

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

«До захисту в ЕК»
Директор інституту (декан факультету)
Наталія Грегірчак
(підпис) (імя та прізвище)

«__» __ лютий 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор Стабніков
(підпис) (імя та прізвище)

«__» __ лютий 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»
на тему: Нові мікробні метаболіти для потенційного використання в онкології

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 01

ВОЗНА Анастасія Віталіївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник РЕЗНИЧЕНКО Юрій Миколайович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти (прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Андрій КОТИНСЬКИЙ
(прізвище та ініціали) (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач _____
(підпис)

м. Київ – 2024 рік

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 «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і

мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ ” лютого 2024 року

З А В Д А Н Н Я НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ВОЗНА Анастасія Віталіївна

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Нові природні сполуки для потенційного використання в онкології

керівник роботи РЕЗНІЧЕНКО Юрій Миколайович, к.т.н., доцент,

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від “ ” 2024 року №

2. Строк подання здобувачем роботи

3. Вихідні дані до роботи

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; РОЗДІЛ 1. ПРИРОДНІ СПОЛУКИ З АНТИРАКОВИМ ЕФЕКТОМ, ЩО МОЖНА ОТРИМАТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ; РОЗДІЛ 2. РЕЧОВИНИ, ЩО ЗНАХОДЯТЬСЯ НА СТАДІЇ РОЗРОБКИ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ; РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВО РЕСВЕРАТРОЛУ; РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ; 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. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ; РОЗДІЛ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ РЕСВЕРАТРОЛУ; РОЗДІЛ 11. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ; РОЗДІЛ 12. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД.

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 1 лист А2 та А1; Технологічна схема 1 лист А3 та А2

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	Завдання Прийняв

7. Дата видачі завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Огляд літератури	01.11.2023-13.11.2023	
2	Техніко-економічне обґрунтування виробництва ресвератролу	13.11.2023-16.11.2023	
3	Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів.	16.11.2023-22.11.2023	
4	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	22.11.2023 – 25.11.2023	
5	Специфікація обладнання	25.11.2023-31.11.2023	
6	Опис технологічної схеми	31.11.2023 – 05.12.2023	
7	Контроль виробництва субстанції для імунобіютика	05.12.2023 – 13.12.2023	
8	Опис лікарського засобу згідно АНД	13.12.2023 – 18.12.2023	
	Графічна частина	18.12.2023 – 02.01.2024	
	Оформлення роботи та підготовка списку літератури	02.01.2024 - 20.01.2024	

Здобувач _____
(підпис)

Анастасія ВОЗНА _____
(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____
(підпис)

Юрій РЕЗНИЧЕНКО _____
(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

Представлено кваліфікаційну роботу в якій запропоновано виробництво протиракового препарату у вигляді твердих желатинових капсул культивуванням штаму *Rhodotorula toruloides* NP11. Концентрація ресвератролу під час ферментації – 125,2 мг/л. Кваліфікаційна робота включає в себе опис та складання технологічної та апаратурної схем після ферментаційних процесів, а також підготовка готової форми випуску препарату.

За техніко-економічним розрахунком потреба в даному препараті в Україні становить 88 кг на рік. Виробництво триватиме 330 днів з використанням ферментера об'ємом 30м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6. Тривалість самого біосинтезу 96 год. Розрахована потужність виробництва становить 1173333 л/рік культуральної рідини.

Кваліфікаційна робота викладена на 113 стор. друкованого тексту, містить 19 таблиць, і складається з вступу, 11 розділів, списку використаної літератури (127 джерел) та графічної частини (1 креслення формату A2 та A1).

Ключові слова: ресвератрол, *Rhodotorula toruloides* NP11.

ABSTRACT

A qualification paper is presented in which the production of an anticancer drug in the form of hard gelatin capsules by cultivation of *Rhodotorula toruloides* NP11 strain is proposed. The concentration of resveratrol during fermentation is 125.2 mg/l. The qualification work includes the description and compilation of technological and apparatus schemes after the fermentation processes, as well as the preparation of the finished form for the release of the drug.

According to the technical and economic calculation, the need for this drug in Ukraine is 88 kg per year. Production will last 330 days using a 30m³ fermenter with a fill factor of 0.6. The duration of the biosynthesis itself is 96 hours.

The estimated production capacity is 1173333 l/year of cultural liquid.

The qualification work is presented on 113 pages. printed text, contains 19 tables, and consists of an introduction, 11 chapters, a list of used literature (127 sources) and a graphic part (1 drawing of A2 and A1 format).

Keywords: resveratrol, Rhodotorula toruloides NP11.

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ПРИРОДНІ СПОЛУКИ З АНТИРАКОВИМ ЕФЕКТОМ, ЩО МОЖНА ОТРИМАТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ	9
1.1. Антибіотики	9
1.2. Бактеріюцини	11
1.3. Екзополісахариди.....	14
1.4. Ферменти	17
1.5. Нерибосомальні пептиди	23
1.6. Наночастинки	25
1.7. Інші речовини.....	28
РОЗДІЛ 2. РЕЧОВИНИ, ЩО ЗНАХОДЯТЬСЯ НА СТАДІЇ РОЗРОБКИ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	35
2.1. Речовини що проходять доклінічні дослідження	35
2.2. Речовини, що проходять клінічні дослідження	38
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВО РЕСВЕРАТРОЛУ	43
3.1. Аналіз онкологічної захворюваності	43
3.2. Захворюваність на рак в Україні	44
3.3. Потреба у виробництві ресвератролу	47
3.4. Розрахунок потужності виробництва.....	49
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ	51
4.1. Вибір способу та відповідного обладнання для відокремлення та біомаси .	52
4.2. Обґрунтування способу виділення та очищення субстанції	53
4.3. Обґрунтування вибору способу приготування кінцевої форми продукту....	56
РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ	59
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	61
6.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ресвератролу	61
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	63

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	65
8.1. Визначення вологовмісту	65
8.2. Мікробіологічна чистота	66
8.3. Якісне визначення ресвератролу	66
8.4. Карта постадійного контролю	67
РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	68
9.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу	68
9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень	68
9.3. Обґрунтування вибору підготовки вентиляційного повітря	70
9.4. Підготовка персоналу	71
9.5. Підготовки дезінфікуючих засобів.....	73
9.6. Обґрунтування форми випуску ЛЗ.....	76
9.7 Обґрунтування вибору упаковки ЛЗ	78
9.8. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	82
РОЗДІЛ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ВИРОБНИЦТВА ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ РЕСВЕРАТРОЛУ	86
10.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва препарату.....	86
РОЗДІЛ 11. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	89
РОЗДІЛ 12. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД.....	92
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:	98

ВСТУП

Дослідження та виклики ХХІ століття в галузі клінічної онкології впливають на зміну парадигми в структурі фундаментальних досліджень. Стратегія «швидкого поступу широким фронтом» до горизонту, за яким знаходиться успішне подолання раку, змінюється на тактику «захоплення» молекулярно-біологічних вершин, що дозволяє виявляти маркери і підбирати засоби до ключових мішеней у гетерогенній популяції пухлинних клітин з ознаками величезної міжіндивідуальної мінливості злоякісного процесу [1].

Рак - це аномальний ріст клітин. Ракові клітини швидко діляться, незважаючи на обмеження простору, поживні речовини, які спільно використовують інші клітини, або сигнали, що надсилаються з організму, щоб зупинити поділ. Ракові клітини часто відрізняються від здорових клітин, вони не функціонують належним чином і можуть поширюватися на багато ділянок тіла. Пухлини, аномальний ріст тканини, являють собою скупчення клітин, які здатні безконтрольно рости і ділитися; їх зростання не регулюється.

