	1×10 ¹¹	Два біореактори безперервного перемішування, з'єднаних послідовно, і третій для зберігання для завершення інфекційного процесу	37 °C, 16 год	Mancuso F, Shi J, Malik DJ. (2018). High Throughput Manufacturing of Bacteriophages Using Continuous Stirred Tank Bioreactors Connected in Series to Ensure Optimum Host Bacteria Physiology for Phage Production. <i>Viruses.</i> Oct 1;10(10):537. doi: 10.3390/v10100537. PMID: 30275405; PMCID: PMC6213498.
<i>Escherichia coli</i>	T4	Гідролізат казеїну- 3,0, пептон-10,0, NaCl-5,0, глюкоза 10,0	1,2 ×10 ¹⁶	Ферментер BioFlo 415	pH 7,0, 37 °C, 50 об/хв, 6 год	Sochocka, M., Tomczyk, T., Sobczynski, M., Szermer-Olearnik, B., and Boratyński, J. (2015). The kinetics of <i>Escherichia coli</i> B growth and bacteriophage T4 multiplication in SM-1 novel minimal culture medium. <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> 61, 75–81. doi: 10.2323/jgam.61.75

За результатами наведеними у табл.3.1, можемо побачити, що найбільший вихід фагів на мл спостерігається у *Escherichia coli* (фаг Т4), які культивуються у ферментері BioFlo 415 - $1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл, а найнижчий при безперервному культивуванні *Escherichia coli* (фаг Т4) і становить 4×10^7 БУО/мл.

Однак, така порівняльна характеристика не є достатньою для оцінки найкращого біологічного агента. Тому, наступним етапом буде порівняння вартості поживних середовищ (табл.3.2) використовуваних наведеними вище продуцентами.

Таблиця 3.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування фагів бактерією *Escherichia coli*

Мікроорганізм-господар та фаг	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело
<i>Escherichia coli</i> - T4	Глюкоза - 20	100	2	1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O - 2	116,7	0,23	2
	Na ₂ HPO ₄ -6	430	2,58	3
	NH ₄ NO ₃ -4	76	0,3	4
	K ₂ HPO ₄ - 4	261	1,04	5
	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ Na ₂ O ₁₀ - 0,014	270	3,78	6
	CaCl ₂ ·2H ₂ O - 0,01	80	0,0008	7
	FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,01	80	0,0008	8
	дріжджовий екстракт 0,05	1800	0,09	9
Вартість 1 л середовища – 10,02 грн				

Мікроорганізм-господар та фаг	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело*
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 - T3	Глюкоза - 2,94	100	0,29	1
	KH ₂ PO ₄ - 13,3	248	3,3	10
	MgSO ₄ - 0,586	93	0,05	11
	(NH ₄) ₂ HPO ₄ - 4	250	1	12
	C ₆ H ₈ O ₇ - 1,5	79,3	0,12	13
	FeC ₆ H ₅ O ₇ - 0,1008 г	4,40	0,0004	14
Вартість 1 л середовища – 4,76 грн				
<i>Escherichia coli</i> - T4	Гідролізат казеїну - 3	3900	11,7	15
	Пептон - 10	1320	13,2	16
	NaCl - 5	80	0,4	17
	Глюкоза - 10	100	1	1
Вартість 1 л середовища – 26,3 грн				

Примітка.*- Ціни наведено станом на грудень 2023 р.

- <https://prom.ua/p705871106-glyukoza-> , 2. <https://pum.in.ua/goods/sulfat-magniia-300-u/>,
- <https://prom.ua/p1237461796-natrij-fosfornokislyj-> , 4. <https://klebrig.com.ua/ua/p1517369031-ammiachnaya-selitra-klebrig.html>,
- <https://prom.ua/p953593209-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?token=v2%2c>, 6. <https://gerimpex.com.ua/ua/p1553837923-trilon-dinatrievaya-sol.html>,
- <https://prom.ua/p1740408918-kaltsij-hloristyj-1kg.html>,
- <https://himreagent.com.ua/ua/p1090561770-zhelezo-ternokisloe-zheleznyj.html>,
- <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 10. <https://klebrig.com.ua/ua/p1871802690-monokalij-fosfat-klebrig.html>,
- <https://prom.ua/ua/p783600334-sulfat-magniia-magnij.html>,
- <https://prom.ua/ua/p1049090469-sulfat-ammoniya-ammonij.html>,
- https://ankpolimer.com.ua/p1486344963-limonnaya-kislota-330.html?gclid=EAIaIQobChMI3fH19I_u ggMVNKSDbx1ZVwinEAAAYBCAAEgLRofD_BwE ,
- <https://prom.ua/p1873367046-zheleza-tsitrata.html>,
- http://agar.com.ua/Additives_for_microbiology_ru/Casein_hydrolyzate_250,
- <https://www.systopt.com.ua/ru/item-pepton-fermentatyvnyj>, 17. <https://silur.prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html>,

Проаналізувавши табл. 3.2., можна зробити висновки, що середовище для культивування *Escherichia coli* ATCC 11303 та його фага T3 є найдешевшим за порівнювальні середовища: 4,76 грн\л проти 10,02 грн\л (*Escherichia coli*- T4) та 26,3 грн\л (*Escherichia coli*- T4).

Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент, необхідно розрахувати умовну вартість 1 мл цільового продукту – бактеріофагу (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Умовна вартість 1 мл продукту при культивуванні *Escherichia coli* та їх фагів

Мікроорганізм -господар-фаг	Вартість середовища , грн/л	Вихід цільового продукту БУО/мл	Умовна вартість продукту , грн/мл	Тривалість культивування, год	Вихід продукту синтезованого за год, мл/год
<i>Escherichia coli</i> - T4	10,02	4×10^7	$2,5 \times 10^{-10}$	8	5×10^6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 - T3	4,76	1×10^{11}	$4,76 \times 10^{-14}$	16	$6,25 \times 10^9$
<i>Escherichia coli</i> - T4	26,3	$1,2 \times 10^{16}$	$21,9 \times 10^{-19}$	24	5×10^{14}

Проаналізувавши отримані результати, можемо відзначити, що найбільший вихід продукту виробляє бактерія *Escherichia coli* та її фаг T4 - 5×10^{14} мл/год, а умовна вартість цільового продукту даного продуцента становить $21,9 \times 10^{-19}$, що є найменшою серед порівнюваних мікроорганізмів.

Отже, можна зробити висновок, що найкращим біологічним агентом для одержання бактеріофагів є *Escherichia coli* та його фаг T4. Хоча даний продуцент і потребує дорожчого поживного середовища (26,3 грн/л), проте вихід цільового продукту-фагів є найвищим- $1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл, а умовна вартість найнижчою $21,9 \times 10^{-19}$ грн/мл. Тому, для подальшої роботи обираємо бактерію *Escherichia coli* та її бактеріофаг T4.

3.2 Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання, потреби у цільовому продукті

Бактеріофаги є найпоширенішою біологічною сутністю на планеті, яка відіграє ключову роль у бактеріальній екології, здоров'ї тварин і рослин, а також у біогеохімічних циклах. Традиційно основним застосуванням бактеріофагів є фаготерапія. Також фаги потенційно можуть використовуватися для інших завдань, включаючи збереження харчових продуктів, дезінфекцію поверхонь, лікування деяких дисбактеріозів і модуляцію мікробіомів (див. літогляд). Вони можуть використовуватися як інструменти для лікування небактеріальних інфекцій і боротьби зі шкідниками в сільському господарстві; крім того, бактеріофаги можна використовувати для зниження вірулентності бактерій і стійкості до антибіотиків і навіть для боротьби з глобальним потеплінням (Azam, Tan, Veeranarayana, Kiga, & Cui, 2021).

Як відомо, застосування фагів пацієнтом може бути:

- пероральним, у вигляді таблеток або рідин (від 10^5 до 10^{11} БУО/дозу);
- ректальним;
- місцевим (шкіра, очі, вуха, слизові оболонки);
- тампони;
- розчини для полоскання;
- креми;
- аерозолі;
- внутрішньовенних та внутрішньо плевральних.

Сучасні лікувально-профілактичні препарати бактеріофагів являють собою комплекс поліклональних високовірулентних бактеріальних вірусів (у вигляді стерильного фільтрату бактеріальних фаголізатів) з широким спектром антибактеріальної активності щодо стафілококів, стрептококів, ентерококів, кишкової палички, протею, синьогнійної палички, клебсієли, шигели, сальмонели та багатьох інших мікроорганізмів. За своїм складом

препарати бактеріофагів поділяються на полівалентні (активні щодо різних видів і сероварів одного збудника) і комбіновані (містять фаги до декількох збудників) (Жмінко, Федченко, & Зінов'єва, 2015).

Препарати бактеріофагів є нетоксичними та безпечними, тому вони не мають протипоказань до застосування, їх можна призначати особливим групам пацієнтів (вагітні, матері, що годують, та діти будь-якого віку) (Жмінко, Федченко, & Зінов'єва, 2015).

Щоб краще розуміти потребу у цільовому продукті, проаналізуємо фармацевтичний ринок України на наявність даних лікарських засобів у складі яких є бактеріофаги табл.3.4.

Таблиця 3.4

Лікарські засоби, представлені в Україні, що місять у своєму складі бактеріофаги

Назва препарату	Склад	Виробник	Використання	Ціна, грн	Ціна за мл, грн	Ціна за курс лікування (4 рази на добу, 10 діб), грн	Джерело
Піофаг-бактеріофаг-полівалентний розчин по 20 мл	Специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^5 фагових часток: <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	«Фармекс Груп», Україна	Дорослим внутрішньо 30 мл	4 фл- 1182,7	14,8	17 760	1
Інтестіфаг бактеріофаг полівалентний розчин по 20 мл	Специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^5 фагових часток: <i>Shigella flexneri</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	«Фармекс Груп», Україна	Дорослим внутрішньо 30 мл	4 фл-550	6,9	8 280	2

Закінчення табл. 3.4

Назва препарату	Склад	Виробник	Використання	Ціна, грн	Ціна за мл, грн	Ціна за курс лікування (4 рази на добу, 10 діб), грн	Джерело
Бактеріофаг стафілококовий рідина	Стерильний розчин бактеріофагу, що лізує мікроорганізми виду <i>Staphylococcus aureus</i> . з активністю 10^5	«Біофарма», Україна	Дорослим 20-30 мл	1 фл- 100 мл-1700	17	20 400	3

Отже, згідно даних у табл. 3.4., препаратів на основі бактеріофагів українського виробництва лише 3 («Піофаг», «Інтестіфаг» - виробника ТОВ «Фармекс Груп» та «Бактеріофаг стафілококовий» - виробника ТОВ «Біофарма»). Можемо зробити висновок, що фармацевтичний ринок України не є достатньо заповненим даними лікарськими засобами.

Для розрахунку річної потужності виробництва за основу візьмемо лікарський засіб ПІОФАГ БАКТЕРІОФАГ ПОЛІВАЛЕНТНИЙ, розчин по 20 мл у скляному флаконі; по 4 флакони в контурній чарунковій упаковці.

Піофаг - бактеріофаг полівалентний у складі містить діючої речовини: у 1 мл специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^5 фагових часток: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* [2].

Допоміжні речовини: натрію хлорид; магнію хлорид гексагідрат; натрію гідроксид; кислота хлористоводнева розведена; вода для ін'єкцій [2].

Показання для застосування:

Розчин «Піофаг» показаний при лікуванні та профілактиці таких захворювань, як:

- Шигельоз;
- Сальмонельоз;
- Дисбактеріоз;
- Ентероколіт, коліт інфекційної природи, змішаної етіології.

Спосіб застосування:

Препарат призначений для внутрішнього застосування. З лікувальною метою бактеріофаг приймають перорально 4 рази на день за годину до їди. Тривалість лікування 7-10 діб. Особам від 8 років внутрішньо за 1 прийом 30 мл [2].

Дисбактеріоз кишечника, на підставі оцінки ВООЗ, захворюванням насправді не є, тому більш точним буде його прилучення до синдромів. Дисбактеріоз кишечника, симптоми якого виникають на тлі порушення балансу співвідношення різних мікроорганізмів у кишечнику, є, на думку

вчених, результатом різного типу патологій, але не їх причиною. Порушення мікрофлори внаслідок дисбактеріозу є змішаними за своїм характером, проте найчастіше їх прояв провокується процесом придушення мікробного анаеробного компонента (лактобацил, біфідобактерій), а також збільшенням чисельності на тлі актуальних в такій ситуації мікроорганізмів умовно-патогенного типу [4].

Причиною розвитку дисбактеріозу є тривале антибактеріальне лікування. Переважно курси антибіотиків до дисбактеріозу не призводять, якщо тільки мова йде про стандартні схемах їх прийому, крім того, якщо антибіотики і стають причиною цього синдрому, то проходить він незабаром мимовільно. Причиною тому є заселення кишечника нормальною мікрофлорою, що відбувається слідом за завершенням курсу. Ця мікрофлора, у свою чергу, витісняє бактерії, що опинилися нечутливими до впливу уживаних антибіотиків [4].

Крім цього можна виділити наступні причини дисбактеріозу з актуальною при них загибеллю бактерій:

- відсутність можливості нормального просування по кишечнику харчових мас на тлі зниженого тонуусу кишечника або спазмів його гладких м'язів в результаті стресів, вегетосудинної дистонії, перенесення хірургічного втручання та ін..;

- при зміні мікроклімату (збільшення його лужності або кислоти) з відповідною зміною обміну речовин в комплексі з мембранами корисних бактерій, що має на увазі хвороби кишечника, виразкову хворобу, гастрит, панкреатит, гепатит, холецистит та ін;

- при нестачі в раціоні необхідної кількості речовин, які у ролі субстрату для наступного зростання корисного типу мікробів, а також за наявності в ньому речовин, що провокують їх знищення, що відбувається в результаті посилених дієт, брак клітковини і кисломолочних продуктів, вживання консервантів;

- при наявності паразитів в кишечнику, в якості яких можуть зокрема виступати найпростіші та глисти, а також за наявності хвороботворних мікробів, що виділяють такого типу речовини, в результаті впливу яких гинуть корисні мікроби (гельмінтози, сальмонельоз, лямбліоз, дизентерія та ін) [4];

Враховуючи те, що часто дисбактеріоз розвивається під впливом безлічі різних причин, лікування цього захворювання має бути неодмінно комплексним. Лікувальну тактику визначають особливості супутнього захворювання, дисбактеріоз спровокував, а також особливості симптоматики, переважаючою при цьому синдромі. Основні заходи лікування зводяться до наступного:

- призначення дієти, зміна пацієнтом способу життя;
- усунення тими чи іншими заходами надлишкового росту патогенної мікрофлори в кишечнику;
- забезпечення імплантації корисною для організму мікрофлори;
- розробка заходів, орієнтованих на підвищення імунітету, що саме по собі покликане забезпечити нормальну (природну) мікрофлору в кишечнику [4].

Згідно статистичних даних, станом на 2023 рік близько 2,2 млн людей в Європі (приблизно 10 млн. в усьому світі) страждають на запальні захворювання кишечника (дисбактеріоз, ентероколіт, коліти інфекційної та змішаної етіології) [5].

Доза для хворих: 20 мл

Курс лікування: 4 рази на добу протягом 10 днів.

Потреба на курс:

$P_{\text{дт}} = 4 \text{ дз} \times 20 \text{ мл} \times 10 \text{ дн} \times 2\,200\,000 \text{ хв} = 1\,760\,000 \text{ л}$

Узагальнені дані про потребу населення Європи у препараті бактеріофага для лікування хвороб органів травлення (дисбактеріози, ентероколіти) наведено у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Захворювання	Доза препарату, мл	Кількість прийомів на добу	Тривалість прийому, днів	Кількість хворих за 2023 р.	Кількість на 1 людину, мл	Загальна необхідна кількість бактеріофага, л
Дисбактеріоз, ентероколіти	20	4	10	2200000	800	1 760 000

3.3 Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ, потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції, розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік

Згідно з попередніми розрахунками, потреба у препараті бактеріофага для лікування хвороб органів травлення становить 1 760 000 л.

З попередніх розрахунків був обраний біологічний агент *Escherichia coli*, продуктивність утворення бактеріофагів Т4 становить $1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл = $1,2 \times 10^{19}$ БУО/л культуральної рідини (Sochocka, Tomczyk, Sobczynski, Szermer-Olearnik, Boratyński, 2015).

Плануємо, що дану кількість бактеріофагів будемо виробляти $T_{рд}=171$ робочих трудовнів. Тривалість виробничого циклу $T_{ф}=24$ год.

Враховуючи всі економічні фактори, обраховуємо потребу у бактеріофагах Т4 *Escherichia coli* не більше 5%.

Тому, потужність виробництва для виготовлення готового продукту складе:

$$G_{нт}=1\,760\,000 \times 0,05 = 88\,000 \text{ л.}$$

Згідно з ТЕО потреба у препараті бактеріофагах *E. coli* складає $G_{нт}=88\,000$ л; введемо умову, що дану кількість фагів необхідно виробити за $T_{рд}=171$ трудовдень.

Щоб провести наступні розрахунки наведемо наступні початкові дані: $T_{цф}=T_{ф}+T_{по}=24+10,5=34,5$ год – час циклу роботи ферментера, де $T_{ф}$ -час культивування, а $T_{по}$ - час для проведення підготовчих операцій. Врахуємо такі етапи як можлива втрата культуральної рідини або посівного матеріалу

від нестерильних операцій (коефіцієнт запасу) $K_1=1,1$. Сумарні втрати при одержанні готового продукту $E_{св}=0,02$.

Кількість готового продукту на добу ($G_{нтл}$) дорівнює:

$$G_{нтл} = G_{нт} / T_{рд} = 88\,000 \text{ л} / 171 = 515 \text{ л/добу}.$$

Кількість культуральної рідини за цикл:

$$G_{цк} = G_{нтл} \cdot T_{цф} / 24 = 515 \cdot (34,5 / 24) = 742 \text{ л/цикл}.$$

Для подальшого розрахунку об'єму культуральної рідини необхідно визначити скільки необхідно внести посівної культури *E. coli* для одержання $1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл бактеріофага Т4.