Не існує єдиного тесту, який може точно діагностувати рак. Повна оцінка пацієнта зазвичай вимагає ретельного збору анамнезу та фізичного огляду разом із діагностичним тестуванням. Щоб визначити, чи є у людини рак, чи інший стан (наприклад, інфекція) імітує симптоми раку, потрібно багато тестів. Ефективне діагностичне тестування використовується для підтвердження або усунення наявності захворювання, моніторингу процесу захворювання, а також для планування та оцінки ефективності лікування. У деяких випадках необхідно повторити тестування, коли стан людини змінився, якщо зібраний зразок був неякісним або потрібно підтвердити ненормальний результат тесту. Діагностичні процедури раку можуть включати візуалізацію, лабораторні дослідження (включаючи тести на онкомаркери), біопсію пухлини, ендоскопічне дослідження, хірургічне втручання або генетичне тестування.

Методи діагностики раку:

- лабораторні дослідження;
- діагностична візуалізація;

- ендоскопічні дослідження;
- генетичні тести;
- біопсія пухлини.

Наразі, сучасне суспільство дослідників шукають нові речовини, які можна використовувати в онкотерапії, оскільки вже відомі речовини, які зазвичай використовують в цих цілях, мають або невисоку ефективність або є токсичними для організму людини та наносять певну шкоду для здоров'я [1].

РОЗДІЛ 1. ПРИРОДНІ СПОЛУКИ З АНТИРАКОВИМ ЕФЕКТОМ, ЩО МОЖНА ОТРИМАТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМ ШЛЯХОМ

Рак – це складне, адаптивне та гетерогенне захворювання, спричинене широким спектром генетичних змін, які можуть погіршити здатність клітин нормально функціонувати. Більшість пухлин можна зменшити лише за допомогою звичайних онкологічних методів лікування, таких як хіміотерапія, променева терапія та хірургічне видалення, при цьому пухлина часто рецидивує. При цьому, нездатність звичайних методів лікування раку повністю знищити ракові стовбурові клітини, які інакше призводять до резистентності до терапії, вирішується за допомогою терапевтичних підходів, які зосереджені на націленні на ракові стовбурові клітини та їхню нішу в мікросередовищі [1].

1.1. Антибіотики

Мітраміцин А є клінічно схваленим ДНК-зв'язуючим протипухлинним антибіотиком, який зараз проходить другу фазу клінічних випробувань у Національних інститутах охорони здоров'я для лікування остеосаркоми [2]. Полікетид мітраміцин типу ауреолової кислоти має чудову цитотоксичність щодо різноманітних пухлин людини та використовується для лікування кількох типів раку, включаючи хронічний і гострий мієлоїдний лейкоз, карциному яєчок, гіперкальціємію та хворобу Педжета [3]. Цей антибіотик синтезується шляхом культивування *Streptomyces argillaceus* ATCC12596. Проте, дослідники вже одержали експресовані штами геном *mtmR* (кодує регулятор, подібний до SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein)), що дозволяє одержати близько 250 мг/л мітраміцину на 144 годині культивування [4].

Мітраміцин А – не єдиний антибіотик, який використовується для лікування раку. В табл.1.1. показано ще декілька прикладів таких речовин, які можна отримати біотехнологічним шляхом [5].

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ				
ЗМН	Арк.	№	Підпис	Дат	ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушіє	
Розроб.	Возна								
Перевір.	Резніченко						6	3 9	
						Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд.	Стабніков								

Походження та біологічна активність протипухлинних антибіотиків

Назва антибіотику	Біологічний агент	Ракові клітини людини / мішень	IC ₅₀
Актиноміцин D	<i>Actinomyces antibioticus</i>	Рак Вільмса, саркома Юінга, нейробластоми, трофобластичні пухлини	від 0,4 нМ до 0,42 мкМ
Блеоміцин	<i>Streptomyces verticillus</i>	Плоскоклітинний рак голови та шиї, хвороба Ходжкіна, неходжкінська лімфома, карциноми яєчок, рак яєчників, злоякісний плевральний випіт	від 25,2 нМ до 2,93 мМ
Доксорубіцин	<i>Streptomyces peucetius</i> var. <i>caesius</i>	Гостра лімфобластна лейкемія, гостра мієлобластна лейкемія, пухлина Вільмса, нейробластома, саркоми м'яких тканин і кісток, карцинома молочної залози, карцинома яєчників, перехідно-клітинний рак сечового міхура, карцинома щитовидної залози, карцинома шлунка, хвороба Ходжкіна, злоякісна лімфома, бронхогенний рак нома, плоскоклітинний рак ротової порожнини	від 548,2 нМ до 44,7 мкМ
Мітоміцин С	<i>Streptomyces caespitosus</i>	рак голови та шиї, легенів, молочної залози, шийки матки, сечового міхура, колоректальна та анальна карциноми, печінково-клітинна карцинома, меланома, рак шлунка та підшлункової залози	від 9,48 нМ до 249 мкМ

1.2. Бактеріюцини

Бактеріюцини — це катіонні пептиди, синтезовані рибосомами, які виробляються майже всіма групами бактерій. Деякі з бактеріюцинів демонструють вибірккову дію на ракові клітини. Відомо, що мембрана ракової клітини несе переважно негативний заряд через високий рівень аніонного фосфатидилсерину, О-глікозилізованих муцинів, сіалілізованих гангліозидів і сульфатів гепарину. Бактеріюцини за своєю природою є катіонними пептидами, тому вони переважно зв'язуються з негативно зарядженою клітинною мембраною ракових клітин порівняно з нормальними клітинними мембранами, які мають нейтральний заряд. Селективне зв'язування бактеріюцинів з раковими клітинами також можна пояснити відмінностями в плинності мембран ракових клітин. Ракові клітини мають вищу текучість мембрани порівняно з нормальними клітинами, і це сприяє легкій дестабілізації мембрани [6].

Відомо, що коліцини мають протиракову дію проти різних клітинних ліній пухлин людини *in vitro*, таких як рак молочної залози, рак товстої кишки, рак кісток і лінія клітин матки. Дослідження на мишах *in vivo* також показали захисну протиракову дію коліцинів. Прямі ін'єкції коліцину E3 в підшкірні вузли солідної НК-аденокарциноми показали 61% зниження середньої маси пухлини у мишей. Лікування коліцином А показало 43% подовжене виживання мишей з трансплантованою плазмоцитомою LP-2 [6].

Мікроцини — це бактеріюцини малого розміру (<10 кДа), що виділяються ентеробактеріями (переважно *Escherichia coli*), крім коліцинів, які є білками великого розміру. Мікроцин E492 (М-E492) — низькомолекулярний (7887 Да) бактеріюцин, який секретується *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Повідомляється про токсичну дію мікроцину E492 на різні лінії злоякісних клітин людини, такі як HeLa (людська аденокарцинома шийки матки), Jurkat (Т-клітина, отримана з гострого Т-клітинного лейкозу), RJ2.25 (варіант лімфоми Беркїтта) і колоректальний клітини карциноми. Jurkat був найбільш чутливим з усіх трьох ліній ракових клітин із 96% втратою життєздатності після 24 годин інкубації з 14 мкг/мл М-E492. Крім того, було показано, що М-E492 викликає апоптоз ракових

клітин при низьких концентраціях (10 мкг/мл) і некроз при більш високих концентраціях (20 мкг/мл) [6].

Піюцини виробляються більш ніж 90% штамів *Pseudomonas aeruginosa*. Початкові дослідження цих речовин на протиракову активність показали, що частково очищений піюцин, отриманий з *P. aeruginosa* за певних умов росту, містить білки, які є летальними для клітинної лінії фібробластів мишей L6OT. В 2004 році було повідомлено про цитотоксичну дію очищеного піюцину S2 і частково очищеного піюцину, виділеного з *P. aeruginosa* 42A, на лінії пухлинних клітин – HepG2 (гепатоцелюлярна карцинома людини) і Im9 (лінія клітин, що секретує імуноглобулін людини, отримана з множинної мієломи). Залежний від дози інгібуючий ефект піюцину S2 спостерігався на лініях пухлинних клітин, тоді як і піюцин S2, і частково очищений білок були абсолютно нетоксичними для людини. Лінія клітин Im9 була більш чутливою порівняно з HepG2, і максимальне пригнічення росту на 80% спостерігалось при максимальній концентрації піюцину 50 ОД/мл після 5 днів інкубації клітин при 37°C і 5% вуглекислого газу [6].

Це не всі приклади бактеріоцинів, які можуть використовуватись у онкотерапії. В табл.1.2. показано ще деякі приклади, які мають цитотоксичну дію.

Таблиця 1.2.

Походження та біологічна активність протипухлинних бактеріоцинів

Назва бактеріоцину	Біологічний агент	Ракові клітини людини / мішень	Джерело
Бовіцин HC5	<i>Streptococcus bovis</i> HC5	аденокарцинома молочної залози (MCF-7), гепатоцелюлярна карцинома печінки (HepG2)	[5]
Коліцини А та Е1	<i>Escherichia coli</i>	карцинома молочної залози (MCF7, ZR75, BT549, BT474, MDA-MB-231, SKBR3, T47D), остеосаркома (HOS), лейоміосаркома (SKUT-1), фібросаркома (HS913T)	[5,6]

Латероспорулін 10	<i>Brevibacillus</i> sp. SKDU10	рак шийки матки (HeLa), ембріональний рак нирки (HEK293T), фібросаркома (HT1080), карцинома легені (H1299) рак молочної залози (MCF-7)	[5]
Мікроміцин E492	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> RYC492	аденокарцинома шийки матки (HeLa), гострий Т- клітинний лейкоз (Jurkat), лімфома Беркітта (Ramos), В-лімфобластоїдні клітини (RJ2.25)	[5]
Нізін А	<i>Lactococcus lactis</i>	Плоскоклітинний рак голови та шиї (UM-SCC- 17B, UM-SCC-14A, HSC-3), аденокарцинома молочної залози (MCF-7), гепатоцелюлярна карцинома печінки (HepG2), гострий Т- клітинний лейкоз (Jurkat)	[5]
Нізін ZP	<i>Lactococcus lactis</i>	плоскоклітинний рак голови та шиї (UM-SCC- 17B, HSC-3)	[5]
Педіоцин CP2	<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i> MTCC 5101	аденокарцинома молочної залози (MCF-7), гепатокарцинома (Hep G2), аденокарцинома шийки матки (HeLa)	[5]

Педіоцин K2a2-3	<i>Pediococcus acidilactici</i> K2a2-3	аденокарцинома товстої кишки (HT29)	[5]
Педіоцин PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0	аденокарцинома легень (A-549), колоректальна аденокарцинома (DLD-1)	[6]
Педіоцин CP2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	аденокарцинома шийки матки (HeLa), аденокарцинома молочної залози (MCF-7), мієлома (Sp2/0-Ag 14), гепатокарцинома (Hep G2)	[6]
Плантарицин А	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	Т-клітинний лейкоз (Jurkat)	[5]
Піоцин S2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A	гепатоцелюлярна карцинома (HepG2), множинна мієлома (Im9), аденокарцинома шийки матки (HeLa), ембріональна карцинома яєчників (AS-II)	[5]
Коліцин E3	<i>Escherichia coli</i>	аденокарцинома шийки матки (HeLa), фібросаркома (HS913T)	[6]
Смегматоцин	<i>Mycobacterium smegmatis</i> 14468	аденокарцинома шийки матки (HeLa AS-II), карцинома шлунка (HGC-27), інвазивна аденокарцинома протоків молочної залози (KS-A TU-7)	[6]

1.3. Екзополісахариди

Бактеріоцини зазвичай синтезують пробіотичними мікроорганізмами. Крім цих речовин, ці біологічні агенти синтезують також і екзополісахариди, деякі з яких мають протиракові властивості. Екзополісахариди з безпечних природних

джерел, таких як молочнокислі бактерії, зазвичай мають низьку цитотоксичність і побічні ефекти, і можуть служити хорошою заміною синтетичним протипухлинним агентам. Визначено антипроліферативну дію EPS *L. casei* 01 на лінію клітин HT-29. Також, екзополісахариди *Lactobacillus plantarum* 70810 показали значну протипухлинну активність щодо HepG-2, BGC-823, особливо проти ракових клітин HT-29 [7].

Пробіотики можуть пригнічувати ріст пухлинних клітин шляхом пригнічення бактерій, що виробляють ферменти β -глюкозидазу, β -глюкуронідазу та азоредуктазу, які каталізують перетворення проканцерогенів у проксимальні канцерогени. Крім того, пробіотики можуть знищувати канцерогени, такі як нітрозаміни, шляхом інактивації ферменту нітроредуктази, що може зменшити ризик впливу генотоксинів на просвіт товстої кишки. Механізм протипухлинної дії полісахаридів полягає у стимуляції певних компонентів імунної системи, головним чином Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, та індукції вивільнення інтерлейкіну NK-клітинами [7].

L. helveticus MB2 $\square$ 1 синтезує гетерополісахарид, який складається з глюкози, манози, галактози, рамнози і арабінози. Одержати таку речовину дозволяє поживне середовище, яке містить 80 г/л молочної сироватки та 5 г/л дріжджового екстракту. Даний екзополісахарид, як і речовини з *L. plantarum* 70810, мають високу цитотоксичну активність проти ліній раку HepG-2, BGC-823 та HT-29. Екзополісахарид пригнічує ракові клітини на $40,98 \pm 0,62\%$, $38,75 \pm 0,74\%$ та $80,05 \pm 3,04\%$ відповідно [8].

Rhodococcus erythropolis HX-2 також синтезує гетерополісахарид. Ця речовина містить глюкозу, галактозу, фукозу, манозу і глюкуронову кислоту. Зазначений біологічний агент може синтезувати близько 8,957 г/л. Середовище, яке використовується, має наступний склад (г/л): K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 0,2 г, $NaCl$ – 1, $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0,002, $(NH_4)_2SO_4$ – 1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5, $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0,001, $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 0,001, $MnSO_4 \times H_2O$ – 0,001, $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0,01, $Na_3 C_6 H_5 O_7$ – 20, $NaNO_3$ – 10. *In vitro* протипухлинну активність очищеного полісахариду оцінювали на ракових клітинах A549, клітинах раку печінки SMMC-

7721 і клітинах раку шийки матки Hela. Гетерополісахарид пригнічував ріст ракових клітин на 21,86%, 31,24% та 37,65 % при концентрації 800 мкг/мл [9].