Для виготовлення препарату вимірювання концентрації клітин проводять використовуючи стандарт каламутності Мак-Фарланда для подальшого розрахунку завантаження сері, за формулою:

$$A = \frac{(25 \times 10^9)}{(0,9 \times 10^9) \times B},$$

де, А – розрахункова кількість посівної культури,

В – розведення вихідної суспензії посівної культури

$$A = \frac{(25 \times 10^9)}{(0,9 \times 10^9) \times 5 \times 10^{-7}} = 50 \times 10^6 \text{ КУО / мл},$$

При додаванні 50×10^6 КУО/мл *E. coli* одержують не менше 1×10^9 бактеріофових часток. Після аналізу наукових праць, обрано найкращого біологічного агента *E. coli*, який завдяки оптимізації процесу культивування та підбору оптимального поживного середовища продукує $1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл. За аналогією розраховуємо кількість посівної культури для отримання необхідної кількості фагів.

$$X = \frac{(5 \times 10^7 \text{ КУО / мл} \times 1,2 \times 10^{16} \text{ БУО / мл})}{1 \times 10^9 \text{ БУО / мл}} = 6 \times 10^{14} \text{ КУО / мл}$$

Отже, для одержання $1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл бактеріофагів Т4 необхідно внести 6×10^{14} КУО/мл культури *E. coli*.

Щоб надалі коректно порахувати об'єм культуральної рідини, переводимо КУО/мл на г/л, шляхом розрахунку теоретично можливої біомаси виходячи з кількості азоту в середовищі культивування. Джерелом азоту в нашому середовищі є гідролізат казеїну (білок молока). Формула сполуки $C_{81}H_{125}N_{22}O_{39}P$. Молекулярна маса – 2060 г/л. Отже, у 2060 г казеїну міститься 308 г азоту, а в 3 г дорівнює $(3 \times 308) / 2060 \approx 0,5$ г. Якщо у біомасі наявно 10% азоту, то з 0,5 г азоту можна отримати 5 г/л біомаси.

Обчислюємо об'єм концентрату бактеріофагів, який отримуємо, за один цикл культивування, враховуючи втрати при виділенні готового продукту, і втрати під час проведення нестерильних операцій.

$$V_{кб} = K_1 \cdot G_{цк} \cdot C_{Р_{гп}} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,1 \cdot 742 \cdot 0,1 / 5 (1 - 0,02) \approx 20 \text{ л}$$

Геометричний об'єм ферментера з коефіцієнтом заповнення $K_3 = 0,6$:

$$V_{гф} = V_{кб} / K_3 = 20 / 0,6 = 33,3 \text{ л}$$

Отже, приймаємо геометричний об'єм ферментера 40 л.

Потужність виробництва складає 88 000 л готового препарату на рік. Обчислюємо кількість флаконів, враховуючи об'єм наповнення 20 мл отримуємо:

$$N_{ф} = G_{нт} / V_{фл} = 88\,000\,000 \text{ мл} / 20 = 4\,400\,000 \text{ фл/рік}$$

Плануємо за одну серію препарату випускати 10 000 фл, тому кількість серій на рік дорівнює:

$$N_{ср} = N_{ф} / 10\,000 = 4\,400\,000 / 10\,000 = 440 \text{ серій/рік.}$$

Для виготовлення однієї серії готового препарату необхідно 2 л концентрату бактеріофагів, а для виготовлення 440 серій необхідно:

$$V_{кб} = N_{ср} \cdot 2 \text{ л} = 440 \cdot 2 = 880 \text{ л/рік.}$$

Під час одного циклу культивування одержуємо 20 л концентрату, щоб отримати 880 л:

$$N_{цк} = V_{кб} \cdot 1 \text{ цикл} / 20 \text{ л} = 880 \cdot 1 \text{ цикл} / 20 = 44 \text{ цикли/рік}$$

Об'єм культуральної рідини, яку необхідно виготовити за рік:

$$V_{кр} = G_{цк} \cdot N_{цк} = 742 \cdot 44 = 32\,648 \text{ л}$$

Даний концентрат об'ємом 20 л вирішуємо використовувати для одержання готового продукту по мірі необхідності. Для даного проєкту, плануємо з одержаного концентрату об'ємом 20 л, для виготовлення однієї серії готового лікарського засобу використовувати по 2 л концентрату. Концентрат розфасовується у стерильні ємності по 2 л та зберігається в них для застосування безпосередньо при виробництві серії.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування стадій виділення та очищення цільового продукту

Для одержання ефективного, безпечного та якісного лікарського засобу, необхідно підібрати та обґрунтувати всі технологічні операції.

БАКТЕРІОФАГИ (лат. *bacmetio* — паличка, бактерія + *phagein* — пожирач) — віруси, адаптовані до паразитування на бактеріях, які спричиняють їх розчиненню (бактеріоліз). За хімічною будовою бактеріофаги складаються з двох основних хімічних компонентів — нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) і білка. Препарати вірулентних бактеріофагів використовують для лікування і профілактики гострих кишкових інфекцій, а також гнійно-септичних і ентеральних захворювань різної локалізації, викликані умовно патогенними бактеріями декількох родів (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* та ін.). Їх призначають для обробки ран, вводять у порожнини тіла (черевну, плевральну, пазухи носа, середнього вуха), внутрішньо. Вони є альтернативою антибіотиків та інших хіміотерапевтичних препаратів, іноді перевищують їх за ефективністю, не викликаючи побічних токсикоалергічних реакцій. Внаслідок суворої родо- і видоспецифічності бактеріофаги не пригнічують нормальну мікрофлору кишечника і, як наслідок, нездатні спричинити дисбактеріоз; вони не мають протипоказань до застосування і використовуються для лікування дітей раннього віку та вагітних, а також у комплексній терапії разом з іншими лікувальними препаратами [6].

Лікарський препарат «Піофаг» бактеріофаг полівалентний має імунобіологічні та біологічні властивості. Препарат має здатність специфічно

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата							
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми			Літ.	Арк.	Акрушів	
Перевір.		Стабніков В.П.								58	129
Консультант								Кафедра БТМ ₅₉			
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									

лізувати такі бактерії, як *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*. Бактеріофаги специфічно вражають бактеріальні клітини, розмножуються всередині бактеріальної клітини та руйнують її шляхом лізису. Антибактеріальний ефект препарату зумовлений специфічним лізисом патогенних бактерій, при цьому препарат не порушує стан нормальної мікрофлори. Під дією бактеріофага відбувається активація фагоцитозу, підвищується активність нейтрофілів та їхня метаболічна активність, що перешкоджає появі рецидиву інфекційного захворювання та хронізації запального процесу. Знижується кількість лейкоцитів і нейтрофілів, а рівень лімфоцитів підвищується переважно за рахунок Т-лімфоцитів. Бактеріофаги протягом короткого часу проникають в кров та лімфу і виводяться нирками з сечею [7].

Лікарська форма препарату має вигляд прозорого розчину у скляних флаконах закупорених гумовою пробкою та закатаних алюмінієвим ковпачком. Об'єм розчину у флаконах 20 мл. Препарат приймають 4 рази на добу протягом 10 днів [7].

Отже, узагальнюючи все вищесказане, кінцева продукція даного теоретичного проекту є готовою лікарською формою, тому найкраща схема виділення бактеріофагів включає такі стадії: фільтрація фагів від лізату, зберігання концентрату, приготування розчину (розведення концентрату бактеріофагів та додавання допоміжних речовин) та стерилізуюча фільтрація, наповнення та закупорювання флаконів.

4.2. Вибір способу відокремлення бактеріофагів від лізату

Виробництво бактеріофагів включає в себе ряд заходів, які розроблені з метою одержання якісного лікарського засобу. На першому етапі відбувається дослідження клітин-господарів та їх фагів, створення клітинних та фагових банків, підготовка інокулюму (клітина і фаг) та культивування і зараження клітин. Далі проводять операції необхідні для очищення фагів до точки де виконуються стадії для отримання розчину для виготовлення

готового лікарського засобу (João, Lampreia, Prazeres, & Azevedo, 2021).
Загальна схема культивування та одержання бактеріофагів наведена на рис.4.1

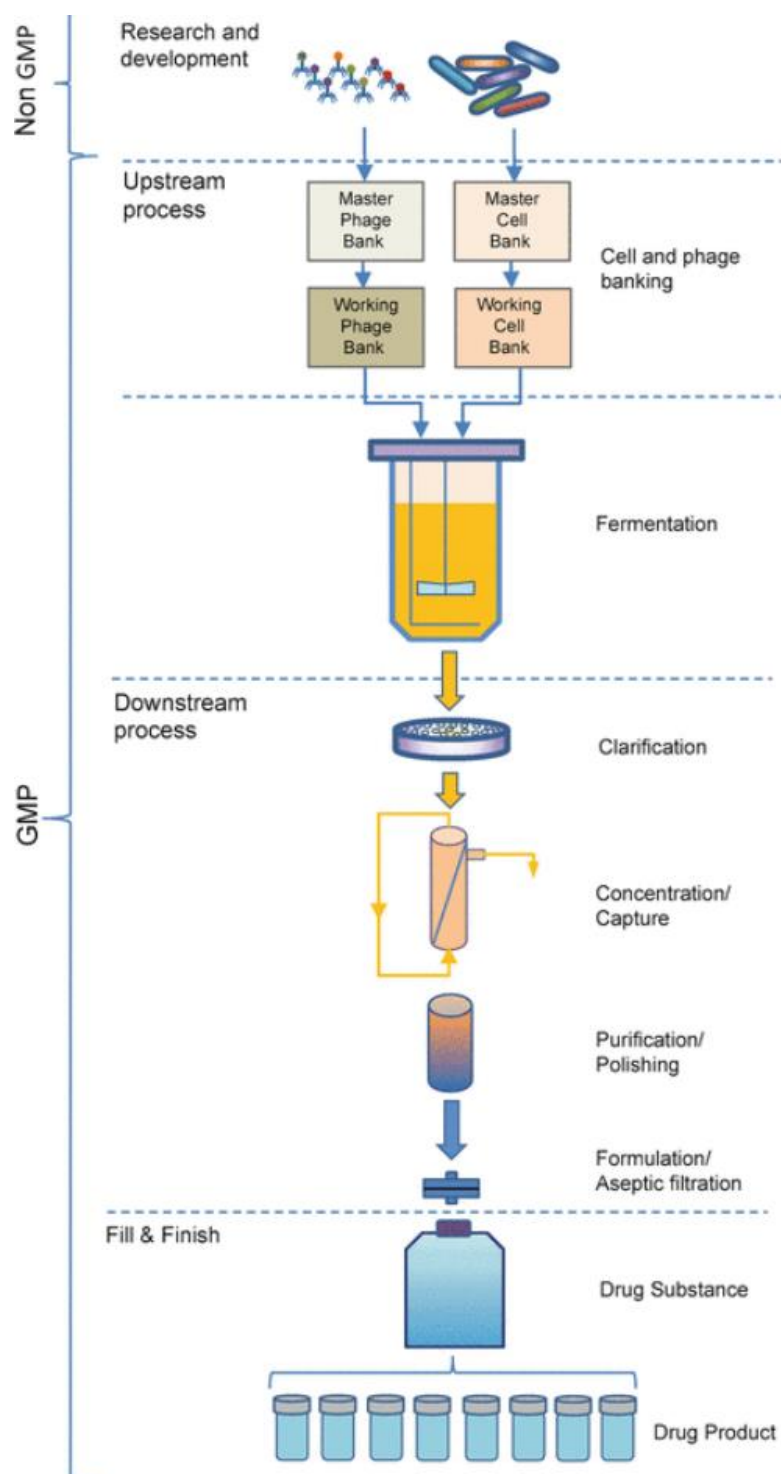


Рис. 4.1. Загальна схема одержання бактеріофагів та їх ЛЗ

Дослідження та застосування бактеріофагів вимагають очищення фагової суспензії.

Препарати бактеріофагів отримують промислово шляхом накопичення їх біомаси та подальшого очищення. При отриманні біомаси бактеріофагів перевагу віддають використанню способу періодичного динамічного культивування на клітинах популяції штамів продуцентів фагів, що перебувають у стадії експоненціального росту. Встановлено, що лімітувальними для росту біомаси фагів факторами є фаза розвитку та концентрація бактеріальних клітин, ступінь аерації культурального середовища, вміст у середовищі глюкози та вміст амінокислот (валіну, тирозину та кофактора адсорбції – триптофану), а також рівень амінного азоту (Жмінко, Федченко, & Зінов'єва, 2015).

Ступінь очищення фагових препаратів залежить від мети застосування лікарського засобу. Присутність токсинів у лізаті (прозапальний ліпополісахарид ЛПС) можуть спричинити побічні ефекти. Для відносно невеликих об'ємів неочищеного фагового лізату (<10 літрів), вибір способів очищення залежить від двох факторів: бажаної чистоти і бажаної кількості продукту (Gill, Jason & Hyman, Paul, 2009).

Після отримання бактеріофагів необхідна попередня обробка, щоб зібрати фаги з лізату. Після лізису клітини фаги можна зібрати, додавши буфер безпосередньо до лізату. Деякі науковці використовують обробку лізату невеликими кількостями хлороформу (0,1-1%), тільки в тому випадку якщо фаги не чутливі до даної речовини (Adriaenssens та ін., 2012). Це служить для ізоляції фага, хоча він має потенціал для інактивації ниткоподібних і ліпидовмісних фагів (Hyman, 2019). Загальною проблемою неочищеного лізату є наявність нуклеїнових кислот, що збільшує в'язкість лізату пропорційно концентрації біомаси (Regulski, Champion-Arnaud, Gabard, 2018).

Неочищений лізат можна обробити за допомогою комбінації центрифугування, мікрофільтрації та осадження або розділення за градієнтом щільності, але недоліком цих способів є вплив необробленого лізату на хроматографію та фільтрацію буде шкідливим для роботи обладнання. Після

того, як лізат буде сконцентрований і залишки клітини-господаря зменшаться, можна застосувати більш чутливі процедури, такі як хроматографія та спеціальні типи фільтрації (Gill, Jason & Hyman, Paul, 2009).

Не всі методи очищення є достатньо надійними, щоб відокремити клітинний лізат від бактеріофагів. Деякі з найпоширеніших методів очищення є простими, економічно ефективними та добре охарактеризованими. До них відносяться осадження поліетиленгліколем, центрифугування в градієнті хлориду цезію та фільтрація (Carroll-Portillo та ін., 2021).

Метод осадження ґрунтується на використанні при титруванні реакцій, які супроводжуються утворенням малорозчинних сполук. Реакції осадження в об'ємному аналізі використовують порівняно рідко і лише ті, які відповідають цілому ряду вимог.

Осадження можна використовувати замість центрифугування для очищення фагів. Відомий метод очищення включає осадження поліетиленгліколем (ПЕГ). Метод осадження ПЕГ є простим і недорогим способом концентрації фагів, проте, часто не вдається отримати достатньо чисті фагові препарати. Осадження можна покращити для використання з фагами шляхом підвищення надійності процесу та ідентифікації нетоксичних сполук для застосування у фармацевтичному виробництві. Виявилось, що деякі фаги погано реагують на відцентрові сили, на взаємодію з хлоридом цезію — у гіршому випадку фаги можуть бути інактивовані мінеральною сіллю (Wolf, Reichl, 2011; Gill, Jason & Hyman, Paul, 2009).

Метод центрифугування CsCl_2 може зменшити активність фагів (Carroll-Portillo та ін., 2021). CsCl -ультрацентрифугування дає високоочищену суспензію фагових частинок, але сам процес проводиться дуже складно, вимагає багато часу, дорогий і не підходить для очищення промислових обсягів. Крім того, деякі фаги не можуть бути очищені цим методом через їх нестабільність у високоосмотичному середовищі та щільні

градієнти CsCl. Осадження можна покращити для використання з фагами шляхом підвищення надійності процесу та ідентифікації нетоксичних сполук для застосування у фармацевтичному виробництві (Wolf, Reichl, 2011; Gill, Jason & Hyman, Paul, 2009).

Для більш кращого очищення рекомендується освітлений лізат обробити за допомогою більш тонких методів очищення таких як фільтрація та хроматографія.

Фільтрацію фагів можна проводити з різними розмірами пор. Мембрани 0,45 мкм ефективні для видалення неінфікованих або стійких до фагів бактерій (Mullan, 2021). Ультрафільтрацію (УФ) застосовують для видалення білків клітин-господарів та їх ДНК, видалення ентеротоксинів та ендотоксинів, які можуть бути шкідливими для організму людини. Таким чином ультрафільтрацію можна застосовувати для концентрації вірусу та видалення клітинних фрагментів і пошкоджених вірусів (Wickramasinghe, Bower, Chen, Mukherjee, & Husson, 2009). Ультрафільтрація може бути використана в процесі створення фагового лікарського продукту. Одним із способів використання цієї операції є концентрація фага до або після етапу очищення. УФ було додано як частину протоколу виготовлення та підготовки фага для терапії (Luong, Salabarria, Edwards & Roach, 2020).

Метод очищення хроматографією. Відокремлення фагів від білків клітини-господаря та інших сторонніх молекул залежить від взаємодії фага зі стаціонарною фазою колонки (Wolf, Reichl, 2011).

Іонообмінна хроматографія фагів залежить від їх заряду — оскільки головка і хвіст заряджені протилежно один одному, можна використовувати певні іони для зв'язування головки або хвоста (Kramberger, Honour, Herman, Smrekar & Peterka, 2010). Очищення фагів за допомогою аніонообмінної хроматографії показало, що цей метод забезпечує швидкість відновлення, подібну до такої при використанні ультрацентрифугування в градієнті щільності CsCl₂, але завершується за коротший період часу (Monjezi, Teu, Sieo, Tan, 2010). Швидкість відновлення за допомогою цього методу може

покращитися за допомогою відповідних модифікацій протоколу для конкретного фага, оскільки було показано, що різні фаги потребують різних коригувань у протоколі для цього методу (Smrekar, та ін., 2011). Час, заощаджений у цьому процесі, може прирівнюватися до грошей, збережених у виробничих умовах. Було показано, що цей метод працює з десятьма і більше різними фагами та може забезпечити вищий вихід титру у більшому масштабі порівняно з методом CsCl_2 , а через можливість повторного використання колонки довгострокові витрати можна зменшити за допомогою повторного використання тієї самої колонки (Adriaenssens та ін., 2012; Vandenheuvel, Rombouts, Adriaenssens, 2018). Нещодавно компанією BiaSeparations була розроблена та виготовлена великомасштабна аніонообмінна колонка, яку можна використовувати для захоплення фагів. Швидкість відновлення фагів за допомогою цього методу, становить 10%–30%, що вказує на те, що в метод можна внести зміни для покращення та підвищення рівня (Jiang, та ін., 2012). Цей тип колонки також використовувався для очищення багатьох різних типів вірусів. Протокол аніонообмінної хроматографії був написаний для очищення фагів з наміром стати альтернативою для очищення фагів градієнтом щільності CsCl_2 і використовуватися в багатьох масштабах (Vandenheuvel, та ін., 2013).