Ще один пробіотичний штам - *Bifidobacterium breve* lw01, також синтезує полісахарид, що містить рамнозу, арабінозу, галактозу, глюкозу і манозу. Дана речовина продемонструвала протиракову дію проти лінії клітин плоскоклітинного раку голови та шиї (SCC15, CAL 27, WSU-HN6) шляхом регулювання зупинки клітинного циклу та стимулювання апоптозу клітин. На 5 день екзополісахарид пригнічував ріст WSU-HN6 на 46% при 200 мкг/мл в аеробному середовищі [10].

Термофільні бактерії також є гарними джерелами нових екзополісахаридів. Таким прикладом може бути штам *Anoxybacillus gonensis* YK25. Максимальний вихід речовини, який можна досягти на середовищі, що містить 100 мл/л меляси та 6 г/л пептону, становить 4,4 г/л. Оптимальними умовами культивування є початковий pH 7,0, температура 55 °C, час інкубації 96 год. Такий екзополісахарид містить ксилозу, сахарозу, глюкозу і галактозу. Речовина продемонструвала протипухлинну активність проти клітинних ліній SHSY-5Y, HT-29, DU-145 і A-549. Значення IC₅₀ визначено як 15,62, 17,35, 9,61 та 5,5 мг/мл відповідно [11].

Bacillus albus DM-15, виділений з індійської аюрведичної традиційної мікстури Dasamoolarishta. Даний мікроорганізм синтезує екзополісахарид, який складається з глюкози, галактози, рамнози та ксилози. *B. albus* DM-15 синтезує близько $290 \pm 0,78$ мг/л полісахариду. Екзополісахарид продемонстрував багатообіцяючу цитотоксичну активність ($20 \pm 0,97$ мкг/мл) проти клітин карциноми легенів (A549) [12].

Mucor sp. має широкий спектр застосування в промисловості харчової ферментації. Але, нещодавно було виділено новий екзополісахарид, позначений MSEPS, який синтезується на картопляно-декстрозному бульйоні в кількості 314 мг/л. MSEPS складався в основному з манози, галактози, фукози, арабінози та глюкози. Аналіз показав, що MSEPS пригнічував проліферацію клітин карциноми (клітини SGC-7901). Крім того, морфологічний аналіз і експерименти з проточною цитометрією показали, що MSEPS сприяє загибелі клітин SGC-7901

через апоптоз. При найвищій дозі 1,6 мг/мл швидкість інгібування клітин SGC-7901 протягом 12 годин, 24 годин або 36 годин становила 42,47%, 47,21% і 50,65% відповідно [13].

Ще один гриб - *Ganoderma* sp. TV1, також синтезує екзополісахарид, що містить глюкозу та галактозу. Для культивування цієї сполуки оптимальними факторами виявилось значення рН, що становить 6,5 та температура - 23°C. Дана речовина інгібує клітини раку легень A549 на 61,8 %, а тому може бути потенційно гарним протипухлинним засобом [14].

S. hirsutus NRC2018 – це морський актиноміцет, який синтезує екзополісахарид, що складається з глюкуронату, галактуронату, глюкози, манози та арабінози. Відмічається, що дана субстанція (скорочена назва - EPSNC2), має високу цитотоксичну дію проти клітин раку CaCo-2 (колоректальна аденокарцинома). Цитотоксичний ефект збільшився до 44,8% і 75% при 250 і 500 мкг/мл відповідно. IC₅₀ було оцінено як 295,1 мкг/мл [15].

1.4. Ферменти

L-аспарагіназа є важливим хіміотерапевтичним засобом для лікування гострого лімфобластного лейкозу та інших злоякісних новоутворень гемопоезу. Перше клінічне випробування L-аспарагінази було проведено в 1966 році. Сучасні препарати аспарагінази використовуються для лікування гострого лімфобластного лейкозу протягом тривалого часу, але ці препарати не позбавлені побічних реакцій [16].

L-аспарагінази були виявлені не тільки у ссавців, але також у птахів, рослин, бактерій (наприклад, *E. coli*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Mycobacteria*, *Pseudomonas* і види *Acinetobacter* та ін.), а також грибів (*Aspergillus*, *Fusarium* spp. та ін.). *B. licheniformis* нещодавно була оцінена для виробництва l-аспарагінази з низькою глутаміназною активністю. Так само помірно галофільні бактерії нещодавно показали продукцію l-аспарагінази. Не всі аспарагінази володіють протираковою активністю, і в даний час єдиними препаратами, доступними для медичного використання, є *E. coli*, *Erwinia*, аспарагінази хризантеми та їх похідні [16].

Наразі, активно вивчається L-аспарагіназа у комбінації з різними наночастинками. Селен є рідкісноземельним неметалом і необхідним мікроелементом для тварин, а також мікроелементом для людини. Відомо, що він функціонує як кофактор для відновлення антиоксидантних ферментів, таких як глутатіонпероксидаза. Нанобіокомпозит селену з аспарагіназою мав розмір частинок в 20–30 нм. Цю субстанцію було перевірено проти ракових ліній HT-29, MG-63 і HEP2O. Композит виявив цитотоксичність 93,62, 94,24 і 87,68% відповідно для концентрації субстанції в 1000 мкг/мл [17].

Церій-селенові нанобіокомпозити з грибковою аспарагіназою також мають високий цитотоксичний ефект. Було встановлено, що розмір нанокompозиту знаходився в діапазоні 60–90 нм. Наночастинки мали сферичну форму. Протипухлинну активність перевіряли щодо клітин лінії раку легень A549, що призвело до 70,84% для максимальної концентрації 1000 мкг/мл і 48,78% токсичності для концентрації IC_{50} 125 (мкг/мл) відповідно [18].

В іншому дослідженні L-аспарагіназу було включено до нанобіокомпозиту, синтезованого з використанням β -циклодекстину та хітозану. Було встановлено, що розмір нанокompозиту коливається в межах 40 - 80 нм та має сферичну форму. Протиракова активність клітинних ліній раку простати показує, що нанобіокомпозит має кращу активність у концентрації 125 мкг/мл. Протиракова активність нанобіокомпозиту проти ракових клітин лімфоми (U937) демонструє значення IC_{50} при 500 мкг/мл нанобіокомпозиту β -циклодекстрин-аспарагінази. Флуоресцентні мікроскопічні зображення, отримані для нанобіокомпозиту β -циклодекстрин-аспарагіназа, чітко демонструють терапевтичний ефект нанобіокомпозиту проти клітинних ліній раку простати та лімфоми [19].

Ще в одній роботі було створено нанокompозит, що містить в собі наночастинки золота, L-аспарагіназу та пептид на основі аргініну, гліцину та аспартату. Розмір нанокompозиту становив близько 20-50 нм та мав сферичну форму. Кон'югат продемонстрував націлювання на пухлину MCF-7. Ступінь інгібування, показав значення цитотоксичності в 60,7%, відповідно,

zareestrovanoю pri koncentraciji 400 mkg/ml. Kon'jugat prodemonstruvav najsilniju ta znacno viju citotoksicnu aktivnist', коли використовували значення IC_{50} 89,8 мкг/мл. Значення життєздатності клітин при 400 мкг/мл становив 83,3% [20].

Крім модифікації вживаної L-аспарагінази, дослідники шукають нові біологічні агенти, які можна потенційно використовувати для одержання цитотоксичного ферменту. Такі приклади показано в таблиці 1.3.

Таблиця 1.3.

Потенційні продуценти L-аспарагінази з цитотоксичними властивостями

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Умови культивування	Активність ферменту	Лінія ракових клітин	IC ₅₀	Джерело
<i>B. licheniformis</i>	Аспарагін – 2, K ₂ HPO ₄ – 1, KH ₂ PO ₄ – 10, MgSO ₄ – 0,5, Гель альгінату – 4, Глюкоза – 10, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 1	37 °C, 3 дні, 250 об/хв, pH 6,5	36,08 Од/мг ферменту	HepG-2	11,66 мкг/мл	[21]
				MCF-7	14,55 мкг/мл	
				HCT-116	17,02 мкг/мл	
<i>P. aeruginosa</i> P31	Na ₂ HPO ₄ – 6, KH ₂ PO ₄ – 3,	37 °C, 16-18 год, 150 об/хв, pH 7,2	8,22 Од/мл	HeLa	86,73 мкг/мл	[22]
<i>P. aeruginosa</i> P32	NaCl – 0,5, Глюкоза – 1,		19,45 Од/мл		57,65 мкг/мл	
<i>P. aeruginosa</i> P34	MgSO ₄ – 0,24, CaCl ₂ – 0,01		19,14 Од/мл		40,34 мкг/мл	
<i>Rhizopus oryzae</i> AM16	Глюкоза – 4,5, NaHCO ₃ – 1,5, Піруват натрію – 0,11, NEPES – 2,4, Глутамін – 0,3	28±2°C, статичні умови, pH 5,8, вологість 85,7%, 8 днів	2875,9 Од/г сухого субстрату	HepG2	23,4 мкг/мл	[23]
				MCF-7	72,4 мкг/мл	
				HCT	23,6 мкг/мл	
				A549	28,6 мкг/мл	
<i>B. velezensis</i>	Аспарагін – 2, K ₂ HPO ₄ – 1, KH ₂ PO ₄ – 10, MgSO ₄ – 0,5, Гель альгінату – 4	37 °C, 3 дні, 100 об/хв, pH 6,5	31,77 Од/мг ферменту	MDA-MB-231	12,6 ± 1,2 мкг/мл	[24]
				MCF-7	17,3 ± 2,8 мкг/мл	
<i>S. rochei</i> subsp. <i>chromatogenes</i> NEAE-K	Дріжджовий екстракт – 3, Декстроза – 2,6, Аспарагін – 7, Фруктоза – 4, Пшеничні висівки та соєвий шрот – 15, CaCl ₂ – 0,01, FeSO ₄ ×7H ₂ O – 0,02, K ₂ HPO ₄ – 2, NaCl – 0,1, KNO ₃ – 1, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,5	37 °C, 7 днів, 150 об/хв, pH 6,7	175,96 Од/г сухого субстрату	HeLa	2,16 ± 0,2 Од/мл	[25]
				HepG-2	2,54 ± 0,3 Од/мл	

Аргініндеїміназа — це добре відома гуанідино-модифікуюча гідролаза, яка каталізує перетворення L-аргініну на цитрулін та аміак. Їх біопотенціал регресувати пухлини за допомогою амінокислотної деприваційної терапії потенційно може використовуватись в онкотерапії. Пегільована композиція рекомбінантної аргініндеїмінази знаходиться на останній фазі клінічних випробувань проти різних аргінін-ауксотрофних видів [26].

P. aeruginosa PS2 здатна синтезувати аргініндезаміназу. Протиракову активність ADI оцінювали на панелі клітинних ліній раку людини (LS-180, HCT-116, MCF-7, BT-549, T47D, HL-60, MOLT-4, K-562 і PC-3). Найнижча IC₅₀ 1,2 Од/мл була зареєстрована з клітинами MCF-7 [27].

Аргініндеїміназа також синтезується молочнокислими бактеріями. Прикладом може бути *Enterococcus faecium* GR7. Активність ферменту після очистки становила 76,65 Од/мг ферменту. Одержаний препарат володіє цитотоксичними властивостями. Ензим перевіряли проти клітин лінії раку MCF-7, Sp2/0-Ag14 та Нер-G2. Найкращий результат аргініндеїміназа показала проти клітин Нер-G2, а показник IC₅₀ становив 1,95 мкг/мл [28].

Інші молочнокислі бактерії - *Lactobacillus* sp., також можуть синтезувати зазначений фермент з протираковою дією. Активність ферменту в культуральному середовищі становила 7,3 Од/мл, а після очистки становила 48,6 Од/мг ферменту. Очищена аргініндеїміназа пригнічує проліферацію ракових клітинних ліній PC3 і A375 зі значеннями IC₅₀ 68,64 г/мл і 136,3 г/мл відповідно. При концентрації 6,25 мкг/мл життєздатність клітин PC3 і A375 становила 94,83% і 95,68% після обробки препаратом очищеної аргініндеїмінази відповідно. Проте життєздатність клітин досягала 42,52% і 48,77% при використанні 400 мкг/мл очищеного ферменту [29].

L. plantarum p5 — ще одна бактерія, яка може синтезувати аргініндеїміназу. Результати досліджень цього ферменту показали важливість для проліферації клітинної лінії AMN3. На 72 годині взаємодії ферменту та клітин відмічається ступінь інгібування до 97%, що безумовно є дуже високим результатом [30].

Часто для одержання ферментів використовуються методи генної інженерії. Біосинтез аргініндеїмінази це не оминуло. Для одержання цього ензиму використовували гени синтезу *P. furukawaii*. Ген *PfADI* трансформували в *E. coli* BL21. Активність ферменту в культуральній рідині становила 1,9 Од/мл. Препарат виявляв цитотоксичну дію проти клітинної ракової лінії НерG2. Показник IC₅₀ становив 0,195 Од/мл, що еквівалентно 0,007 мкг/мл [31].

В табл.1.4. показано ще декілька прикладів продуцентів, які потенційно можуть синтезувати аргініндеїміназу з цитотоксичними властивостями.

Таблиця 1.4.

Потенційні продуценти аргініндеїмінази з цитотоксичними властивостями

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Умови культивування	Активність ферменту	Джерело
<i>P. putida</i> KT2440	Глюкоза – 10, Дріжджовий екстракт – 12,5 Пептон – 7,5, Аргінін – 3, Тритон X-100 – 3	pH 8,0, 25 °C, 30 год	4,31 Од/мл	[32]
<i>Vibrio alginolyticus</i> 1374	Мальтоза – 20, Соевий шрот – 20, Аргінін – 20, NaCl – 100	pH 8,0, 37 °C, 120 год, 120 об/хв	192 Од/мл	[33]
<i>E. coli</i> BL21 трансформований <i>pET32</i> плазмідом	Na ₂ HPO ₄ – 7,1, KH ₂ PO ₄ – 6,8, NH ₄ Cl – 2,7, Na ₂ SO ₄ – 0,71, MgSO ₄ ×7H ₂ O – 0,45, Гліцерин – 12,5, Глюкоза – 0,5, Лактоза – 0,1, Пантотенат – 0,002, Тіамін – 0,002, Піродоксин – 0,002, Біотин – 0,002	pH 7,2, 28-37 °C, 18 год	30-34 Од/мг ферменту	[34]
<i>E. coli</i> BL21 трансформований <i>pET28a</i> плазмідом	Триптон – 10, Дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 5, Канаміцин – 0,1, ПТГ – 0,24	pH 7,4, 37 °C, 18 год, 150 об/хв	10 Од/мг ферменту	[35]

1.5. Нерибосомальні пептиди

Нерибосомальні пептиди є вторинними біоактивними метаболітами, синтезованими ферментними комплексами та нерибосомною пептидсинтетазою. Повідомляється, що багато біоактивних метаболітів мають гібридний кластер біосинтетичних генів, що робить їх більш складними. Завдяки складному механізму біосинтезу ці молекули мають складні та різноманітні структури. Проте багато з цих складних біологічно активних метаболітів, як повідомляється, мають різну протипухлинну дію з різними механізмами дії, що підтверджує терапевтичний потенціал для лікування раку [36].