Монолітна хроматографія також може служити альтернативою методам на основі смоли. Через розмір фагів вони потенційно можуть потрапити в порожні об'єми (або в частинки смоли), що є значним недоліком даного способу. Монолітна хроматографія складається з одного пористого моноліту, який можна модифікувати для включення інших типів хроматографії, таких як аніонний обмін або зв'язування ліганду. Пори в моноліті можуть бути зарядженими або містити ліганди, які можуть зв'язувати фаг і полегшувати його ізоляцію.

Взявши до уваги все вищесказане, можемо зробити висновок, що більшість з описаних методів очищення бактеріофагів від лізату використовуються при масштабному виробництві. Так, як препарат

приймається перорально, вирішуємо проводити очистку у два етапи. Для даного проекту (об'єм концентрату 20 л) рекомендовано провести попередню фільтрацію концентрату через фільтри з розміром пор 1-1,2 мкм, під час чого відфільтровується лізат, далі застосувати ультрафільтрацію для кращого ступеня очищення, а далі очищений концентрат бактеріофагів поступає на стадію додавання консерванту хіноліну сульфату.

Хінолін сульфат – антимікробний консервант. Антимікробні консерванти – це речовини, додані до фармацевтичних препаратів для запобігання мікробної проліферації або для обмеження мікробного забруднення, яке може виникнути під час умов зберігання та використання лікарського засобу. Вони використовуються в основному в багатодозових парентеральних, оральних, назальних, місцевих, вушних та очних препаратах [8].

4.3. Обґрунтування кінцевої форми та упаковки вибору форми випуску лікарського засобу (ЛЗ)

Останнім етапом очищення розчину бактеріофагів є стерилізуюча фільтрація, далі необхідно визначитися з лікарською формою цільового продукту.

Лікарська форма — проміжний стан лікарських і допоміжних речовин у процесі виготовлення лікарського препарату, який забезпечує оптимальний (з погляду фармакокінетики) терапевтичний ефект при мінімальній побічній дії та зручність при його застосуванні та зберіганні [9].

У повсякденній медичній практиці використовуються найрізноманітніші лікарські форми з урахуванням стану хворого, його віку та інших чинників. Однак, протягом тривалого часу при розробленні ліків, їх виробництві та призначенні головна увага приділялась не виду, а лікарській субстанції та її дозі у лікарському препараті. Лікарська форма розглядалась як більш-менш зручне вмістилище, що забезпечує збереження та доставку субстанції до місця всмоктування і є досить зручною для хворого. Після встановлення впливу фармацевтичних чинників на терапевтичну

ефективність ліків була переглянута і значимість лікарської форми. Експериментально-клінічні дослідження довели, що вид лікарської форми може суттєво впливати на ступінь абсорбції лікарської речовини та її концентрацію в біологічних рідинах [9].

Необхідність переведення препарату в лікарські форми:

1. Точна доза.
2. Захист (таблетки, вкриті оболонкою, запаяні ампули).
3. Захист від шлункового соку.
4. Маскування смаку та запаху (зробити приємними).
5. Розміщення ліків у тканинах організму.
6. Ліки пролонгованого вивільнення.
7. Ліки з контрольованим вивільненням.
8. Оптимальна дія препарату.
9. Введення ліків у порожнини тіла (ректальні, вагінальні)
10. Використання бажаного наповнювача для нерозчинних ліків [10].

За класифікацією з урахуванням шляхів введення ліків лікарські форми поділяються на:

- ентеральні, що вводяться через ШКТ, а саме: пероральні (таблетки, капсули, драже, гранули, порошки, мікрокапсули, розчини, суспензії, емульсії, настої, відвари, настойки, сиропи, желе та ін.) та сублінгвальні (таблетки, капсули, драже, порошки, таблетки для жування, розчини тощо);
- парентеральні, що вводяться не через ШКТ, а у вигляді ін'єкцій (розчини, порошки і таблетки для отримання розчинів, суспензії та емульсії для ін'єкцій, ліпосомальні системи, таблетки і капсули для імплантацій та ін.);
- ректальні (супозиторії, капсули, мазі, піно- та плівкотвірні аерозолі, розчини, суспензії, емульсії у вигляді мікроклізм і зрошення);

- для нанесення на слизові оболонки: вагінальні (кульки, песарії, мазі, таблетки, розчини, емульсії тощо) та очні (краплі, мазі, плівки, розчини для зрошування та ін.);
- уретральні (палички);
- для нанесення на шкіру (мазі, креми, гелі, пасти, порошки, пінні та плівкотвірні аерозолі тощо) [9].

Класифікація лікарських форм за агрегатним станом є зручною з погляду вивчення технології ліків і традиційно використовується в навчальній літературі [9].

За цією класифікацією лікарські форми поділяють на:

- тверді (таблетки, драже, гранули, порошки, збори, капсули та ін.);
- м'які (мазі, креми, гелі, супозиторії, пластирі та ін.);
- рідкі (різні розчини, суспензії, емульсії, настої, відвари, настойки, екстракти та ін.);
- газоподібні (аерозолі, гази, пари тощо) [9].

Рідкі лікарські форми (РЛФ)- це лікарські препарати, що отримують шляхом змішування або розчинення лікарських речовин у розчиннику, а також шляхом витягу діючих речовин з рослинного матеріалу. За фізико-хімічною природою істинні розчини представляють собою вільні, всебічно дисперсні системи, в яких тверда, рідка або газоподібна лікарська речовина є дисперсною фазою, що рівномірно розподілена у рідкому дисперсійному середовищі- розчиннику [11].

Переваги РЛФ перед іншими лікарськими формами:

- Оптимальний ступінь дисперсності часток лікарської речовини, яка розчинена або рівномірно розподілена у розчиннику, що суттєво впливає на терапевтичну дію лікарської речовини;
- РЛФ відрізняються різноманітністю складу і способами їх застосування;
- Зменшують подразнюючу дію деяких лікарських речовин;
- Маскування неприємного смаку і запаху лікарських речовин;

- При пероральному прийомі РЛФ всмоктуються і діють швидше, ніж тверді лікарські форми;
- М'яка і обволікаюча дія ряду лікарських речовин найбільш повно проявляється у випадку, коли вони перебувають саме в РЛФ;

Недоліки РЛФ перед іншими лікарськими формами:

- Менш стабільні при зберіганні, тому в розчиненому вигляді речовини є більш реакційно здатними;
- Розчини швидше піддаються мікробіологічному псуванню, тому у них відповідно обмежений термін зберігання-не більше 10-ти діб;
- Деякі з них є трудомісткими і вимагають спеціального обладнання та відповідного посуду для їх виготовлення, незручні при транспортуванні;
- Поступаються за точністю дозування іншим лікарським формам, тому що дозуються ложками і краплями [11].

Беручи до уваги те, що бактеріофаги не можуть бути ні в якій іншій лікарській формі окрім рідини, визначаємо, що лікарська форма нашого препарату – розчин.

Обравши лікарську форму, необхідно визначитися з первинною і вторинною упаковкою майбутнього лікарського засобу.

Первинна упаковка – це упаковка, яка невіддільна від лікарських засобів до моменту їх використання. Вона контактує з медикаментами, а тому одне з головних умов – стерильність. Основні функції первинної тари укладені в забезпеченні необхідних умов при транспортуванні і зберіганні ліків. Вона повинна бути: газо- і паронепроникною, міцною, вологостійкою, хімічно неактивною по відношенню до компонентів препарату [12].

Також при виборі первинної упаковки необхідно враховувати наступні параметри:

- стійкість до температурних перепадів;
- світлонепроникність;

- бар'єрну стійкість до проникнення мікроорганізмів.

Якщо матеріал володіє зазначеними вище характеристиками, то ліки будуть збережено протягом всього терміну придатності. Також тара повинна бути практичною і зручною у використанні, мати привабливий дизайн, містити інформацію про дату виготовлення, способи застосування медикаменту. Вона виконується з різних матеріалів, що забезпечують дотримання певних умов [12].

Для кожної форми лікарського засобу передбачена певна тара, яка збереже його властивості. Матеріали, використовувані для упаковки медикаментів, повинні бути дозволені до застосування (Краснопольський, Пилипенко, 2020).

Контейнер для фармацевтичного використання являє собою виріб, який містить продукцію. Закупорювальний пристрій є частиною контейнера. Контейнер сконструйований таким чином, щоб із нього можна було вилучити лікарський засіб способом, зазначеним в інструкції із застосування. Контейнер забезпечує різний ступінь захисту залежно від природи лікарського засобу і ризиків з боку навколишнього середовища, повинен приводити до мінімальних втрат компонентів лікарського препарату. Між контейнером та його вмістом не повинно відбуватися хімічної або фізичної взаємодії, що призводить до зміни якості лікарського засобу відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ) та інших нормативних документів (НД) (Краснопольський, Пилипенко, 2020).

Існує кілька характеристик контейнерів відповідно до вимог ДФУ:

- одноступінчастий контейнер, який містить кількість лікарського препарату, призначену для одноразового введення;
- багаступінчастий контейнер, який містить дві або більше доз лікарського препарату;
- щільно закупорений контейнер, який захищає вміст від забруднення ззовні твердими частинками і рідинами, а також

захищає від втрат вмісту контейнера при використанні, зберіганні та транспортуванні в звичайних умовах;

- повітронепроникний контейнер, непроникний для твердих речовин, газів і рідин при використанні, зберіганні та транспортуванні в звичайних умовах;
- якщо контейнер повинен відкриватися більше одного разу, він повинен бути сконструйований таким чином, щоб після повторного закупорювання зберігалась повітронепроникність;
- герметично закупорений контейнер, закупорений за допомогою розпалення матеріалу контейнера;
- контейнер з контролем першого розкриття ;
- закритий контейнер, забезпечений пристроєм контролю розкриття контейнера;
- контейнер, захищений від дітей закритий контейнер, забезпечений системою закупорювання, яка виключає розкриття контейнера дітьми (Краснопольський, Пилипенко, 2020).

З огляду на те, що кінцевою формою даного лікарського засобу є розчин, розглянемо вибір відомих контейнерів, які застосовуються для зберігання рідких лікарських засобів.

Скляні контейнери для фармацевтичного використання являють собою вироби зі скла, які безпосередньо контактують з лікарськими препаратами. Існує кілька видів скляних контейнерів:

Ампули – тонкостінні скляні контейнери різної ємності (1, 2, 3, 5, 10, 20 і 50 мл), які після наповнення продукцією герметизують запаюванням. Ампула складається з розширеної частини корпусу та одного або двох капілярів, які служать для наповнення і вилучення вмісту ампул [13].

Флакони, пляшки, шприци і карпули- контейнери з різною товщиною стінок, контейнери з пробками зі скла або іншого матеріалу, наприклад, пластичних матеріалів або еластомерів. Вміст можна вилучати окремими порціями за один або кілька разів [13].

Флакони - це споживча тара з плоским або увігнутим дном, з корпусом різноманітної форми, що різко переходить до горловини, діаметр вінця якої значно менший за діаметр описаного кола корпуса і передбачає закупорювання кришкою, корком. Бувають скляні та полімерні [13].

Існують такі різновиди флаконів:

- Флакон зі скломаси з циліндричним корпусом, конусною горловиною і притертою пробкою (ФП)— має 10 типорозмірів номінальною місткістю від 30 до 5000 мл.
- Флакон зі скломаси з гвинтовою горловиною (ФВ) — має 18 типорозмірів номінальною місткістю від 5 до 3000 мл.
- Флакони зі складроту: флакон для інсуліну (ФМ) — має 2 типорозміри (5 і 10 мл); флакон загального призначення (ФО) — має 5 типорозмірів (10, 15, 20, 25, 30 мл) [13].

Якість скла.

Безбарвне скло має високу світлопроникність у видимій області спектра. Забарвлене скло отримують додаванням невеликої кількості оксидів металів, підібраних відповідно до необхідного спектрального поглинання. Нейтральне скло являє собою скло, яке містить значну кількість бору або оксиду алюмінію, або оксидів лужноземельних металів. Завдяки своєму складу нейтральне скло характеризується високою термічною стійкістю і дуже високою гідролітичною стійкістю. Силікатне скло отримують на основі кремнію діоксиду, який містить оксиди лужних металів, переважно оксид натрію, і оксидів лужноземельних металів, переважно оксид кальцію. Завдяки своєму складу силікатне скло характеризується середньою гідролітичною стійкістю (Краснопольський, Пилипенко, 2020).

Для підвищення хімічної стійкості до складу скла вводять оксиди бору (B_2O_3) і алюмінію (Al_2O_3). Для збільшення термічної стійкості — оксид магнію (MgO). Введення до складу скла різних співвідношень бору, магнію та алюмінію підвищує ударну міцність і знижує крихкість (Краснопольський, Пилипенко, 2020).

Хімічна стабільність скляних контейнерів для фармацевтичного використання визначається гідролітичною стійкістю, тобто стійкістю до вивільнення розчинних мінеральних речовин у воду у визначених умовах контакту внутрішньої поверхні контейнера з водою. Гідролітична стійкість визначається шляхом титрування лугу, який виділяється у водний розчин. Такі характеристики, як лугостійкість і водостійкість, визначаються титриметрією, вимірюванням рН або використанням індикатора (оцінка зміни його забарвлення) (Краснопольський, Пилипенко, 2020).

Відповідно до гідролітичної стійкості скляні контейнери класифікуються так:

- контейнери зі скла I класу виготовлені з нейтрального скла і мають високу гідролітичну стійкість внаслідок складу самого скла;
- контейнери зі скла II класу зазвичай виготовлені із силікатного скла і мають високу гідролітичну стійкість внаслідок відповідної обробки поверхні скла;
- контейнери зі скла III класу виготовлені зазвичай із силікатного скла і мають помірну гідролітичну стійкість;
- контейнери зі скла IV класу виготовлені зазвичай із силікатного скла і мають низьку гідролітичну стійкість.

Контейнери зі скла I класу є придатними для всіх лікарських форм, призначених як для парентерального, так і для непарентерального використання, а також для людської крові та компонентів крові. Контейнери зі скла II класу є придатними для кислих і нейтральних водних лікарських препаратів для парентерального застосування. Контейнери зі скла III класу є придатними для неводних лікарських препаратів для парентерального застосування, для порошків для парентерального застосування, а також для лікарських препаратів для непарентерального застосування. Контейнери зі скла IV класу придатні для твердих лікарських препаратів, не призначених для парентерального застосування, а також для деяких рідких або м'яких

препаратів, не призначених для парентерального застосування (Краснопольський, Пилипенко, 2020).

Закупорювальні засоби.

Особливостями сучасних закупорювальних засобів є те, що крім зберігання продукції вони можуть виконувати роль і функціональних пристосувань. Закупорювальні засоби можна класифікувати кількома способами. За призначенням закупорювальні засоби бувають:

- з контролем першого розкриття;
- без контролю першого розкриття.

За конструктивними особливостями розрізняють такі види закупорювальних засобів:

- кришка - закріплюється по всьому зовнішньому периметру горловини;
- ковпачок - надягається або нагвинчується на вінчик горловини тари;
- пробка - вставляється всередину горловини тари;
- кронен-пробка - металевий ковпачок корончатої форми з ущільнювальною прокладкою, яка закріплюється по всьому зовнішньому периметру вінчика горловини пляшки;
- бушон - різновид кришки, яка нагвинчується на тубу;
- закупорювальний засіб з додатковим функціональним пристосуванням - засіб, який разом з закупорюванням тари виконує певні функції, пов'язані з розпиленням, дозуванням, намазуванням, розсіюванням лікарських засобів [13].

За матеріалом закупорювальні засоби бувають:

- скляні (пробки);
- пластмасові (кришки, пробки);
- гумові (пробки);
- металеві (ковпачки);

- коркові (пробки);
- комбіновані

З металевих закупорювальних засобів широке застосування як у заводській, так і в аптечній практиці знайшли алюмінієві закатувальні ковпачки, які зазвичай використовуються в комплекті з прокладками з пластмаси, картону з двостороннім поліетиленовим покриттям, пробками з поліетилену низької густини або гуми [13].

Пакувальні матеріали повинні мати певні фізико-хімічні властивості і відповідати цілому ряду споживчих властивостей. До них належать: механічна міцність, щільність, жорсткість, еластичність або м'якість, стійкість до дії медикаментів. Пакувальні матеріали повинні мати двосторонню або односторонню гладку поверхню, колір, блиск і прозорість у межах вимог до регламентованих нормативно-технічною документацією. Матеріали, що контактують з медикаментами, не повинні мати запаху [13].

Взявши до уваги все вищенаведене, обираємо як первинне пакування скляні флакони об'ємом 20 мл зі скла І класу, які закупорюються гумовою пробкою та закатуються металевим ковпачком. Роль вторинного пакування буде виконувати картонна упаковка.

Для виробництва якісної продукції необхідно дотримуватися вимог (GMP) Належної виробничої практики. До виробництва стерильної та нестерильної продукції висувають особливі вимоги з метою зведення до мінімуму ризику контамінації мікроорганізмами і пірогенними речовинами [14].

4.4. Обґрунтування необхідних умов виробництва (класів чистоти)

До виробництва стерильних лікарських препаратів висувають такі загальні вимоги:

1. Стерильну продукцію необхідно виробляти в чистих зонах, доступ у які персоналу і/або надходження обладнання, сировини і матеріалів має здійснюватись через повітряні шлюзи. Чисті зони слід обслуговувати таким

чином, щоб вони відповідали стандарту чистоти; в них необхідно постачати повітря, що пройшло крізь фільтри відповідної ефективності.

2. Операції з підготовки компонентів первинного пакування, виготовлення продукції та дозування мають здійснюватися в окремих зонах чистої зони. Виробничі операції діляться на дві категорії: продукція остаточно стерилізується в первинному пакуванні; операції виконуються в асептичних умовах на декількох або всіх стадіях.