Екстракт *Pseudomonas* sp. In5 перевірили на наявність цитотоксичної активності. Як виявилось згодом, суміш містить в собі 2 нерибосомальні пептиди – нунаміцин та нунапептин. Потенційно, ці препарати можна використовувати проти Т-клітини Jurkat, клітини Granta та клітини меланоми [37].

Лейциностатини можна знайти в *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinus*), *Metarhizium marquandii* (*P. marquandii*) і *Acremonium* sp. Лейциностатини мають різні біологічні дії, такі як антибактеріальні, протигрибкові, цитотоксичні та фітотоксичні властивості з пригніченням окисного фосфорилування та синтезу АТФ. Лейциностатин А пригнічує ріст клітин раку простати, перешкоджаючи експресії інсуліноподібного фактора росту-I [38].

Ефрапептини в основному виробляються *Tolypocladium niveum* (*T. inflatum*, *Beauveria nivea*) і *T. geodes*, але також зустрічаються в *Acremonium* sp. та *M. anisopliae*. Ефрапептини мають протигрибкову, протималярійну, інсектицидну та протипухлинну дії. Наразі відомо, що ефрапептин J пригнічує клітини раку шлунка HT1080 [38].

Ентомопатогенний гриб *Culicinomyces clavisporus* LL-12I252 продукує куліциніни. Це декапептиди з чотирма аналогами (A–D). Куліцинін D може вибірково інгібувати клітини раку молочної залози MDA 468.

Ентомопатогенний гриб *T. geodes* (*B. geodes*) продукує LP237 з трьома аналогами. LP237 F8 є цитотоксичним для клітин лейкемії миші P388D1 і пухлинних клітин людини, таких як рак легенів A549, рак яєчників OVCAR3, рак товстої кишки SW620 і рак молочної залози MCF7. Він має синергетичну дію з іншими протипухлинними пептидами [38].

T. longibrachiatum виробляє лонгібрахін, який є пептайболом із 20 залишками амінокислоти. Знайдено шість аналогів лонгібрахіну. Вони токсично впливають на клітини KB (ракові клітини епідермоїду порожнини рота людини). Трихогін GA IV одержано зі штаму *T. longibrachiatum* M3431. Він токсичний для деяких пухлинних клітин людини (мононуклеарний HL60 при мієлолейкозі, HeLa при саркомі яєчників, A431 при епідермоїдному раку та A549 при раку легенів) [38].

Trichoderma koningii і *T. pseudokoningii* є поширеними мікопаразитарними грибами, які використовуються для боротьби з грибовими фітопатогенами хвороб овочів і фруктових дерев. Вони можуть виробляти трихоконіни, які також містяться в *T. longibrachiatum*. Ці речовини дуже токсичні для клітин гепатоцелюлярної карциноми HepG2, клітин раку легенів A549 і клітин раку шлунка BGC823, що призводить до апоптозу [38].

Атровіридини та неоатровіридини синтезуються *T. atroviride* F80317. Вони мають значну цитотоксичність щодо клітинних ліній раку людини, таких як простата (PC-3), меланома (UACC62) і лейкемія (K562) зі значеннями IC₅₀ 2–4 мкг/мл [38].

Рекомбінантні штами *Saccharomyces cerevisiae* здатні до синтезу нерибосомального пептиду Gurma. Наразі дана речовина відома як медичний продукт у дослідженнях трансдукції солодкого смаку, проте є інформація, яка припускає наявність протипухлинної активності у цієї речовини. До списку нерибосомальних пептидів з цитотоксичною активністю, які можуть синтезувати сахароміцети, відносять й блеоміцини. Блеоміцин A2 і B2 є основним компонентом клінічного препарату бленоксану. Плоскоклітинний рак, лімфоми, рак стравоходу, рак яєчок і непокірні бородавки лікували бленоксаном [39].

В табл.1.5. показано ще декілька прикладів нерибосомальних пептидів, які володіють протипухлинною дією.

1.6. Наночастинки

A. niger RCMВ 002002 здатен до синтезу наночастинок сульфід кадмію, які володіють цитотоксичним ефектом. Скануюча електронна мікроскопія виявила наявність сферичних частинок розміром приблизно 5 нм. Розмір частинок

Таблиця 1.5.

Походження та біологічна активність протипухлинних нерибосомальних пептидів

Назва нерибосомального пептиду	Біологічний агент	Ракові клітини людини / мішень	IC ₅₀	Джерело
Аренаміди А, В	<i>Salinispora arenicola</i>	карцинома товстої кишки людини (HCT-116)	1,7–3,7 мкМ	[5]
Аріакеміцини А, В	<i>Rapidithrix</i> sp.	рак легенів людини (A549)	25,4–42,3 мкМ	[5]
Галолітораліни А–С	<i>Halobacillus litoralis</i> YS3106	пухлина шлунка людини (BGC)	-	[5]
Гептапептид	<i>Paenibacillus profundus</i>	меланома людини (SK-MEL-28)	3,07 мкМ	[5]
Йодоглюкомід В	<i>Bacillus licheniformis</i>	рак легенів людини, рак шлунка людини	-	[5]
Iso-C16 фенгіцин В, антиізо-C17 фенгіцин В, майовенсін А	<i>Bacillus mojavenis</i> B0621A	лейкемія людини (HL-60)	1,6–100 мМ	[5]
Лайоламіцин	<i>Streptomyces nodosus</i> NPS007994	мишача меланома (B16-F10)	-	[5]
Люцентаміцини А, В	<i>Nocardiopsis lucentensis</i> CNR-712	клітини карциноми товстої кишки людини (HCT-116)	0,2–11 мкМ	[5]

Мехерчарміцин А	<i>Thermoactinomyces</i> sp. YM3-251	клітини раку легенів людини (A549), лейкемія людини (Jurkat)	400–460 мкМ	[5]
Міксірини А–С	<i>Bacillus</i> sp.	пухлина товстої кишки людини (НСТ-116)	0,65–1,6 мкМ	[5]
Омюнгсамицини А і В	<i>Streptomyces</i> sp.	різноманітні ракові клітини	від 359 нМ до 16,8 мкМ	[5]
Паданамід А, В	<i>Streptomyces</i> sp.	лейкемія людини (Jurkat)	30,9–90,7 мкМ	[5]
Піперазіміцини А–С	<i>Streptomyces</i> sp.	кілька ліній пухлинних клітин	-	[5]
Проксиміцини А–С	<i>Verrucosispora</i> sp. MG-37 і AB-18-032	аденокарцинома шлунка людини (AGS), гепатоцелюлярна карцинома людини (HepG2), карцинома молочної залози людини (MCF 7)	-	[5]

Уруктапельстатин А	<i>Mechercharimyces asporophorigenens</i> YM11-542	рак легенів людини (A549, DMS114, NCIH460), рак яєчників (OVCAR-3, OVCAR-4, OVCAR-5, OVCAR-8, SK-OV3), рак грудей (MCF-7), рак товстої кишки (HCT-116)	12 нМ	[5]
Саліноспораміди	<i>Salinispora tropica</i> CNB-392	недрібноклітинний рак легені NCI-H226, пухлина мозку SF-539, меланома SKMEL-28, меланома MDA-MB-435	-	[36]
Спірухостатин А	<i>Pseudomonas</i> sp.	Фібробласти, ідіопатичний легеневий фіброз	-	[36]
Симплокамід А	<i>Symploca</i> sp.	нейробластома-2А Н-460	-	[36]
Тіокоралін	<i>Micromonospora</i> sp. L-13-ACM2-092	P-388, A549, MEL-28, LoVo, SW620 рак товстої кишки людини	-	[36]

варіюється від 2,7 до 7,5 нм. Біосинтезовані наночастинки мають цитотоксичну активність із показником IC_{50} 190 мкг/мл проти MCF7, 246 мкг/мл проти PC3 та 149 мкг/мл проти клітинних ліній A549 [40].