3. Чисті зони для виробництва стерильної продукції класифікуються відповідно до їх характеристик згідно з вимогами GMP та потреб відповідного рівня чистоти приміщень, що їх оточують з метою зниження до мінімуму ризику можливої контамінації стерильної продукції, що виготовляється, мікроорганізмами чи частинками вихідних чи інших матеріалів. Ці зони мають бути спроектовані так, щоб забезпечувати чітко визначений рівень чистоти повітря в оснащеному стані. Оснащений стан чистого приміщення — це умова, за якої система повністю підготовлена, виробниче обладнання встановлене і придатне до роботи, але персонал відсутній. Функціонуючий стан чистого приміщення — це умова, за якої система й обладнання функціонують у встановленому режимі з визначеною кількістю працюючого персоналу. Для виробництва стерильних ЛП, як правило, виділяють чотири класи [14].

Клас А — локальна зона для операцій, при яких контамінація може становити високий ризик для якості продукції (зона дозування, закупорювання ємностей, відкривання ампул і флаконів, змішування в асептичних умовах). Такі умови забезпечуються ламінарним потоком повітря на робочому місці (рівномірна швидкість повітря 0,45 м/с $\pm$ 20%). **Клас В** — навколишнє середовище для зони класу А у разі виготовлення і дозування в асептичних умовах. **Клас С і D** — чисті зони для здійснення менш критичної стадії виробництва стерильної продукції [14].

Зони різних класів чистоти у функціонуючому стані необхідно контролювати за кількістю часток. При виконанні операцій в асептичних

умовах має проводитися частковий контроль із використанням таких методів, як седиментація на пластини, відбір проб з об'єму повітря та з поверхонь (за допомогою змивів із контактних пластин). Методи відбору проб, що використовують у функціонуючому стані, не повинні завдавати шкоди захисту зони. Результати контролю розглядаються при проведенні огляду документації протоколу серії для видачі дозволу на випуск готової продукції [14].

Виробництво нестерильних лікарських препаратів рекомендується здійснювати у приміщеннях класів частоти С і D або у приміщеннях, в яких не проводиться контроль на вміст часток і мікроорганізмів, за умови відсутності контакту відкритої продукції з навколишнім середовищем. Нормативи максимального рівня вмісту часток та мікроорганізмів у повітрі повинні витримуватися в усьому виробничому приміщенні, коли воно знаходиться в оснащеному стані, а максимально допустима кількість життєздатних мікроорганізмів — відповідати нормативним вимогам у повітрі робочої зони, коли приміщення знаходиться у функціонуючому стані [14].

Якщо існує підвищений ризик контамінації продукції з навколишнього середовища, наприклад, коли операція дозування відбувається повільно, або контейнери (первинні пакування) мають широке горло чи неминуче знаходяться відкритими більше декількох секунд перед герметизацією, наповнення слід здійснювати в зоні класу А з навколишнім простором принаймні класу С. Приготування і фасування мазей, кремів, суспензій і емульсій перед остаточною стерилізацією необхідно, як правило, здійснювати в навколишньому середовищі класу С. Роботу з компонентами (первинного пакування) після миття слід здійснювати в навколишньому середовищі принаймні класу D. Обробку стерильної вихідної сировини і компонентів, якщо в подальшому не передбачена стерилізація або стерилізуюча фільтрація, слід здійснювати в робочій зоні класу А з навколишнім середовищем класу В. Приготування розчинів, які під час технологічного процесу підлягають стерилізуючій фільтрації, слід проводити

в навколишньому середовищі класу С; якщо стерилізуюча фільтрація не проводиться, то підготовку матеріалів і виготовлення продукції необхідно здійснювати в робочій зоні класу А з навколишнім середовищем класу В. Проводити обробку і фасування продукції, приготовленої в асептичних умовах, слід в робочій зоні класу А з навколишнім середовищем класу В [14].

Отже, згідно GMP процес наповнення закупорювання та закатки флаконів відбуватиметься в зоні чистоти В(А), а процес маркування, пакування та відвантаження проводитимемо в некласифікованому приміщенні (н/к).

РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

**Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних
потоків по стадіях**

1. Обґрунтовано вибір таких післяферментаційних стадій:

ТП 2. Виділення та зберігання концентрату бактеріофагів

ТП 2.1. Виділення фаголізату

ТП 2.2. Ультрафільтрація

ТП 2.3. Внесення хіноліну сульфату та зберігання концентрату

ТП 3. Приготування розчину

ТП 3.1. Приготування розчину допоміжних речовин

ТП 3.2. Приготування розчину бактеріофагів

ТП 4. Фільтрація, наповнення та закупорювання

ТП 4.1. Стерилізуюча фільтрація, наповнення та закупорювання
флаконів

ТП 5. Інспектування

ТП 5.1. Інспектування на наявність видимих механічних включень

ПМВ 6. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 6.1 Маркування флаконів

ПМВ 6.2 Упаковка флаконів у коробки

ПМВ 6.3 Складання коробок з ЛЗ у гофрокороби

2. Вихідні дані:

а. Концентрація бактеріофагів у концентраті: $1,2 \times 10^{19}$ БУО/л

б. Об'єм концентрату: 2 л

**с. Втрати на стадіях виділення цільового продукту складають:
1,84%**

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Коваль Р.В.					78	129
Перевір.		Стабніков В.П.						
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ ₇₉		

d. Розрахунок завантаження серії:

- Розрахунок завантаження хіноліну сульфату:

$$X = \frac{T \times 0,0001 \times 100}{A}, \text{ де}$$

X – фактична кількість **хіноліну сульфату**, яка необхідна для завантаження, г;

T – теоретичний об'єм, мл;

0,0001 – вміст 100 % хіноліну сульфату в 1 мл розчину, г;

100 – коефіцієнт, що використовується для застосування процентних одиниць у математичних формулах;

A – кількісний вміст 100% хіноліну сульфату, %.

$$X = \frac{20000 \times 0,0001 \times 100}{99,0} = 2,02\text{г}$$

- Розрахунок завантаження натрію хлориду:

$$П_{HX} = \frac{T \times 0,009 \times 100 \times 100}{A \times (100 - B)}, \text{ де}$$

$П_{HX}$ – фактична кількість **натрію хлориду**, яка необхідна для завантаження, г;

T – теоретичний об'єм серії, мл;

0,009 – вміст 100 % безводного натрію хлориду в 1 мл розчину, г;

100 – коефіцієнт, що використовується для застосування процентних одиниць у математичних формулах;

A – кількісний вміст діючої речовини в субстанції, %;

B – втрата в масі при висушуванні, %.

$$П_{HX} = \frac{200000 \times 0,009 \times 100 \times 100}{99,9 \times (100 - 0,02)} = \frac{18000000}{9988} = 1802,1\text{г}$$

- Розрахунок завантаження води для ін'єкцій (наважка №1):

$$П_{B_1} = 76000 - П_{MXT} - П_{HX}, \text{ де}$$

P_{B_1} – вага води для ін'єкцій, яка необхідна для завантаження (наважка №1), г;

$P_{MXГ}$ - кількість **магнію хлориду гексагідрату**, яка необхідна для завантаження, г (40,0);

$P_{НХ}$ - фактична кількість **натрію хлориду**, яка необхідна для завантаження,г;

$$P_{B_1} = 76000 - 40 - 1802,1 = 74157,9 \text{ г}$$

- *Розрахунок завантаження води для ін'єкцій (наважка №2):*

$$P_{B_2} = T \cdot \rho - P_{нх} - P_{B_1}, \text{ де}$$

P_{B_2} – вага води для ін'єкцій, яка необхідна для завантаження (наважка №2), г;

T – теоретичний об'єм серії, мл;

ρ - густина розчину препарату, г/см³ (1,0045)

$$P_{B_2} = 200000 \cdot 1,0045 - 1802,1 - 74157,9 = 124940 \text{ г}$$

е. Розрахунок кількості компонентів для приготування розчинів для коригування рН:

- *Розрахунок кількості **натрію гідроксиду** для приготування 0,1 М розчину:*

$$m_{NaOH} = c \cdot M_{NaOH} \cdot V, \text{ де}$$

m_{NaOH} – маса натрію гідроксиду, необхідна для приготування розчину, г;

c – молярна концентрація розчину, який необхідно приготувати (0,1 моль);

M_{NaOH} – молярна маса натрію гідроксиду (40 г/моль);

V – об'єм розчину, який необхідно приготувати, л;

$$m_{NaOH} = 0,1 \cdot 40 \cdot 0,2 = 0,8 \text{ г}$$

- *Розрахунок кількості **кислоти хлористоводневої** для приготування 0,1 М розчину:*

$$m_{HCl} = c \cdot M_{HCl} \cdot V, \text{ де}$$

m_{HCl} – маса кислоти хлористоводневої, необхідна для приготування розчину, г;

c – молярна концентрація розчину, який необхідно приготувати (0,1 моль);

M_{HCl} – молярна маса кислоти хлористоводневої (36,5 г/моль);

V – об'єм розчину, який необхідно приготувати, л;

$$m_{HCl} = 0,1 \cdot 36,5 \cdot 0,2 = 0,73 \text{ г}$$

Розподіл втрат по стадіях та підбір необхідного обладнання наведено у табл. 5.1

Таблиця 5.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (Разом 1,84%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 2. Виділення та зберігання концентрату бактеріофагів						
1	ТП 2.1. Виділення фаголізату	Фаголізат	20 л	0,5%	20 л	Збірник об'ємом 40 л з перемішуючим пристроєм та системою трубопроводів
		Виділений фаголізат	-		19,9 л	
		Лізат	-		0,1 л	Фільтр гідрофільний, рейтинг 1 мкм
2	ТП 2.2. Ультрафільтрація	Виділений фаголізат	19,9 л	0,2%	-	Ультрафільтраційна установка зі значенням номінальної молекулярної маси відсікання 100 кДа На утилізацію
		Пермеат	-		0,03 л	
		Концентрат бактеріофагів	-		19,86 л	

3	ТП 2.3.Внесення хіноліну сульфату та зберігання концентрату	Концентрат бактеріофагів	19,86 л	-	-	Реактор об'ємом 40 л з перемішуючим пристроєм та системою трубопроводів Насос-дозатор Стерильні поліетиленові ємності об'ємом по 2 л
		Хіноліну сульфат	2,02 г		-	
		Концентрат з хіноліном сульфатом	-		19,86 л	
		Концентрат з хіноліном сульфатом	19,86 л		2 л	
ТП 3. Приготування розчину						
4	ТП 3.1 Приготування розчину допоміжних речовин	Вода для ін'єкцій (наважка №1)	74 157 мл	0,02%	202 939 мл	Реактор об'ємом 300 л з перемішуючим пристроєм та системою трубопроводів
		Натрій хлорид	1802,1 г			
		Магнію хлорид гексагідрат	40 г			
5	ТП 3.2 Приготування розчину бактеріофагів	Концентрат з хіноліном сульфатом	2000 мл			
		Вода для ін'єкцій (наважка №2)	124 940 мл			

ТП 4. Фільтрація, наповнення та закупорювання						
6	ТП 4.1 Стерилізуюча фільтрація, наповнення та закупорювання флаконів	Розчин бактеріофагів	202 939 мл	-	202 939 мл	Машина наповнення та закупорювання флаконів
		Флакони	10 100 фл	1%	9999 фл	
		Пробки гумові	10 100 шт		9999 шт	Два фільтри стерилізуючі гідрофільні, рейтинг 0,2 мкм
		Ковпачки алюмінієві	10 100 шт		9999 шт	
ТП 5. Інспектування						
7	ТП 5.1 Інспектування на наявність видимих механічних включень	Флакони з розчином препарату	9999 фл	0,1%	-	Напівавтоматична інспекційна машина
		Проінспектовані флакони	-		9978 фл	

ПМВ 6. Пакування, маркування, відвантаження						
8	ПМВ 6.1 Маркування флаконів	Проінспектовані флакони	9978 фл	0,01%	-	Етикетувальна машина Продуктивність до 350 шт/хв
		Марковані флакони	-		9977 фл	
9	ПМВ 6.2 Упаковка флаконів у коробки	Марковані флакони	9977 фл	0,01%	-	Працівники вручну упаковують флакони у коробки
		Упаковані флакони в коробки	-		9976 шт	
10	ПМВ 6.3 Складання коробок з ЛЗ у гофрокороб та відвантаження	Упаковані флакони в коробки	9976 шт	-	-	Працівники вручну складають ЛЗ у гофрокороби
		Гофрокороб з коробками	-	-	9976 шт/10= 998 гофрокоробів	

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання дільниці стадій одержання препарату бактеріофагів

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
3-1	Збірник 40 л	1	Збірник РС-40/1 [15] (виробник - ТОВ «МПК – Промфарм») Об'єм робочий 40 л. Максимально допустима робоча температура корпусу +130°C. Частота обертів мішалки, від 50 до 450 об\хв. Встановлена електрична потужність привода мішалки 0,2кВт. Матеріали контактуючі з продуктом, сталь AISI 316 L. Габаритні розміри: Висота 1300мм; Довжина 1010 мм; Ширина 680 мм. Маса 105 кг.
Ф-2	Фільтр 1 мкм	1	Гідрофільний фільтр типу капсула з фільтротримачем [16] (виробник – Пал корпорейшн, Великобританія) Матеріал фільтру PVDF. Розмір пор 1 мкм. Площа фільтрації 0,08 м². Довжина 160 мм. Діаметр 50 мм.
уФ-3	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна пілотна установка з пластинчастими мембранами FlowMem-025 [17] зі значенням номінальної молекулярної маси відсікання 100 кДа (виробник – БіТіСі Інжинірінг, Китай) Потужність: 1,5кВт. Матеріал: сталь AISI 304. Площа 0,25 м², Потік води: 2-30 л/год, Об'єм утримання 1000 мл, Тиск 0,3-5 Бар

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					86	129
Консультант						Кафедра БТМ 87		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

P-4	Реактор 40 л	1	Реактор РС-40 [18] (виробник - ТОВ «Промфарм») Об'єм робочий 40 л. Максимально допустима робоча температура корпусу +130°C. Частота обертів мішалки, від 50 до 450 об\хв. Встановлена електрична потужність привода мішалки 0,2кВт. Матеріали контактуючі з продуктом, сталь AISI 316 L. Габаритні розміри: Висота 1300мм; Довжина 1010 мм; Ширина 680мм; Діаметр 664мм. Маса 110кг.
H-5	Насос-дозатор	1	Насос-дозатор Flexicon PF 6 [19, 20] (виробник – Флексікон, Данія). Вага 11 кг. Габаритні розміри: висота 170 мм; довжина 345 мм; ширина 320 мм. Напруга 230В. Частота 50/60 Гц. Потужність 150 Вт. Об'єм наповнення від 0,01 до 9999,9 мл Кількість обертів за хвилину. від 30 до 400. Продуктивність, до 30 л/год.

Р-6	Реактор з системою трубопроводів в 300 л	1	Реактор з системою трубопроводів [21] (виробник - Катес, Польща). Габаритні розміри: діаметр 700 мм; висота корпусу 800 мм; Висота загальна 1800 мм. Маса 333 кг. Максимально допустимий тиск усередині ємності – +0.3МЗа. Максимально допустима температура всередині ємності – +170°C Максимально допустимий тиск усередині рубашки – +0.6МЗа Матеріали контактуючі з продуктом, сталь AISI 316 L. Максимально допустима температура всередині рубашки – +170°C Електроживлення: напруга: 3 х 230 / 400 В; струм навантаження: 10А частота: 50 Гц. Контрольно-вимірювальні прилади: • Датчик рН Endress Hauser; • датчик температури Endress Hauser; • датчик тиску Endress Hauser; • ультразвуковий датчик рівня Endress Hauser; • витратомір маси Endress Hauser. Об'єм номінальний 330 л. Робочий об'єм 300 л.
СТ-7	Стерилізатор паровий	1	Паровий стерилізатор XG.DMA-1.0B [22] (виробник - Вангард Фармасьютікал Мешінері Інк, США). Максимальна температура - 140 °С. Номінальна робоча температура в камері – 132 °С. Номінальний робочий тиск в камері і сорочці – 0,21 МПа; Розрахунковий тиск в камері і сорочці – 0,1-0,23 МПа; Вода – тиск 3-5 бар, споживання – 400 л/цикл.; Тиск стислого повітря – 5-7 бар, споживання- 0,36 м³/хв., Тиск пари – 3-5 бар, споживання – 40 кг/цикл.

ММ-8	Мийна машина прохідного типу	1	Мийна машина HYDRA 1500 [23, 24] (виробник – Іма Лібра, Італія). Типорозміри флаконів 20R та 30R. Швидкість конвеєра 40-50, мм/хв. Продуктивність 20400 флаконів/год Вага 2800 кг. Габаритні розміри: висота – 1570 мм; ширина – 2100 мм; довжина – 3500 мм.
СТ-9	Стерилізаційний тунель	1	Сухожаровий стерилізаційний тунель BG 1250 FL [24, 25] (виробник – Іма Лібра, Італія) Вага 5500 кг. Габаритні розміри: висота – 3114 мм ширина – 2410 мм довжина – 4410 мм. Споживана потужність (від мережі) 74 ($\pm 5\%$) кВт. Споживана потужність (від безперебійного джерела живлення) 10 ($\pm 5\%$) кВт. Напруга 380В. Частота 50 Гц. Продуктивність: 13800 - 16800 флаконів за годину. Контрольно-вимірювальні прилади: Датчик температури ASCON ZTR 29/1P – 4шт. Датчик потоку HOENTZSCH ZS25GE-40/100P10 – 3шт. Датчик тиску ROSEMOUNT 3051-CD1A23AA1AB4 – 2шт.
Ф-10	Фільтр 0,22 мкм	2	Гідрофільний фільтр типу капсула для стерилізуючої фільтрації [26] (виробник – Пал корпорейшн, Великобританія) Матеріал фільтру PVDF. Розмір пор 0,22 мкм. Площа фільтрації 0,08 м². Довжина 160 мм. Діаметр 50 мм.

МН 3-11	Машина наповнення та закупорюван ня флаконів	1	Машина наповнення і закупорювання флаконів «Sterifill F2000» [27] (виробник – Іма Лібра, Італія). Продуктивність: 100 - 230 фл/хв. Контрольно-вимірювальні прилади: Ваги порожніх флаконів A421 A1 Wipotek SW200/70, Ваги наповнених флаконів A421 B1 Wipotek SW200/70. Частина обладнання, які контактують з продуктом: Вузол шприців, голки наповнення, розподільчий колектор, буферна ємність стерильного розчину - нержавіюча сталь AISI 316. Габаритні розміри: Висота – 2572, Ширина – 1377, Довжина – 3085.
ІМ- 12	Інспекційна машина для флаконів	1	Інспекційна машина для флаконів 90-AVSB/60 [28, 29] (виробник – Зайденадер, Німеччина). Тиск стислого повітря 4,5 бар, продуктивність – 6 000 фл/год. Габаритні розміри: висота – 1731; ширина – 1221; довжина – 2770.
ЕМ- 13	Етикувальна машина	1	Етикувальна машина SENSITIVE 350 [30] Виробник I.M.A LIBRA S.t.L, Італія. Габаритні розміри: Висота-1930; Ширина-1190; Довжина-2500. Стисле повітря: 6-8 бар; Продуктивність до 350 шт/хв

7.1. Опис технологічної схеми після ферментаційного виділення і очищення субстанції для одержання ЛЗ

Технологічна схема одержання препарату бактеріофагів включає допоміжні роботи (Підготовка сировини та пакувальних матеріалів, приготування розчинів для коригування рН), технологічний процес (виділення, ультрафільтрація та зберігання концентрату бактеріофагів, приготування розчину та стерилізуюча фільтрація, наповнення та закупорювання флаконів).

Технологічну схему наведено у графічній частині проєкту.

ДР 1. Підготовка сировини та матеріалів

Перед початком роботи персонал повинен отримати допуск до виконання робіт. Отримання сировини та матеріалів здійснюють за наявності Аналітичного листа на кожну серію, партію і статусних ідентифікаційних етикеток з зеленим стикером на кожному тарному місці, що свідчить про дозвіл до послідуного застосування.

ДР 1.1 Підготовка сировини

ДР 1.1.1 Розтарювання сировини

Розтарювання та дезобробку первинного пакування сировини здійснюють у матеріальному шлюзі (клас чистоти – D). Персонал звільняє сировину від вторинної упаковки та здійснює дезобробку 76% етиловим спиртом первинного пакування отриманої сировини (натрію хлориду, магнію хлориду гексагідрату, натрію гідроксиду, кислоти хлористоводневої, хіноліну сульфату), час експозиції 5 хв. Сировину в первинному пакуванні після дезобробки первинного пакування передають на зважування до ДР 1.1.2.

ДР 1.1.2 Зважування сировини

Зважування сировини здійснюють у приміщенні зважування класу

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ		
Змн.	лист	Титул докум. під пакуванням.	під пакуванням.	під пакуванням.	Перед початком роботи персонал здійснює		
Розроб.	Коваль Р.В.	калібрування ваг	технічних	та ваг аналітичних електронних.	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Стабніков В.П.	Розділ 7.			91	129	Зважування
Консультант		Опис технологічної схеми			Кафедра БТМ		
Н. Контр.					93		
Затверд.	Стабніков В.П.						

сировини (від ДР 1.1.1) проводять обережно, у попередньо відтаровані промарковані переносні ємності, використовуючи для кожного виду сировини окремий шпатель із нержавіючої сталі та зводячи до мінімуму пилоутворення. Персонал зважує 1802,1 г натрію хлориду, 40 г магнію хлориду гексагідрату, 2,02 г хіноліну сульфату, 0,8 г натрію гідроксиду (для приготування 0,1 М розчину), 0,73 г кислоти хлористоводневої (для приготування 0,1 М розчину). Після закінчення зважування промарковані ємності з наважками герметично закривають та передають для використання на подальших стадіях (до ДР 1.3.1, ДР 1.3.2, ТП 2.3, ТП 3.1).

ДР 1.2 Підготовка пакувальних матеріалів

ДР 1.2.1 Розтарювання пакувальних матеріалів

Розтарювання та дезобробку упаковки первинних пакувальних матеріалів здійснюють у матеріальному шлюзі класу чистоти D. Персонал звільняє матеріали від вторинної упаковки та здійснює дезобробку 76% етиловим спиртом первинної упаковки отриманих первинних пакувальних матеріалів (флакони ін'єкційні, пробки гумові для флаконів, ковпачки алюмінієві комбіновані пластиковою кришкою), час експозиції 5 хв. Пакувальні матеріали (пробки гумові для флаконів, ковпачки алюмінієві комбіновані пластиковою кришкою) в первинній упаковці після дезобробки передають на стерилізацію первинних пакувальних матеріалів (до ДР 1.2.2). Флакони ін'єкційні передають на підготовку (до ДР 1.2.3).

ДР 1.2.2 Підготовка пробок та ковпачків

Пробки гумові для флаконів та ковпачки алюмінієві комбіновані пластиковою кришкою в первинній упаковці завантажують в паровий стерилізатор (СТ-7), де їх стерилізують при температурі $121 \pm 3^\circ\text{C}$ протягом 30 хвилин. Після стерилізації здійснюють контроль стерильності пробок гумових для флаконів та ковпачків алюмінієвих, пакувальні матеріали повинні бути стерильні.

Стерильні пробки гумові для флаконів та ковпачки алюмінієві комбіновані пластиковою кришкою передають під ламінаром класу чистоти А в зону

наповнення (до ТП 4.1). Конденсат з парового стерилізатора (СТ-7) відводиться на знешкодження відходів.

ДР 1.2.3 Підготовка флаконів

Флакони ін'єкційні (від ДР 1.2.1) звільняють від первинного пакування та в приміщенні класу чистоти D завантажують до Мийної машини прохідного типу (ММ-8) з послідувачим їх проходженням через Стерилізаційний тунель (СТ-9).

Мийна машина прохідного типу (ММ-8) виконує автоматичну мийку і сушку флаконів. Миття флаконів в Мийній машині прохідного типу (ММ-8) здійснюється водою очищеною з послідувачим ополіскуванням водою для ін'єкцій температурою 85-90 °С, тиск води для ін'єкцій 1 Бар, тиск стисненого очищеного повітря 2,5 Бар, час мийки флакону 7-8 с, час продувки флакону стисненим повітрям 4-5 с. Відпрацьовані стоки з Мийної машини прохідного типу (ММ-8) відводяться на знешкодження відходів.

Флакони ін'єкційні по конвеєру (автоматично без контакту з навколишнім середовищем) надходять в Стерилізаційний тунель (СТ-9), де вони стерилізуються і депірогенізуються: температура повітря в зоні підігріву 40-50°С, температура повітря в зоні стерилізації 300+20°С, час стерилізації 20 хв, температура в зоні охолодження 25-30°С. Після стерилізації здійснюють контроль стерильності флаконів ін'єкційних, флакони повинні бути стерильні.

Стерильні флакони зі Стерилізаційного тунелю (СТ-9) автоматично по конвеєру надходять під ламінар класу чистоти А в зону наповнення (до ТП 4.1).

ДР 1.2.4 Маркування коробок та групових етикеток

Зі складу надходять немарковані коробки та групові етикетки. Персонал вручну за допомогою штампку наносить відповідну інформацію на немарковані коробки та групові етикетки. Під час процесу контролюється коректність та якість нанесення маркування. Коробки марковані (до ПМВ 6.2), групові етикетки марковані (до ПМВ 6.3). Відбраковані пакувальні матеріали на знешкодження.

ДР 1.3 Приготування розчинів для коригування рН

ДР 1.3.1 Приготування 0,1М розчину натрію гідроксиду

У колбу об'ємом 200 мл додати наважку 0,8 г натрію гідроксиду (від ДР 1.1.2) та внести воду для ін'єкцій $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ (половину об'єму). Перемішування проводити до повного розчинення натрію гідроксиду. Далі довести об'єм розчину до мітки мірної колби водою для ін'єкцій. Перемішати, промаркувати ємність та щільно закрити. Концентрацію приготованого розчину натрію гідроксиду контролюють титруванням в лабораторії.

Приготований 0,1М розчин натрію гідроксиду використовують за необхідності для коригування рН в процесі приготування розчину (до ТП 3.1, ТП 3.2).

ДР 1.3.2 Приготування 0,1М розчину кислоти хлористоводневої

У колбу об'ємом 200 мл додати наважку 0,73 г кислоти хлористоводневої (від ДР 1.1.2) та внести воду для ін'єкцій $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ (половину об'єму). Перемішування проводити до повного розчинення кислоти хлористоводневої. Далі довести об'єм розчину до мітки мірної колби водою для ін'єкцій. Перемішати, промаркувати ємність та щільно закрити. Концентрацію приготованого розчину кислоти хлористоводневої контролюють титруванням в лабораторії.

Приготований 0,1М розчин кислоти хлористоводневої використовують за необхідності для коригування рН в процесі приготування розчину (до ТП 3.1, ТП 3.2).

ТП 2. Виділення та зберігання концентрату бактеріофагів

ТП 2.1. Виділення фаголізату

Фаголізат після інкубації з флаконів, в яких відбувся лізис в лабораторних умовах, завантажують в збірник об'ємом 40 л (З-1) та перемішують з частотою обертів мішалки 250-300 об/хв. Зі збірника (З-1) за допомогою стисненого стерильного повітря (тиск в збірнику 1,5-2,0 Бар) фаголізат по системі трубопроводів пропускають через гідрофільний фільтр з розміром пор 1 мкм (Ф-2). Лізат об'ємом 0,1 л передається на знешкодження. На початку процесу та відразу після закінчення процесу фільтрації використовуваний фільтр (Ф-2)

перевіряється на цілісність приладом для перевірки цілісності фільтрів. Виділений фаголізат після гідрофільного фільтру надходить на ультрафільтрацію до ТП 2.2.

ТП 2.2. Ультрафільтрація

Ультрафільтрацію необхідно провести задля очищення виділеного фаголізату від залишків лізату та ендотоксинів, які могли пройти через фільтри попередньої очистки. Виділений фаголізат (від ТП 2.1) перекачують в реактор об'ємом 40 л (Р-4), пропускаючи за допомогою стисненого стерильного повітря під тиском 3,0-3,5 Бар через ультрафільтраційну установку (УФ-3), яка містить полієфірсульфонові (PES) касети зі значенням номінальної молекулярної маси відсікання 100 кДа. Пермеат об'ємом 0,03 л передається на знешкодження відходів.

ТП 2.3. Внесення хіноліну сульфату та зберігання концентрату

До концентрату специфічних бактеріофагів в реактор (Р-4) при постійному перемішуванні, уникаючи піноутворення, завантажити 2,02 г хіноліну сульфату (від ДР 1.1.2) та перемішати протягом 7-10 хв, частота обертів мішалки 250-300 об/хв.

Після закінчення перемішування, за допомогою пробовідбірника з реактора (Р-4) відібрати пробу концентрату специфічних бактеріофагів для проведення мікробіологічного контролю за показниками «Специфічна активність» (концентрація фагових часток *Escherichia coli* не менше $1,2 \times 10^{19}$ БУО/л) та «Мікробіологічна чистота» (Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не повинно перевищувати 1×10^3 КУО/мл; Загальне число дріжджових і плісневих грибів (ТУМС) не повинно перевищувати 1×10^2 КУО/мл).

Концентрат специфічних бактеріофагів може зберігатися в реакторі (Р-4) за температури 20-25 °С протягом 48 годин до моменту використання. З реактору (Р-4) за допомогою стисненого стерильного повітря (під тиском 1,5-2,0 Бар) 2 л концентрату подають у реактор (Р-6) (або вносять в реактор з поліетиленового контейнеру об'ємом по 2 л) для приготування розчину (до

ТП 3.2). Решту 18 л концентрату специфічних бактеріофагів за допомогою насос-дозатора (Н-5) під ламінаром фасують в поліетиленові контейнери об'ємом по 2 л для зберігання та подальшого використання для приготування наступних серій розчину.

Сумарний час необхідний для ТП 2. Виділення та зберігання концентрату бактеріофагів дорівнює 1,5 год.

ТП 3. Приготування розчину

ТП 3.1 Приготування розчину допоміжних речовин

У реактор (Р-6) об'ємом 300 л завантажити 74 157 г води для ін'єкцій (наважка 1) температурою 20-25 °С, далі при постійному перемішуванні (частота обертів мішалки 300-350 об/хв), уникаючи пилоутворення, завантажити попередньо підготовлені наважки (від ДР.1.1.2). Спочатку додати 1802,1 г натрію хлориду, перемішати (15-20 хв), далі 40 г магнію хлориду гексагідрату та перемішати (15-20 хв). Персонал має контролювати повноту розчинення компонентів візуально.

За допомогою пробовідбірника з реактора (Р-6) відібрати пробу приготованого розчину допоміжних речовин для контролю за показником рН: рН розчину допоміжних речовин повинен становити 7,0-7,6. За необхідності провести коригування рН отриманого розчину, використовуючи 0,1 М розчин натрію гідроксиду (від ДР 1.3.1) або 0,1 М кислоти хлористоводневої (від ДР 1.3.2).

ТП 3.2 Приготування розчину бактеріофагів

Із реактора (Р-4) за допомогою стисненого стерильного повітря під тиском 1,5-2,0 Бар, через об'ємно-ваговий дозатор перекачати 2 л концентрату з хіноліном сульфату (від ТП 2.3) (або внести з поліетиленового контейнеру об'ємом по 2 л) у реактор з розчином допоміжних речовин (Р-6) та перемішати протягом 35-40 хв, частота обертів мішалки 250-300 об/хв. Після чого додати порційно наважку №2 води для ін'єкцій (124 940 г) температурою 20-25 °С та перемішувати розчин бактеріофагів 15-20 хв, частота обертів мішалки 250-300 об/хв.

За допомогою пробовідбірника з реактора (Р-6) відібрати пробу приготованого розчину для контролю за показником рН: рН розчину повинен становити 7,0-7,6. За необхідності провести коригування рН отриманого розчину, використовуючи 0,1 М розчин натрію гідроксиду (*від ДР 1.3.1*) або 0,1 М кислоти хлористоводневої (*від ДР 1.3.2*).

Приготований розчин бактеріофагів за допомогою системи трубопроводів за допомогою стисненого стерильного повітря під тиском 1,5-2,0 Бар подається на наповнення (*до ТП 4.1*).

Сумарний час необхідний для *ТП 3. Приготування розчину* дорівнює 2 год.

ТП 4. Фільтрація, наповнення та закупорювання

ТП 4.1 Стерилізуюча фільтрація, наповнення та закупорювання флаконів

Перед наповненням флаконів, персонал проводить збирання з'ємних простерилізованих частин машини наповнення та закупорювання флаконів (МНЗ-11). Персонал в зоні класу чистоти А розкриває первинне пакування та завантажує стерильні пробки гумові для флаконів та алюмінієві ковпачки (*від ДР 1.2.2*) у відповідні бункери машини, збирає підготовлену фільтраційну систему (яка необхідна для додаткової очистки розчину), що складається з двох гідрофільних фільтрів (Ф-10) (стерилізуючий та «поліцейський») типу капсула (матеріал фільтру PVDF, розмір пор 0,22 мкм).

За допомогою системи трубопроводів за допомогою стисненого стерильного повітря під тиском розчин бактеріофагів (*від ТП 3.2*) перекачується з реактора (Р-6) через систему фільтрів (Ф-10) до машини наповнення та закупорювання флаконів (МНЗ-11). Об'єм наповнення флаконів 20 мл.

Після закінчення процесу наповнення, закатані флакони з розчином бактеріофагів відбираються для проведення мікробіологічного контролю за показниками «Специфічна активність» (концентрація фагових часток

Escherichia coli не менше $1,2 \times 10^6$ БУО/л) та «Стерильність» (повинні бути відсутні сторонні мікроорганізми).

Наповнені, закупорені гумовою пробкою та закатані алюмінієвими ковпачками флакони з препаратом поступають по конвеєру на стадію інспектування наповнених флаконів на наявність видимих механічних включень (до ТП 5.1).

На початку процесу наповнення та відразу після закінчення процесу наповнення використовувані в ході процесу фільтри (Ф-10) перевіряються на цілісність приладом для перевірки цілісності фільтрів.

ТП 5. Інспектування

ТП 5.1 Інспектування на наявність видимих механічних включень

Якісно наповнені закатані флакони (від ТП 4) надходять на стадію «Інспекція флаконів», де перевіряються на наявність видимих механічних включень на інспекційній машині для флаконів (ІМ-12). Після перевірки, наповнені та закатані флакони надходять на стадію «Пакування та маркування».

ПМВ 6. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 6.1 Маркування флаконів

Проінспектовані флакони з розчином бактеріофагів (від ТП 5.1) направляються на маркування індивідуальними самоклеючими етикетками на етикетувальній машині (ЕМ-13). Під час процесу контролюється цілісність та якість нанесення етикеток, коректність та якість маркування етикеток. Марковані флакони з розчином бактеріофагів (до ПМВ 6.2). Відбраковані флакони на знешкодження.

Процеси ТП 4. Фільтрація, наповнення та закупорювання; ТП 5. Інспектування; ПМВ 6.1 Маркування флаконів відбуваються одночасно і тривають 1,5 години.

ПМВ 6.2 Упаковка флаконів у коробки

Марковані флакони з розчином бактеріофагів (від ПМВ 6.1) пакуються у марковані коробки з інструкцією персоналом вручну. На кожній коробці

попередньо нанесено маркування з відповідною інформацією (від ДР 1.2.4). Під час упаковки контролюється цілісність та зовнішній вигляд коробок. Упаковані флакони з розчином бактеріофагів (до ПМВ 6.3). Відбраковані коробки на знешкодження.

ПМВ 6.3 Складання коробок з ЛЗ у гофрокороб та відвантаження

Пакування коробок з ЛЗ у гофрокороб здійснюється обслуговуючим персоналом вручну. Упаковані флакони з ЛЗ в коробки (від ПМВ 6.2), персонал складає у гофрокороб по 10 коробок, заклеює та прикріплює групову марковану етикетку (від ДР 1.2.4). Персоналом контролюється цілісність та зовнішній вигляд гофрокоробів, цілісність та якість нанесення групових етикеток. Готова продукція надходить на зберігання в захищеному від світла місці при температурі від 2°C до 8 °C та подальшого відвантаження. Відбраковані гофрокороби та групові етикетки на знешкодження.

Час необхідний для ПМВ 6.2 Упаковка флаконів у коробки; ПМВ 6.3 Складання коробок з ЛЗ у гофрокороб та відвантаження дорівнює 2 години.