До синтезу наночастинок оксиду цинку здатні *Streptomyces* sp. Топографічні дослідження поверхні показали, що біосинтезовані наночастинки

мали сферичну форму із середнім діаметром приблизно 20–50 нм. Протиракову активність синтезованих наночастинок оцінювали проти клітин раку легенів A549. Показник IC_{50} становив 15,6 мкг/мл [41].

Морські бактерії *V. alginolyticus* можуть синтезувати наночастинок золота. Розмір частинок був оцінений приблизно в 100–150 нм. Протиракова активність цих речовин карциноми товстої кишки була підтверджена за допомогою аналізу МТТ (колориметричний тест для оцінки метаболічної активності клітин), тоді як загибель клітин, опосередковану апоптозом, спостерігалася за допомогою флуоресцентного аналізу. Біосинтезовані наночастинок золота показали дозозалежний інгібуючий ефект на ріст клітин раку товстої кишки. IC_{50} становив 15 мкг/мл, а максимальне пригнічення загибелі клітин було досягнуто (>75%) при обробці 25 мкг/мл. Загибель клітин, опосередкована апоптозом, спостерігається через ядерну конденсацію оброблених клітин [42].

1.7. Інші речовини

Використання фітохімічних речовин у боротьбі із захворюваннями людини в наш час викликає значний суспільний і науковий інтерес. Сирінгова кислота, фенольна сполука, яка часто зустрічається у фруктах і овочах і яка синтезується через шлях шикімової кислоти. Має широкий спектр терапевтичного застосування в профілактиці цукрового діабету, серцево-судинних захворювань, раку, ішемії головного мозку. Сирінгова кислота має потенціал модулювати активність ферментів, динаміку білка та різноманітні фактори транскрипції, залучені до діабету, запалення, раку та ангіогенезу. Крім сирінгової кислоти, антираковими властивостями володіють і її похідні, такі як синапінова кислота, синапін та канолол [43].

До синтезу сирінгової та синапінової кислот здатна морська бактерія *Oceanimonas doudoroffii*. Даний мікроорганізм синтезує ці кислоти з метою одержання полігидроксіалканоату. Є інформація щодо антиракової дії мономерів полігидроксіалканоату. Речовини перевіряли проти лінії раку меланоми людини. При цьому, IC_{50} (концентрація напівмаксимального

інгібування — показник ефективності ліганду в при інгібуючій біохімічній або біологічній взаємодії) становила 63,3 мкМ [44,45].

Щодо канололу, його можна синтезувати, використовуючи макуху з насіння ріпаку як основне поживне джерело. При сумісному культивуванні мікроміцету *Aspergillus niger* BRFM451 та базидіального грибу *Neolentinus lepideus* BRFM15 вдається одержати близько 1,3 г/л канололу. Мікроміцет використовують для вивільнення синапінової кислоти — попередника канололу, а базидіоміцет — з метою біоконверсії цієї кислоти до канололу [46]. Наразі ведеться активне вивчення даної речовини для подальшого використання в онкотерапії. Наразі відомо, що канолол гарно продемонстрував себе у лікуванні раку товстої кишки, канцерозу шлунка, спричинений *Helicobacter pylori* та клітинної лінії раку шлунку людини SGC-7901 [47].

Камптотецин є різновидом модифікованого монотерпенового індольного алкалоїду, вперше виявленого з деревної рослини *Camptotheca acuminata*, а його напівсинтетичні аналоги іринотекан і топотекан клінічно використовуються для лікування різних видів раку в усьому світі. Наразі, камптотецин здатні синтезувати різноманітні ендofітні гриби [48]. Наприклад, *Alternaria alstroemeriae* NCIM1408 і *A. burnsii* NCIM1409 здатні синтезувати $426,7 \pm 33,6$ мкг/г сухої біомаси та $403,3 \pm 41,6$ мкг/г сухої біомаси відповідно, при цьому використовується середовище на основі картопляного відвару з додаванням глюкози [49].

Також, до синтезу камптотецину здатен штам *A. terreus* ON908494.1. Найвищий показник — 210 мкг/л речовини. При цьому, було одержано оптимальний склад поживного середовища, який є таким (г/л): діаіон HP20 - 2, амберліт XAD - 2, декстрин - 5, глюкоза - 10, саліцилова кислота - 2, серин - 4, цистеїн - 4 і глутамат 10. Відмічається, що чим більша генерація — тим менший вихід камптотецину, проте це вирішується шляхом додавання метанольного екстракту шкірки *Citrus limonum*. Активність IC₅₀ проти ліній клітин раку HepG-2 (карцинома печінки) і MCF-7 (карцинома молочної залози) була 0,96 і 1,4 мкМ відповідно [50].

До синтезу камптотецину також здатні й бактерії. Наприклад, до цього списку входить *Paenibacillus polymyxa* LY214, яку було виділено з дерева *C. acuminata*. Для цього мікроорганізму також притаманне зниження синтезувальної активності в залежності від кількості генерації. Найбільша кількість препарату, яку можна одержати з цієї бактерії становить 10,8 мкг/л. Оптимальні умови культивування на Сауро-декстрозному бульйоні з додаванням амберліт XAD16 є наступними: 11 діб, рН=7, 28 °С при 100 об/хв [51].

Імініміцин А володіє протираковими властивостями проти лінії HeLa S3 (рак шийки матки людини) та Jurkat (гострий лімфолейкоз людини). Показник IC₅₀ становить 43 та 36 мкМ. Імініміцин А синтезує *Streptomyces griseus* OS-3601 (актиноміцет, виділений з ґрунту) в концентрації 0,3 мг/л на 5 день культивування. До середовища входить 20 г/л розчинного крохмалю, 5 г/л гліцерину, 10 г/л знежирених зародків пшениці, 3 г/л м'ясного екстракту, 3 г/л дріжджового екстракту і 3 г/л CaCO₃ [52].

Бактерія *Micromonospora* sp. виробляє тіокоралін, депсипептид, який інгібує клітинну ДНК-полімеразу-α. Ця речовина була застосована для лікування раку в доклінічних дослідженнях. Неідентифікований гриб із виду *Pleosporales* (штам CRIF2) продукує декілька сполук, що виявляють слабку цитотоксичну активність проти ліній пухлинних клітин. А *Pestalotiopsis* sp. грибок, виділений з листя *Rhizophora mucronata*, продукує хромон, а саме песталотіопсон F, який виявляє цитотоксичну активність проти мишачих ракових клітин L5178Y [53].