Тривалість одержання готового препарату бактеріофагів Т4 *Escherichia coli* від стадії ТП 2. Виділення та зберігання концентрату бактеріофагів до ПМВ 6.3 Складання коробок з ЛЗ у гофрокороб та відвантаження становить 7 год.

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА		
Розроб.		Коваль Р.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.			100	129	
Консультант					Кафедра БТМ 101		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

ПОФАГ БАКТЕРІОФАГ ПОЛІВАЛЕНТНИЙ

Діючі речовини:

Концентрат специфічних бактеріофагів до *Escherichia coli* - не менше 1×10^9 фагових часток.

Таблиця 8.1

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Показники якості	Встановлені значення	Методи контролю
Опис	Прозора рідина, допускається жовтуватий відтінок	Візуально
Ідентифікація	Препарат повинен специфічно лізувати: <i>Escherichia coli</i>	Метод Крейджа (модифікація Макашвілі-Чанішвілі)
pH	6,8-7,8	За ДФУ*, р.2.2.3, потенціометрично
Об'єм, що витягається	Не менше номінального	За ДФУ*, р.2.9.17
Стерильність	Препарат повинен бути чистим від специфічної та неспецифічної мікрофлори	За методом прямого посіву
Специфічна активність	Препарат повинен лізувати бактерії у розведенні не менше 10^{-9} , що еквівалентно титру не менше 1×10^9 фагових часток <i>Escherichia coli</i>	Метод Апельмана, метод Грація
Упаковка	Стерильні ємності об'ємом 2 л	Відповідно до НД
Умови зберігання	При температурі від 2°C до 8 °C в оригінальній упаковці	Відповідно до НД
Термін зберігання	2 роки	Відповідно до НД

*-Діюче видання ДФУ

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. ОПИС.

Прозора рідина, допускається жовтуватий відтінок. Випробування проводять візуально.

2. ІДЕНТИФІКАЦІЯ.

Препарат повинен лізувати бактерію *Escherichia coli*. Випробування проводять за методом Крейджа (модифікація Макашвілі-Чанішвілі).

Виконання контролю

Бактеріальну культуру, що виросла при 37°C за 18-24 год у пробірці зі скошеним агаризованим середовищем, змивають 4 мл стерильного поживного бульйону чи фізіологічного розчину. Суспензію розводять в 10 раз. Із даного розведення за допомогою мікробіологічної петлі стерильно беруть одну краплю і наносять штрих на чашку Петрі з агаризованим середовищем. На штрих наносять 0,05 мл (одна крапля) досліджуваного розчину. Залишають чашки до повного вбирання рідини та інкубують при 30-37°C протягом 12-24 год. У досліджуваному розчині присутність фага виявляється літичною ділянкою на бактеріальній смужці на місці нанесення випробуваного розчину.

3. рН.

6,8-7,8. Визначають згідно з ДФУ, р.2.2.3, потенціометрично

4. ОБ'ЄМ, ЩО ВИТЯГАЄТЬСЯ:

Не менше номінального 20 мл $\pm$ 5%. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, р.2.9.17.

5. СТЕРИЛЬНІСТЬ.

Випробування проводять методом прямого посіву. По 1 мл препарату вносять у пробірки з тіогліколевим середовищем і в три пробірки з середовищем Сабуро. Посіви з тіогліколевим середовищем інкубують при температурі 30-35°C, а з середовищем Сабуро – 20-25°C. Інкубувати протягом 14 днів. Після інкубації з кожної пробірки готують препарати для мікроскопії на предметних скельцях. Препарати повинні бути чистими від специфічної та неспецифічної мікрофлори.

6. СПЕЦИФІЧНА АКТИВНІСТЬ.

Препарат повинен лізувати бактерію *Escherichia coli*.

Визначають титруванням за методом Апельмана на поживному бульйоні для культивування мікроорганізмів, використовуючи вищенаведений мікроорганізм. Для проведення контролю відбирають по 2 флакони препарату з серії.

Поживні середовища культивування (бульйон, агар) готують із сухого середовища згідно рекомендацій виробника.

Виконання контролю

Визначення активності досліджуваної суспензії проводять за методом Апельмана. Готують ряд послідовних десятикратних розведень в скляних пробірках із стерильним бульйоном: 0,5 мл зразку препарату розводять у 4,5 мл бульйону (розведення 10^{-1}). Суспензію титрують від 10^{-1} до 10^{-10} , із обов'язковою зміною піпеток при приготуванні кожного наступного розведення. Для контролю росту культур здійснюють їх трикратний посів у поживний бульйон без додавання фагу. У всі пробірки додають по 0,03 мл суспензії, що містить 10^9 мікробних клітин в 1 мл. Проби витримують при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 18-22 годин.

Визначають максимальне розведення, в якому візуально фіксується наслідок дії бактеріофагу - ріст культури мікроорганізмів відсутній (бульйон в пробірці прозорий). Кількість фагових часток – це обернене число до значення максимального розведення, в якому ріст культури мікроорганізмів відсутній. Наприклад, якщо значення максимального розведення, в якому ріст культури мікроорганізмів відсутній 10^{-9} , то кількість фагових часток складатиме 10^9 .

У окремих випадках допускається наявність незначних ознак росту в останніх розведеннях, що істотно слабший у порівнянні із контрольними пробірками. Якщо навіть для одного штаму активність препарату виявляється нижче встановленої, проводять повторне випробування, за методом агарових шарів Грація.

Метод агарових шарів Грація.

Препарат розводять від 10^{-1} до 10^{-8} розведень у стерильному бульйоні із обов'язковою зміною піпеток при приготуванні кожного наступного розведення. Вміст пробірок із розведень 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} у кількості 1 мл переносять у стерильні пробірки і додають 1 мл суспензії, що містить 5×10^8 мікробних клітин в 1 мл та 2,5 мл 0,7%-го напіврідкого агару, температурою 45°C . Суміш струшують і переносять на чашку Петрі з 1,8% агаром, рівномірно розподіляючи поверхнею. Після застигання верхнього шару чашки перевертають та культивують в термостаті при температурі 37°C протягом 12-18 год. Титр препарату визначають підрахунком негативних колоній на чашках Петрі, використовуючи формулу:

$$n = Y \cdot X$$

де n – кількість фагових часток в 1 мл;

Y -число негативних колоній;

X - розведення суспензії.

7. УПАКОВКА.

По 2 л у стерильних ємностях.

8. МАРКУВАННЯ

Відповідно до затвердженого тексту маркування, що додається.

9. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігають при температурі від 2 до 8°C в оригінальній упаковці. Транспортування допускається при температурі не вище 25°C протягом не більше 30 діб, надалі препарат зберігають при температурі від 2 до 8°C .

10. ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ.

2 роки. Після першого розкриття флакону можливе зберігання не більше 10 діб при температурі від 2 до 8°C .

РОЗДІЛ 9. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

9.1. Опис лікарського засобу згідно МКЯ

ПІОФАГ БАКТЕРІОФАГ ПОЛІВАЛЕНТНИЙ

Діючі речовини:

1 мл препарату містить специфічні бактеріофаги у концентрації не менше 1×10^5 фагових часток до *Escherichia coli*.

Таблиця 9.1

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Показники якості	Встановлені значення	Методи контролю
Опис	Прозора рідина, допускається жовтуватий відтінок	Візуально
Ідентифікація	Препарат повинен специфічно лізувати: <i>Escherichia coli</i>	Метод Крейджа (модифікація Макашвілі-Чанішвілі)
pH	6,8-7,8	За ДФУ*, р.2.2.3, потенціометрично
Об'єм, що витягається	Не менше номінального	За ДФУ*, р.2.9.17
Стерильність	Препарат повинен бути чистим від специфічної та неспецифічної мікрофлори	За методом прямого посіву
Специфічна активність	Препарат повинен лізувати бактерії у розведенні не менше 10^{-5} , що еквівалентно титру не менше 1×10^5 фагових часток <i>Escherichia coli</i>	Метод Апелмана, метод Грація
Упаковка	Розчин у флаконах по 20 мл №1 в пачках з картону	Відповідно до НД
Умови зберігання	При температурі від 2°C до 8 °C в оригінальній упаковці	Відповідно до НД
Термін придатності	3 роки	Відповідно до НД

*-Діюче видання ДФУ

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Коваль Р.В.			РОЗДІЛ 9. Контроль виробництва	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Стабніков В.П.					104	129
Консультант						Кафедра БТМ 106		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. ОПИС.

Прозора рідина, допускається жовтуватий відтінок. Випробування проводять візуально.

2. ІДЕНТИФІКАЦІЯ.

Препарат повинен лізувати бактерію *Escherichia coli*. Випробування проводять за методом Крейджа (модифікація Макашвілі-Чанішвілі).

Виконання контролю

Бактеріальну культуру, що виросла при 37°C за 18-24 год у пробірці зі скошеним агаризованим середовищем, змивають 4 мл стерильного поживного бульйону чи фізіологічного розчину. Суспензію розводять в 10 раз. Із даного розведення за допомогою мікробіологічної петлі стерильно беруть одну краплю і наносять штрих на чашку Петрі з агаризованим середовищем. На штрих наносять 0,05 мл (одна крапля) досліджуваного розчину. Залишають чашки до повного вбирання рідини та інкубують при 30-37°C протягом 12-24 год. У досліджуваному розчині присутність фага виявляється літичною ділянкою на бактеріальній смужці на місці нанесення випробуваного розчину.

3. рН.

6,8-7,8. Визначають згідно з ДФУ, р.2.2.3, потенціометрично

4. ОБ'ЄМ, ЩО ВИТЯГАЄТЬСЯ:

Не менше номінального 20 мл $\pm$ 5%. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ, р.2.9.17.

5. СТЕРИЛЬНІСТЬ.

Випробування проводять методом прямого посіву. По 1 мл препарату вносять у пробірки з тіогліколевим середовищем і в три пробірки з середовищем Сабуро. Посіви з тіогліколевим середовищем інкубують при температурі 30-35°C, а з середовищем Сабуро – 20-25°C. Інкубувати протягом 14 днів. Після інкубації з кожної пробірки готують препарати для мікроскопії на предметних скельцях. Препарати повинні бути чистими від специфічної та неспецифічної мікрофлори.

6. СПЕЦИФІЧНА АКТИВНІСТЬ.

Препарат повинен лізувати бактерію *Escherichia coli*.

Визначають титруванням за методом Апельмана на поживному бульйоні для культивування мікроорганізмів, використовуючи вищенаведений мікроорганізм. Для проведення контролю відбирають по 2 флакони препарату з серії.

Поживні середовища культивування (бульйон, агар) готують із сухого середовища згідно рекомендацій виробника.

Виконання контролю

Визначення активності досліджуваної суспензії проводять за методом Апельмана. Готують ряд послідовних десятикратних розведень в скляних пробірках із стерильним бульйоном: 0,5 мл зразку препарату розводять у 4,5 мл бульйону (розведення 10^{-1}). Суспензію титрують від 10^{-1} до 10^{-6} , із обов'язковою зміною піпеток при приготуванні кожного наступного розведення. Для контролю росту культур здійснюють їх трикратний посів у поживний бульйон без додавання фагу. У всі пробірки додають по 0,03 мл суспензії, що містить 10^9 мікробних клітин в 1 мл. Проби витримують при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 18-22 годин.

Визначають максимальне розведення, в якому візуально фіксується наслідок дії бактеріофагу - ріст культури мікроорганізмів відсутній (бульйон в пробірці прозорий). Кількість фагових часток – це обернене число до значення максимального розведення, в якому ріст культури мікроорганізмів відсутній. Наприклад, якщо значення максимального розведення, в якому ріст культури мікроорганізмів відсутній 10^{-5} , то кількість фагових часток складатиме 10^5 .

У окремих випадках допускається наявність незначних ознак росту в останніх розведеннях, що істотно слабший у порівнянні із контрольними пробірками. Якщо навіть для одного штаму активність препарату виявляється нижче встановленої, проводять повторне випробування, за методом агарових шарів Грація.

Метод агарових шарів Грація.

Препарат розводять від 10^{-1} до 10^{-6} розведень у стерильному бульйоні із обов'язковою зміною піпеток при приготуванні кожного наступного розведення. Вміст пробірок із розведень 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} у кількості 1 мл переносять у стерильні пробірки і додають 1 мл суспензії, що містить 5×10^8 мікробних клітин в 1 мл та 2,5 мл 0,7%-го напіврідкого агару, температурою 45°C . Суміш струшують і переносять на чашку Петрі з 1,8% агаром, рівномірно розподіляючи поверхнею. Після застигання верхнього шару чашки перевертають та культивують в термостаті при температурі 37°C протягом 12-18 год. Титр препарату визначають підрахунком негативних колоній на чашках Петрі, використовуючи формулу:

$$n = Y \cdot X$$

де n – кількість фагових часток в 1 мл;

Y - число негативних колоній;

X - розведення суспензії.

7. УПАКОВКА.

Розчин у флаконах по 20 мл №1 в пачках з картону.

8. МАРКУВАННЯ

Відповідно до затвердженого тексту маркування.

9. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігають при температурі від 2 до 8°C в оригінальній упаковці. Транспортування допускається при температурі не вище 25°C протягом не більше 30 діб, надалі препарат зберігають при температурі від 2 до 8°C .

10. ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ.

3 роки. Після першого розкриття флакону можливе зберігання не більше 10 діб при температурі від 2 до 8°C .

ВИСНОВКИ

У даній магістерській роботі висвітлено літературний огляд статей щодо сучасних аспектів використання бактеріофагів: наномедицина, розробка вакцин, лікування раку, регенерація тканин, екодеззасоби у лікарнях та, звісно, фаготерапія. Також було наведено переваги використання бактеріофагів перед антибіотиками та проведено ознайомлення з дослідженнями вітчизняних науковців, які працювали з фагами.

У літогляді комплексно наведено особливості виробництва бактеріофагів та продукція їх у біореакторах. Проаналізувавши відомі методи одержання фагів, було визначено, що найкращим біологічним агентом є бактерія *Escherichia coli* та її фаг Т4. Хоча даний продуцент і потребує дорожчого поживного середовища (26,3 грн/л), проте вихід цільового продукту-фагів є найвищим- $1,2 \times 10^{16}$ БУО/мл, а умовна вартість найнижчою.

Для розрахунку техніко економічного обґрунтування було взято статистичні дані пацієнтів у Європі, що страждають на запальні захворювання кишечника. Врахувавши усі вихідні дані, потужність виробництва склала 88 000 л.

Щоб отримати готовий лікарський засіб, культуральна рідина фагів пройшла такі етапи виділення та очищення як: виділення фаголізату, ультрафільтрація, внесення хіноліну сульфату, приготування розчину бактеріофагів, стерилізуюча фільтрація, наповнення та закупорювання флаконів, інспектування на наявність механічних включень. Завершальним процесом є маркування флаконів, їх упаковка у коробки та складання коробок у гофрокороби.

У проєкті був здійснений підбір відповідного обладнання, наведена його специфікація, описана технологічна схема після ферментаційного виділення і очищення фагів для одержання готового лікарського засобу, а також

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Висновки	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Коваль Р.В.						
Перевір.		Стабніков В.П.					108	129
Консультант						Кафедра БТМ 110		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

представлені апаратурна та технологічна схема у графічній частині роботи.

Не менш важливими розділами роботи є контроль виробництва концентрату та опис лікарського засобу, який здійснюється згідно методів МКЯ та ДФУ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Антушева, Т. І., Калініченко, С. В., Антушева, Т. О., Торянік, І. І., Гейдеріх, О. Г. (2020). Бактеріофаги – альтернатива традиційної антибіотикотерапії. *Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині*: матеріали дистанційної наук.-практ. конф. НФаУ, 7.

Волк, О. О., Бойченко, М. С., Матвєєва, І. В., Жук, О. В., Бойченко, С. В. (2017). Бактеріофаги: нова парадигма та переваги перед антибіотиками у лікувально-профілактичних цілях. *Наукоємні технології*, 2 (34), 150-157.

Воробей, Є.С., Воронкова, О.С., Вінніков, А.І. (2014). Вплив препаратів бактеріофагів на процес біоплівкоутворення штамів *Staphylococcus aureus*. *Вісник проблем біології і медицини*, 48-50.

Воробей, Є.С., Воронкова, О.С., Сірокваша, О., Вінніков, А. (2014). Лікувально-профілактичні препарати бактеріофагів. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 64, 52–66.

Воронкова, О.С., Сірокваша, О.А., Полішко, Т.М., Вінніков, А.І. (2012). Перспективи використання діагностичних та лікувальних препаратів бактеріофагів у медицині. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина.* –2 (3), 20-25.

Жмілько, П. Г., Федченко, О. В., Зінов'єва, М. Л. (2015). Бактеріофаги: актуальні питання безпечного застосування (огляд літератури). *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки*, 3, 71-81.

Завіднюк, Н.Г. (2015). Бактеріофаги: назад у майбутнє. *Огляди та лекції*. 72-79.

Краснопольський Ю.М., Пилипенко Д. М. К78 Фармацевтична біотехнологія: Біотехнології виробництва готових лікарських форм: навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю.М. Краснопольський, Д.М.Пилипенко. –Харків: ТОВ «ДРУКАРНЯ МАДРИД»,

					НУХТ БТЕК 02.01.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Список використаної літератури	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Коваль Р.В.						
Перевір.		Стабніков В.П.					110	129
Консультант						Кафедра БТМ 112		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

2020 –279с.

Лютко, О.Б., Вітрак, К.В., Митякіна, І.Ю. (2020). Визначення чутливості клінічних штамів *S.aureus*, виділених від хворих ортопедо-травматологічного профілю, до антибактеріального засобу “Піофаг” *Вісник ортопедії, травматології та протезування*,1: 30-38.

Понятовський, В. А., Широбоков, В. П., Бобир, В. В., Харіна, А. В. (2023). Бактеріофаги як можливий напрям боротьби з антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів. *Превентивна медицина. Теорія і практика*, 1 (1), 33-37.

Смотрова, Н.Г., Несміян, В.С., Громов, М.О. (2021). Перспективи використання бактеріофагів у боротьбі з антибіотикорезистентними мікроорганізмами. Матеріали науково-практичної міжнародної дистанційної конференції. *Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині*, 43-44.

Шеремет, М. П., Калюжная, О. С., Стрілець, О. П., Стрельников, Л. С. Перспективи створення лікарських засобів з бактеріофагами. Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна.

Abedon, S.T., Garcia, P., Mullany, P., Aminov, R. (2017). Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Front. Microbiol.* 8, 981. [doi:10.3389/fmicb.2017.00981](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00981)

Adhya, S., Merrill, C.R., Biswas, B., (2014). Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4 (1), a012518

Adriaenssens, E.M., Lehman, S.M., Vandersteegen, K., Vandenneuvel, D., Philippe, D.L., Cornelissen, A., Clokie, M.R.J., García, A.J., De Proft, M., Maes, M., et al. (2012). CIM[®] monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles. *Virology*. 434:265–270. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.018.

Agboluaje M, Sauvageau D. (2018). Bacteriophage Production in Bioreactors. *Methods Mol Biol.* 1693:173-193. doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8_15. PMID: 29119441.

Aghebati-Maleki, L., Bakhshinejad, B., Baradaran, B., Motallebnezhad, M., Aghebati-Maleki, A., Nickho, H., Yousefi, M., Majidi, J. (2016). Phage Display as a Promising Approach for Vaccine Development. *J. Biomed. Sci.*, 23:66. doi: 10.1186/s12929-016-0285-9.

Akmal, M., Rahimi-Midani, A., Hafeez-ur-Rehman, M., Hussain, A., Choi, T.-J. (2020). Isolation, Characterization, and Application of a Bacteriophage Infecting the Fish Pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pathogens.* 9, 215. doi: [10.3390/pathogens9030215](https://doi.org/10.3390/pathogens9030215)

Ali, J, Rafiq, Q, Ratcliffe, E. (2019). A scaled-down model for the translation of bacteriophage culture to manufacturing scale. *BiotechnolBioeng.*, 116(5):972-984. doi: 10.1002/bit.26911.

Ando, H., Lemire, S., Pires, D.P., Lu, T.K. (2015). Engineering Modular Viral Scaffolds for Targeted Bacterial Population Editing. *Cell Syst.*, 1:187–196. doi: 10.1016/j.cels.2015.08.013.

Anyaeqbunam, N.J., Anekpo, C.C., Anyaeqbunam, Z.K.G., Doowuese, Y. Chinaka, C.B., Odo, O.J., Sharndama, H.C., Okeke, O.P., Mba, I.E. (2022). The Resurgence of Phage-Based Therapy in the Era of Increasing Antibiotic Resistance: From Research Progress to Challenges and Prospects. *Microbiol. Res.* 264, 127155. doi: [10.1016/j.micres.2022.127155](https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127155)

Azam, A. H., Tan, X. E., Veerananarayanan, S., Kiga, K., & Cui, L. (2021). Bacteriophage Technology and Modern Medicine. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(8), 999. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080999>

Bagińska, N., Harhala, M.A., Cieřlik, M., Orwat, F., Weber-Dąbrowska, B., Dąbrowska, K., Górski, A., Jończyk-Matysiak, E. (2023). Biological Properties of 12 Newly Isolated *Acinetobacter baumannii*-Specific Bacteriophages. *Viruses.* 15, 231. doi: [10.3390/v15010231](https://doi.org/10.3390/v15010231)

Barnard, A.M., Fairhead, H.I. (2021). A Commentary on the Development of Engineered Phage as Therapeutics. *Drug Discov. Today.* 26, 2095–2098. doi: [10.1016/j.drudis.2021.06.013](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.06.013)

Ben-Zaken, H., Kraitman, R., Copenhagen-Glazer, S., Khalifa, L., Alkalay-Oren, S., Gelman, D., Ben-Gal, G., Beyth, N., Hazan, R. (2021). Isolation and Characterization of *Streptococcus Mutans* Phage as a Possible Treatment Agent for Caries. *Viruses.* 13, 825. doi: [10.3390/v13050825](https://doi.org/10.3390/v13050825)

Bryan, D, El-Shibiny, A, Hobbs, Z, Porter, J, Kutter, EM. (2016). Bacteriophage T4 infection of stationary phase *E. coli*: life after log from a phage perspective. *Front Microbiol.* 7:1391. doi: [10.3389/fmicb.2016.01391](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01391)

Cao, B., Li, Y., Yang, T., Bao, Q., Yang, M., Mao, C. (2019). Bacteriophage-Based Biomaterials for Tissue Regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 145:73–95. doi: [10.1016/j.addr.2018.11.004](https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.11.004).

Carroll-Portillo, A., Coffman, C.N., Varga, M.G., Alcock, J., Singh, S.B., Lin, H.C. (2021). Standard Bacteriophage Purification Procedures Cause Loss in Numbers and Activity. *Viruses.* 13:328. doi: [10.3390/v13020328](https://doi.org/10.3390/v13020328).

Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., Hanage, W.P. (2014). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? *Evol. Appl.*, 8:240–247. doi: [10.1111/eva.12185](https://doi.org/10.1111/eva.12185).

Dalmasso, M, de Haas, E, Neve, H, Strain, R, Cousin, FJ, Stockdale, SR, Ross, RP, Hill, C. (2015). Isolation of a novel phage with activity against *Streptococcus mutans* biofilms. *PLOS ONE*, 10(9):e0138651. doi: [10.1371/journal.pone.0138651](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138651)

Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garlena, R.A., Russell, D.A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K.C., Soothill, J., Jacobs-Sera, D., Schooley, R.T., et al. (2019). Engineered Bacteriophages for Treatment of a Patient with a Disseminated Drug-Resistant *Mycobacterium Abscessus*. *Nat. Med.*, 25:730–733. doi: [10.1038/s41591-019-0437-z](https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z).

Dong, Z., Xing, S., Liu, J., Tang, X., Ruan, L., Sun, M., Tong, Y., Peng, D. (2018). Isolation and Characterization of a Novel Phage Xoo-Sp2 That Infects

Xanthomonas oryzae Pv. *oryzae*. J. Gen. Virol. 99, 1453–1462. doi:
[10.1099/jgv.0.001133](https://doi.org/10.1099/jgv.0.001133)

Duong, M.M., Carmody, C.M., Ma, Q., Peters, J.E., Nugen, S.R. (2020). Optimization of T4 Phage Engineering via CRISPR/Cas9. Sci. Rep. 10, 18229. doi:[10.1038/s41598-020-75426-6](https://doi.org/10.1038/s41598-020-75426-6)

García-Cruz, JC, Huelgas-Méndez, D, Jiménez-Zúñiga, JS, Rebollar-Juárez, X, Hernández-Garnica, M, Fernández-Presas, AM, Husain, FM, Alenazy, R, Alqasmi, M, Albalawi, T, Alam, P, García-Contreras, R. (2023). Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy. *PeerJ*, 21;11:e15272. doi: [10.7717/peerj.15272](https://doi.org/10.7717/peerj.15272).

García, R., Latz, S., Romero, J., Higuera, G., García, K., & Bastías, R. (2019). Bacteriophage Production Models: An Overview. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:[10.3389/fmicb.2019.01187](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01187)

Gill, Jason & Hyman, Paul. (2009). Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Current pharmaceutical biotechnology*. 11. 2-14. doi:[10.2174/138920110790725311](https://doi.org/10.2174/138920110790725311).

Golec, P, Karczewska-Golec, J, Łoś, M, Węgrzyn, G. (2014). Bacteriophage T4 can produce progeny virions in extremely slowly growing *Escherichia coli* host: comparison of a mathematical model with the experimental data. *FEMS MicrobiolLett.*, 351:156–161. doi:[10.1111/1574-6968.12372](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12372)

Golembo, M, Puttagunta, S, Rappo, U, Weinstock, E, Engelstein, R, Gahali-Sass, I, Moses, A, Kario, E, Ben-Dor Cohen, E, Nicenboim, J, Ben David, H, Sudakov, K, Cohen, A, Bassan, M, Zak, NB. (2022). Development of a topical bacteriophage gel targeting *Cutibacterium acnes* for acne prone skin and results of a phase 1 cosmetic randomized clinical trial. *Skin Health and Disease*, 2(2):1. doi: [10.1002/ski2.93](https://doi.org/10.1002/ski2.93).

Golkar, Z., Bagasra, O., Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *JIDC*. 8(02), 129-136. doi:[10.3855/jidc.3573](https://doi.org/10.3855/jidc.3573)

- Gordillo Altamirano, F.L., Barr, J.J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. (2019). *Clin. Microbiol. Rev.*, 32:1–25. doi: 10.1128/CMR.00066-18.
- Hao, C., Li, X., Tian, C., Jiang, W., Wang, G., Mao, C. (2014). Construction of RNA nanocages by re-engineering the packaging RNA of Phi29 bacteriophage. *Nat. Commun.*, 5,3890. doi: [10.1038/ncomms4890](https://doi.org/10.1038/ncomms4890)
- Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N. et al. (2012). Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol J* 9, 9. doi:10.1186/1743-422X-9-9
- Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Balcão, V. M. (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol. Res.*, 212-213, 38–58. doi:10.1016/j.micres.2018.04.007
- Hargreaves, KR, Clokie, MRJ. (2014). *Clostridium difficile* phages: still difficult? *Front. microbiol.*,5(2601):66. doi: 10.3389/fmicb.2014.00184.
- Hatfull, G.F. (2018). Mycobacteriophages. *Microbiol. Spectr.* 6, 5. doi: [10.1128/microbiolspec.GPP3-0026-2018](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0026-2018)
- Hatoum-Aslan, A. (2018). Phage Genetic Engineering Using CRISPR–Cas Systems. *Viruses*. 10, 335. doi: [10.3390/v10060335](https://doi.org/10.3390/v10060335)
- Henry, M., Debarbieux, L., (2012). Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond. *Virology*, 434 (2), 151–161. doi: [10.1016/j.virol.2012.09.017](https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.017)
- Henein, A. (2013). What are the Limitations on the Wider Therapeutic use of Phage? *Bacteriophage*, 3, (2).
- Hyman, P. (2019). Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35. doi:10.3390/ph12010035
- Jiang, Q., Song, C., Nangreave, J., Liu, X., Lin, L., Qiu, D., Wang, Z.-G., Zou, G., Liang, X., Yan, H., et al. (2012). DNA Origami as a Carrier for Circumvention of Drug Resistance. *J. Am. Chem. Soc.* 134:13396–13403. doi: 10.1021/ja304263n.

João, J., Lampreia, J., Prazeres, D. M. F., & Azevedo, A. M. (2021). Manufacturing of bacteriophages for therapeutic applications. *Biotechnology advances*, 49, 107758. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107758>

Jo, S.J., Kwon, J., Kim, S.G., Lee, S.-J. (2023). The Biotechnological Application of Bacteriophages: What to Do and Where to Go in the Middle of the Post-Antibiotic Era. *Microorganisms*. 11, 2311. [doi:10.3390/microorganisms11092311](https://doi.org/10.3390/microorganisms11092311)

Karimi, M., Mirshekari, H., Basri, S.M.M., Bahrami, S., Moghoofei, M., Hamblin, M.R. (2016). Bacteriophages and phage-inspired nanocarriers for targeted delivery of therapeutic cargos. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 106, 45–62. doi: [10.1016/j.addr.2016.03.003](https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.003)

Kiani, AK, Anpilogov, K, Dautaj, A, Marceddu, G, Sonna, WN, Percio, M, Dundar, M, Beccari, T, Bertelli, M. (2020). Bacteriophages in food supplements obtained from natural sources. *Acta Biomedica*, 91:e2020025. doi: [10.23750/abm.v91i13-S.10834](https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-S.10834).

Kick, B, Behler, KL, Severin, TS, Weuster-Botz, D. (2017). Chemostat studies of bacteriophage M13 infected *Escherichia coli* JM109 for continuous ssDNA production. *J Biotechnol.*, 258:92–100. doi: [org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.409](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.409)

Kiga, K., Tan, X.E., Ibarra-Chávez, R., Watanabe, S., Aiba, Y., Sato'o, Y., Li, F.Y., Sasahara, T., Cui, B., Kawauchi, M., et al. (2020). Development of CRISPR-Cas13a-Based Antimicrobials Capable of Sequence-Specific Killing of Target Bacteria. *Nat. Commun.*, 11:2934. doi: [10.1038/s41467-020-16731-6](https://doi.org/10.1038/s41467-020-16731-6).

Kilcher, S., Loessner, M.J. (2019). Engineering Bacteriophages as Versatile Biologics. *Trends Microbiol.* 27, 355–367. doi: [10.1016/j.tim.2018.09.006](https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.09.006)

Kilcher, S., Studer, P., Muessner, C., Klumpp, J., Loessner, M.J., Adhya, S. (2018). Cross-Genus Rebooting of Custom-Made, Synthetic Bacteriophage Genomes in L-Form Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 115:567–572. doi: [10.1073/pnas.1714658115](https://doi.org/10.1073/pnas.1714658115).

Kortright, K.E., Chan, B.K., Koff, J.L., Turner, P.E. (2019). Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Host Microbe.*, 25:219–232. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.014.

Kramberger, P., Honour, R.C., Herman, R.E., Smrekar, F., Peterka, M. (2010). Purification of the *Staphylococcus aureus* bacteriophages VDX-10 on methacrylate monoliths. *J. Virol. Methods.* 166:60–64. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.02.020

Krishnan, R, Tsubery, H, Proschitsky, MY, Asp, E, Lulu, M, Gilead, S, Gartner, M, Waltho, JP, Davis, PJ, Hounslow, AM, Kirschner, DA, Inouye, H, Myszk, DG, Wright, J, Solomon, B, Fisher, RA. (2014). A bacteriophage capsid protein provides a general amyloid interaction motif (GAIM) that binds and remodels misfolded protein assemblies. *J. Mol. Biol.*, 426(13):2500–2519. doi: 10.1016/j.jmb.2014.04.015.

Lee, JS, Kim, GH, Kim, J, Lim, TH, Yoon, Y, Yoon, SS. (2021). Large-Scale Production of *Cronobacter sakazakii* Bacteriophage Φ CS01 in Bioreactors via a Two-Stage Self-Cycling Process. *J MicrobiolBiotechnol.*, 28;31(10):1430-1437. doi: 10.4014/jmb.2107.07017.

Li, Y., Cao, B., Yang, M., Zhu, Y., Suh, J., Mao, C. (2016). Identification of Novel Short BaTiO₃-Binding/Nucleating Peptides for Phage-Templated in Situ Synthesis of BaTiO₃ Polycrystalline Nanowires at Room Temperature. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8:30714–30721. doi: 10.1021/acsami.6b09708.

Liu, S, Lu, H, Zhang, S, Shi, Y, Chen, Q. (2022). Phages against pathogenic bacterial biofilms and biofilm-based infections: a review. *Pharmaceutics*, 14(2):427. doi: 10.3390/pharmaceutics14020427.

Lobocka, M., Hejnowicz, M.S., Gagala, U., Weber-Dabrowska, B., Wegrzyn, G., Dadlez, M. (2018). The First Step to Bacteriophage Therapy: How to Choose the Correct Phage. In *Phage Therapy: Current Research and Applications. Caister Academic Press*, 23–67.

Luong, T., Salabarria, A.-C., Edwards, R.A., Roach, D.R. (2020). Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nat. Protoc.* 15:2867–2890. doi: 10.1038/s41596-020-0346-0.

Mancuso, F, Shi, J, Malik, DJ. (2018). High Throughput Manufacturing of Bacteriophages Using Continuous Stirred Tank Bioreactors Connected in Series to Ensure Optimum Host Bacteria Physiology for Phage Production. *Viruses.*, 1;10(10):537. doi: 10.3390/v10100537.

Manohar, Prasanth & Loh, Belinda & Athira, Sudarsanan & Nachimuthu, Ramesh & Hua, Xiaoting & Welburn, Susan & Leptihn, Sebastian. (2020). Secondary Bacterial Infections During Pulmonary Viral Disease: Phage Therapeutics as Alternatives to Antibiotics?. *Frontiers in Microbiology.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01434.

Mojica, KDA, Brussaard, CPD. (2014). Factors affecting virus dynamics and microbial host - virus interactions in marine environments. *FEMS MicrobiolEcol.*, 89:495–515. doi: 10.1111/1574- 6941.12343

Monjezi, R., Tey, B.T., Sieo, C.C., Tan, W.S. (2010) Purification of bacteriophage M13 by anion exchange chromatography. *J. Chromatogr. B.* 878:1855–1859. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.05.028

Morrisette, T, Kebriaei, R, Lev, KL, Morales, S, Rybak, MJ. (2020). Bacteriophage therapeutics: a primer for clinicians on phage-antibiotic combinations. *Pharmacotherapy.*,40(2):153–168. doi:10.1002/phar.2358

Morozova, V.V., Vlassov, V.V., Tikunova, N.V. (2018). Applications of Bacteriophages in the treatment of localized infections in humans. *Front. Microbiol.*, 9:1696. doi:10.3389/fmicb.2018.01696

Mullan, W. (2021). Isolation and Purification of Bacteriophages: <https://www.dairyscience.info/index.php/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>

Nabergoj, D., Kuzmic, N., Drakslar, B., and Podgornik, A. (2018). Effect of dilution ' rate on productivity of continuous bacteriophage production in cellstat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3649–3661. doi: 10.1007/s00253-018-8893-9

Nabergoj, D, Modic, P, Podgornik, A (2018). Effect of bacterial growth rate on bacteriophage population growth rate. *Microbiologyopen*, 7(2):e00558. doi:10.1002/mbo3.558

Naghizadeh, M., KarimiTorshizi, M. A., Rahimi, S., and Dalgaard, T. S. (2018). Synergistic effect of phage therapy using a cocktail rather than a single phage in the control of severe colibacillosis in quails. *Poult. Sci.* 98, 653–663. doi: [10.3382/ps/pey414](https://doi.org/10.3382/ps/pey414)

Nethery, M.A., Hidalgo-Cantabrana, C., Roberts, A., Barrangou, R. (2022) CRISPR-Based Engineering of Phages for in Situ Bacterial Base Editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 119, e2206744119. doi: [10.1073/pnas.2206744119](https://doi.org/10.1073/pnas.2206744119)

Oechslein, F., Piccardi, P., Mancini, S., Gabard, J., Moreillon, P., Entenza, J.M., Resch, G., Que, Y.-A. (2017). Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Endocarditis and Reduces Virulence. *J. Infect. Dis.*, 215, 703–712. doi: [10.1093/infdis/jiw632](https://doi.org/10.1093/infdis/jiw632)

Park, J., Kim, B., Song, S., Lee, Y.W., Roh, E. (2022). Isolation of Nine Bacteriophages Shown Effective against *Erwinia amylovora* in Korea. *Plant Pathol. J.* 38, 248. doi: [10.5423/PPJ.NT.11.2021.0172](https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2021.0172)

Park, J.Y., Moon, B.Y., Park, J.W., Thornton, J.A., Park, Y.H., Seo, K.S. (2017). Genetic Engineering of a Temperate Phage-Based Delivery System for CRISPR/Cas9 Antimicrobials against *Staphylococcus Aureus*. *Sci. Rep.*, 7:44929. doi: [10.1038/srep44929](https://doi.org/10.1038/srep44929).

Piddock, L.J.V. (2016). Reflecting on the Final Report of the O'Neill Review on Antimicrobial Resistance. *Lancet Infect. Dis.*, 16:767–768. doi: [10.1016/S1473-3099\(16\)30127-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30127-X)

Pirnay, J.P., Merabishvili, M., Van Raemdonck, H., De Vos, D., &Verbeken, G. (2017). Bacteriophage Production in Compliance with Regulatory Requirements. *Bacteriophage Therapy*, 233–252. doi:[10.1007/978-1-4939-7395-8_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_18)

Pirnay, J.P., Verbeken, G., Ceyssens, P.J., Huys, I., De Vos D., Ameloot, C., Fauconnier, A. (2018). *The Magistral Phage*. *Viruses*, 10:64. doi: [10.3390/v10020064](https://doi.org/10.3390/v10020064)

Pizarro-Bauerle, J., Ando, H. (2020). Engineered Bacteriophages for Practical Applications. *Biol. Pharm. Bull.*, 43:240–249. doi: [10.1248/bpb.b19-00914](https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00914).

Rathore, AS (2015). Continuous processing for production of biotech therapeutics. *PDA J Pharm SciTechnol*, 69:333. doi: [10.5731/pdajpst.2015.01072](https://doi.org/10.5731/pdajpst.2015.01072)

Regulski, K., Champion-Arnaud, P., Gabard, J. (2018). Bacteriophage Manufacturing: From Early Twentieth-Century Processes to Current GMP. *Bacteriophages*. Springer International Publishing, 1–31.

Rios, A.C., Moutinho, C.G., Pinto, F.C., Del Fiol, F.S., Jozala, A.F., Chaud, M.V., Vila, M.M.D.C., Teixeira, J.A., Balcão, V.M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. *Microbiol. Res.*, 191, 51–80. doi: [10.1016/j.micres.2016.04.008](https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.008)

Rios, A.C., Vila, M.M.D.C., Lima, R., Del Fiol, F.S., Tubino, M., Teixeira, J.A., Balcão, V.M. (2018). Structural and functional stabilization of bacteriophage particles within the aqueous core of a W/O/W multiple emulsion: a potential biotherapeutic system for the inhalational treatment of bacterial pneumonia. *Process Biochem.*, 64,177–192. doi:10.1016/j.procbio.2017.09.022

Rodríguez-Rubio, L., Gutiérrez, D., Donovan, D.M., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. (2016). Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Crit. Rev. Biotechnol.* 36 (3), 542–552. doi: [10.3109/07388551.2014.993587](https://doi.org/10.3109/07388551.2014.993587)

Roy, B, Philippe, C, Loessner, M, Goulet, J, Moineau S. (2018). Production of bacteriophages by *Listeria* cells entrapped in organic polymers. *Viruses* 10:324. doi:10.3390/v10060324

Salmond, G.P.C., Fineran, P.C., (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (12), 777–786. doi: [10.1038/nrmicro3564](https://doi.org/10.1038/nrmicro3564)

Selle, K., Fletcher, J.R., Tuson, H., Schmitt, D.S., McMillan, L., Vridhambal, G.S., Rivera, A.J., Montgomery, S.A., Fortier, L.C., Barrangou, R., et al. (2020). In Vivo Targeting of *Clostridioides Difficile* Using Phage-Delivered CRISPR-Cas3 Antimicrobials. *MBio.*, 11:1–12. doi: [10.1128/mBio.00019-20](https://doi.org/10.1128/mBio.00019-20).

Sharma, S., Datta, S., Chatterjee, S., Dutta, M., Samanta, J., Vairale, M.G., Gupta, R., Veer, V., Dwivedi, S.K. (2021). Isolation and Characterization of a Lytic

Bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 11, 19393
doi: [10.18502/ijm.v14i2.9189](https://doi.org/10.18502/ijm.v14i2.9189)

Shimamori, Y., Pramono, A.K., Kitao, T., Suzuki, T., Aizawa, S., Kubori, T., Nagai, H., Takeda, S., Ando, H. (2021). Isolation and Characterization of a Novel Phage SaGU1 That Infects *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from Patients with Atopic Dermatitis. *Curr. Microbiol.* 78, 1267–1276. doi: [10.1007/s00284-021-02395-y](https://doi.org/10.1007/s00284-021-02395-y)

Singh, A, Padmesh, S, Dwivedi, M, Kostova, (2022). I. How Good are Bacteriophages as an Alternative Therapy to Mitigate Biofilms of Nosocomial Infections. *Infect Drug Resist.*, 15:503-532. doi: [10.2147/IDR.S348700](https://doi.org/10.2147/IDR.S348700)

Skurnik, M. (2022). Can Bacteriophages Replace Antibiotics? *Antibiotics (Basel)*, 26;11(5):575. doi: [10.3390/antibiotics11050575](https://doi.org/10.3390/antibiotics11050575).

Smrekar, F., Ciringer, M., Jančar, J., Raspor, P., Štrancar, A., Podgornik, A. (2011). Optimization of lytic phage manufacturing in bioreactor using monolithic supports. *J. Sep. Sci.* 34:2152–2158. doi: [10.1002/jssc.201100182](https://doi.org/10.1002/jssc.201100182).

Sochocka, M., Tomczyk, T., Sobczynski, M., Szermer-Olearnik, B., and Boratyński, J. (2015). The kinetics of *Escherichia coli* B growth and bacteriophage T4 multiplication in SM-1 novel minimal culture medium. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 61, 75–81. doi: [10.2323/jgam.61.75](https://doi.org/10.2323/jgam.61.75)

Song, J, Ruan, H, Chen, L, Jin, Y, Zheng, J, Wu, R, Sun, D. (2021). Potential of bacteriophages as disinfectants to control of *Staphylococcus aureus* biofilms. *BMC Microbiology*, 21(1):57. doi: [10.1186/s12866-021-02117-1](https://doi.org/10.1186/s12866-021-02117-1).

Speck, P, Smithyman, A. (2016). Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. *FEMS MicrobiolLett* ,363(3) doi: [10.1093/femsle/fnv242](https://doi.org/10.1093/femsle/fnv242)

Storms, ZJ, Brown, T, Cooper, DG, Sauvageau, D, Leask, RL. (2013). Impact of the cell life-cycle on bacteriophage T4 infection. *FEMS MicrobiolLett*, 353:63–68. doi: [10.1111/1574-6968.12402](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12402)

Tao, P., Zhu, J., Mahalingam, M., Batra, H., Rao, V.B. (2019). Bacteriophage T4 Nanoparticles for Vaccine Delivery against Infectious Diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 145:57–72. doi: [10.1016/j.addr.2018.06.025](https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.025).

Teklemariam, A.D., Alharbi, M.G., Al-Hindi, R.R., Alotibi, I., Aljaddawi, A.A., Azhari, S.A., Esmael, A. (2022). Isolation and Characterization of Chi-like Salmonella Bacteriophages Infecting Two Salmonella *Enterica* Serovars, *Typhimurium* and *Enteritidis*. *Pathogens*. 11, 1480 [doi:10.3390/pathogens11121480](https://doi.org/10.3390/pathogens11121480)

Tlili, C., Sokullu, E., Safavieh, M., Tolba, M., Ahmed, M.U., Zourob, M. (2013). Bacteria screening, viability, and confirmation assays using bacteriophage-impedimetric/loop-mediated isothermal amplification dual-response biosensors. *Anal. Chem.* 85(10), 4893–4901 [doi:10.1021/ac302699x](https://doi.org/10.1021/ac302699x)

Tokman, J. I., Kent, D. J., Wiedmann, M., and Denes, T. (2016). Temperature significantly affects the plaquing and adsorption efficiencies of listeria phages. *Front. Microbiol.* 7:631. [doi: 10.3389/fmicb.2016.00631](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00631)

Torres-Barceló, C. (2018). Phage therapy faces evolutionary challenges. *Viruses*, 10:323. [doi: 10.3390/v10060323](https://doi.org/10.3390/v10060323)

Uyanga, T., (2015). Engineering M13 Bacteriophage Platforms for Cancer Therapy Applications, M.Sc Thesis. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge MA, USA.

Vandenheuvel, D., Rombouts, S., Adriaenssens, E.M. (2018). Purification of Bacteriophages Using Anion-Exchange Chromatography. In: Clokie M.R.J., *Bacteriophages*. 1681, 59–69.

Vandenheuvel, D., Singh, A., Vandersteegen, K., Klumpp, J., Lavigne, R., Van den Mooter, G. (2013). Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84:578–582. [doi: 10.1016/j.ejpb.2012.12.022](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.12.022).

Warner, C. M., Barker, N., Lee, S. W., and Perkins, E. J. (2014). M13 bacteriophage production for large-scale applications. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 2067–2072. [doi: 10.1007/s00449-014-1184-7](https://doi.org/10.1007/s00449-014-1184-7)

Watanabe, S., Cui, B., Kiga, K., Aiba, Y., Tan, X.E., Sato'o, Y., Kawauchi, M., Boonsiri, T., Thitiananpakorn, K., Taki, Y., et al. (2019). Composition and Diversity of CRISPR-Cas13a Systems in the Genus *Leptotrichia*. *Front. Microbiol.*, 10:2838. [doi: 10.3389/fmicb.2019.02838](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02838).

Weber-Dąbrowska, B, Jon'czyk-Matysiak, E, Z'aczek, M, Łobocka, M, Łusiak-Szelachowska, M, Go'risk,i A. (2016). Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. *FrontMicrobiol* 7:1177 doi: [10.3389/fmicb.2016.01177](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01177)

Wickramasinghe, S.R., Bower, S.E., Chen, Z., Mukherjee, A., Husson, S.M. (2009). Relating the pore size distribution of ultrafiltration membranes to dextran rejection. *J. Membr. Sci.* 340:1–8. doi: [10.1016/j.memsci.2009.04.056](https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.04.056).

Wolf, M.W., Reichl, U. (2011). Downstream processing of cell culture-derived virus particles. *Expert Rev. Vaccines*. 10:1451–1475. doi: [10.1586/erv.11.111](https://doi.org/10.1586/erv.11.111).

Wu, S, Zachary, E, Wells, K, Loe-Carrillo, C. (2013). Phage Therapy: Future Inquiries. *Postdoc. Journal.*, 1(6), 24-35.

Yang, M., Liang, Y., Huang, S., Zhang, J., Wang, J., Chen, H., Ye, Y., Gao, X., Wu, Q., Tan, Z. (2020). Isolation and Characterization of the Novel Phages VB_VpS_BA3 and VB_VpS_CA8 for Lysing *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol.* 11, 259. doi:[10.3389/fmicb.2020.00259](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00259)

Yehl, K., Lemire, S., Yang, A.C., Ando, H., Mimee, M., Torres, M.D.T., de la Fuente-Nunez, C., Lu, T.K. (2019). Engineering Phage Host-Range and Suppressing Bacterial Resistance through Phage Tail Fiber Mutagenesis. *Cell*. 179, 459–469.e9. □ doi: [10.1016/j.cell.2019.09.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.015)

Yosef, I., Kiro, R., Molshanski-Mor, S., Edgar, R., & Qimron, U. (2014). Different approaches for using bacteriophages against antibiotic-resistant bacteria. *Bacteriophage*, 4(1), 19549-54. doi: [10.4161/bact.28491](https://doi.org/10.4161/bact.28491)

Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., Qimron, U. (2015). Temperate and Lytic Bacteriophages Programmed to Sensitize and Kill Antibiotic-Resistant Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112:7267–7272. doi: [10.1073/pnas.1500107112](https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112).

Zhang, J., Ning, H., Lin, H., She, J., Wang, L., Jing, Y., Wang, J. (2022). Expansion of the Plaquing Host Range and Improvement of the Absorption Rate of a T5-like *Salmonella* Phage by Altering the Long Tail Fibers. *Appl. Environ. Microbiol.* 88, e00895-22. doi: [10.1128/aem.00895-22](https://doi.org/10.1128/aem.00895-22)

Zhang, X, Wang, S, Li, T, Zhang, Q, Zhang, R, Zhang, Z. (2021). Bacteriophage: a useful tool for studying gut bacteria function of housefly larvae,

Musca domestica. Microbiol. Spectr., 9(1):e0059921.doi: 10.1128/Spectrum.00599-21.

Zrelovs, N., Jansons, J., Kazaka, T., Kazaks, A., Dislers, A. (2023). Three Phages One Host: Isolation and Characterization of Pantoea agglomerans Phages from a Grasshopper Specimen. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 1820. doi:10.3390/ijms24031820

Zuo, ZT, Ma, Y, Sun, Y, Bai, CQ, Ling, CH, Yuan, FL. (2021). The protective effects of *Helicobacter pylori* infection on allergic asthma. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 182(1):53–64. doi: 10.1159/000508330.

1. Піофаг бактеріофаг полівалентний - інструкція, показання, склад, спосіб застосування <https://tabletki.ua/uk/%>

2. Інтестіфаг бактеріофаг полівалентний розчин по 10 мл №4 у флак. з криш.-крап. <https://tabletki.ua/uk>

3. Бактеріофаг стафілококовий
<https://tabletki.ua/uk/%D0%91%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%BE%D1%84%D0%B0%D0%B3-%D1%81%D1%82%D0%B0%D1%84%D0%B8%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D0%BE%D0%BA%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D1%8B%D0%B9/>

4. Дисбактеріоз кишечника та шляхи його корекції.
<https://www.bsmu.edu.ua/blog/4126-disbakterioz-kishechnika-ta-shlyahi-yogo-korektsii/>

5. Запальні захворювання кишківника <https://dila.ua/innovation/zapalni-zakhvoryvannya-kyshkivnyka.html>

6. Бактеріофаги. Фармацевтична енциклопедія
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1836/bakteriofagi>

7. Піофаг бактеріофаг полівалентний розчин по 20 мл №4 у флаконах .
Tabletki.ua <https://tabletki.ua/uk/>

8. Efficacy of antimicrobial preservation
<https://www.bdn.go.th/tp/ebook/qQWcA3t0pR9gC3q0GT5gMJq0qT5co3uw>

9. Лікарська форма. Фармацевтична енциклопедія.
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2076/likarska-forma>

10. Types of dosage forms and their definitions. R Ananthakumar, M.Pharm. School of Pharmaceutical Sciences Vels Institute of Science, Technology and Advanced Studies (VISTAS). <http://www.velsuniv.ac.in/NBA/itm-dosage-forms.pdf>

11. Рідкі лікарські форми. Виготовлення концентрованих розчинів. Національний фармацевтичний університет. Кафедра аптечної технології ліків ім. Д.П. Сала. <https://atl.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/02/07-%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D1%96-%D1%80%D0%BE%D0%B7%D1%87%D0%B8%D0%BD%D0%B8.pdf>

12. Первинна упаковка – особливості та призначення. BALENKO. <https://balenko.com/pervynna-upakovka-osoblyvosti-ta-pryznachennya/>

13. Тара, контейнери, закупорювальні засоби, пакувальні матеріали для фармацевтичної продукції. <https://tovaroved.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/06/Tara.pdf>

14. Класифікація виробничих приміщень. Фармацевтична енциклопедія. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>

15. Паспорт на Збірник РС-40/1. ТОВ «МПК – Промфарм» - 12 с.

16. Pall Solutions for the BioPharmaceutical Industry. Pall Corporation – 25 с.

17. FlowMem-025 ультрафільтраційна пілотна установка з пластинчастими мембранами https://bts.net.ua/ua/membrane_filter/membrane-pilot-plants/flowmem-025-ultraf-ltrac-yna-p-lotna-ustanovka-z-plastinchastimi-membranami/

18. Паспорт на Реактор РС-40. ТОВ «МПК – Промфарм» - 16 с.

19. Flexicon PF6-B peristaltic pump <https://www.geminibv.com/labware/flexicon-pf6-b-peristaltic-pump/>

20. Flexicon Liquid Filling. Operators Manual <https://www.wmfts.com/siteassets/catalog/products/corporate/flexicon/table-top-filling-machines/7519/literature/m-flexicon-pf22-en.pdf>

21. Інструкція з експлуатації та обслуговування. BWT Polska sp. z o.o. (Kates), Польща – 164 с.
22. Інструкція по експлуатації «Парові стерилізатори XG.DMA-1.0B та XG.DWF-1.5B» компанії Vanguard Pharmaceutical Machinery, Inc. США – 219 с.
23. Мийна машина HYDRA 1500 (Hydra. Linear vial washer) <https://ima.it/pharma/machine/hydra-series/>
24. Інструкція по експлуатації «Порядок експлуатації мийної машини HYDRA 1500-17-B та стерилізаційного тунелю BG 1250 FL». IMA (Італія) – 182 с.
25. Сухожаровий стерилізаційний тунель BG 1250 FL (Blue Galaxy. Depyrogenating Tunnels) <https://ima.it/pharma/machine/blue-galaxy-series/>
26. Pall Solutions for the BioPharmaceutical Industry. Pall Corporation – 25 с.
27. Керівництво з експлуатації Машини наповнення і закупорювання флаконів Sterifill. Попередня інформація. IMA (Італія) – 38 с.
28. Інспекційна машина для флаконів 90-AVSB/60 (Seidenader. Pharma Technology Solutions) http://www.bickel-wolf.com/files/lieferanten/SEIDENADER/dokumente/SDM_V90_EN.pdf
29. Инструкция по эксплуатации инспекционной машины для флаконов 90-AVSB/60. Seidenader Maschinenbau GMBH – 146 с.
30. Эtiquetировочная машина для цилиндрических контейнеров SENSITIVE 350 <https://effler.kz/p47460459-etiketirovochnaya-mashina-dlya.html>