Ціанобактерії розробляють протипухлинні сполуки, такі як доластатин 10, курацин А та криптофіцин, які націлені на тубулінові або актинові нитки еукаріотичних клітин. Доластатин 10, сильний інгібітор мікротрубочок, який може зупиняти мітотичний поділ клітин, був виділений із *Symploca* sp. Курацин А був виділений з *Lyngbya majuscula* і є сильним антипроліферативним засобом, що інгібує збірку мікротрубочок. Криптофіцин був виділений з морських *Nostoc* sp. GSV 224 і є протираковим препаратом-кандидатом з ефективністю

проти клітин лейкемії L1210, клітин карциноми яєчників і клітин резистентного раку молочної залози. Механізм дії криптофіцину включає зв'язування на кінцях мікротрубочок, що призводить до порушення клітинного мітозу. Одоамід є нещодавно відкритим циклічним депсипептидом з *Okeanis* sp., який демонструє сильну цитотоксичність проти клітин раку шийки матки людини HeLa S3 ($IC_{50} = 26,3$ нМ). Хієрридин В з *Cyanobium* sp. LEGE 06113 виявляв цитотоксичність щодо клітин аденокарциноми товстої кишки HT-29 [53].

Фукоїдан, екстрагований із *Gracilaria corticata*, продемонстрував активність проти колоректального раку та раку молочної залози. Крім того, кілька досліджень підтвердили здатність фукоїданів індукувати апоптоз у різних клітинних лініях пухлин, включаючи клітини меланоми, раку товстої кишки, лімфоми та раку молочної залози. Фукоксантин зустрічається в їстівних морських бурих водоростях, включаючи *Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Sargassum fulvellum* і *Hijikia fusiformis*, і має антиоксидантну, протиракову дію, проти ожиріння, протидіабетичної та проти старіння. Етанольний екстракт *Turbinaria conoides* продемонстрував антиоксидантні, антибактеріальні та протипухлинні властивості. Екстракти органічних розчинників *Sargassum wightii* та *Sargassum ilicifolium* показали цікаву протиракову активність щодо кількох клітинних ліній [53].

Цитотоксичний метаболіт, стипольдіон, виділений із *Stypodium zonale*, пригнічує полімеризацію мікротрубочок, тим самим запобігаючи утворенню мітотичного веретена в клітинних культурах. Етанольні екстракти спорофілів *U. pinnatifida* викликали неокислювальне апоптотичне пошкодження ракових клітин товстої або прямої кишки людини. Похідна атомарної кислоти, диметокси-атомарна кислота, показало цитотоксичну активність проти клітин раку легенів і товстої кишки. Альгінат натрію, отриманий з бурих морських водоростей, продемонстрував протипухлинні та протизапальні властивості. Протипухлинну активність оцінювали шляхом аналізу впливу на клітинний цикл та індукцію апоптозу на клітинах HepG2 [53].

Штам ВО-07 був виділений з тканини кореня *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A. та ідентифікований як *Streptomyces* sp. Фракціонування сирого екстракту з культур штаму ВО-07 призвело до виділення двох біфенілів: 3'-гідрокси-5-метокси-3,4-метилendioксибіфеніл і 3'-гідрокси-5,5'-диметокси-3,4-метилendioксибіфеніл. Ці сполуки та неочищений екстракт мали потужну протипухлинну дію. Речовини показали сильну цитотоксичність проти всіх трьох ліній ракових клітин (HeLa, HepG2 і Huh7) при значенні IC_{50} 3,04–20,30 мкг/мл [54].

На рівні з різними наночастинками можна побачити дослідження біосинтезу квантових точок. Таким чином у 2022 році було отримано технологію одержання квантових точок діоксиду титану (TiO₂Qds) за допомогою відходів кавунової шкірки. Характеристика TiO₂Qds показала, що синтезовані точки є полікристалічною структурою із середнім розміром частинок 7 нм. TiO₂Qds мають потенційну протиракову активність проти лінії ракових клітин MCF7, де IC_{50} становила 114 мкг/мл, а відсоток інгібування при 1000 і 500 мкг/мл становив 99 і 93% відповідно [55].

Ресвератрол є важливим членом класу стилібенів поліфенольних метаболітів рослинного походження. У природі він зустрічається в багатьох різних рослинах, включаючи виноград, різні ягоди, арахіс і харчові продукти, отримані з них, такі як вино та сік. Було показано, що в рослинах як захисна сполука ресвератрол справляє біологічну дію проти патогенних інфекцій і пошкоджень. Проте сучасні дослідження вказують на наявність протипухлинної дії. З розвитком метаболічної інженерії такі мікроорганізми, як дріжджі та *E. coli*, можуть бути забезпечені генами біосинтезу ресвератролу, що представляє альтернативну рослинній інженерії. Відомий виробник, швейцарська компанія (Evolva), володіє високою чистотою (98%) і високою потужністю від 40 до 50 тонн на рік для виробництва ресвератролу. Інженерні штами можуть синтезувати від 1,4 до 2340 мг/л зазначеної сполуки [56].

Ресвератрол продемонстрував великий потенціал у лікуванні різних видів раку завдяки своїй здатності впливати на різні молекулярні шляхи.

Шляхом інгібування фактора 6, асоційованого з TNF-рецептором (TRAF6), ресвератрол пригнічує EMT, щоб зменшити інвазію клітин раку простати. У клітинах раку товстої кишки тверді ліпідні наночастинки, завантажені ресвератролом, надзвичайно стимулюють апоптозну загибель клітин, щоб зменшити ріст і проліферацію ракових клітин. Окрім апоптозу, ресвератрол індукує зупинку клітинного циклу в ракових клітинах. Завдяки своїй здатності до деметилювання ресвератрол підвищує чутливість анапластичних клітин раку щитовидної залози до ретиноївої кислоти. Примітно, що ресвератрол можна застосовувати в імунотерапії раку. Запрограмована смерть-1 (PD-1) пов'язана зі зниженням тяжкості імунної системи під час прогресування раку. При введенні ресвератролу PD-1 накопичується в ендоплазматичному ретикулумі та пригнічується його стабілізація, що призводить до підвищення протипухлинної активності Т-клітин [57].

Застосування ресвератролу є корисним у лікуванні раку товстої кишки, оскільки запускає сигнальні шляхи, які можуть призвести до стимуляції апоптозу. Поєднання ресвератролу та As2O3 зменшує експресію каналів hEGR на клітинній мембрані. Це призводить до дисоціації hERG та інтегрину $\beta 1$ для індукування апоптозу в клітинах раку товстої кишки. Крім того, ресвератрол продемонстрував великий потенціал у лікуванні раку порожнини рота. Тироксин пов'язаний із посиленою проліферацією та прогресуванням ракових клітин ротової порожнини шляхом пригнічення апоптотичного фактора BAD та посилення PD-1. Ресвератрол чинить інгібіторну дію на функцію тироксину, тому додавання ресвератролу посилює експресію BAD і пригнічує PD-1 для придушення ракових клітин порожнини рота. Варто зазначити, що ресвератрол активує супресор пухлин Rad9, щоб викликати передчасне старіння клітин раку легенів і молочної залози [57].

Синтезувати велику кількість ресвератролу може експресований генами *ARO4* та *ARO7* штам дріжджів *Rhodotorula toruloides*. Трансформовані дріжджі культивують протягом 96 годин на дріждево-картопляно-дексрозному бульйоні. При цьому утворюється 125,2 мг/л ресвератролу. Отже, даний

біологічний агент може бути гарним продуцентом для промислового одержання зазначеної субстанції [58].

РОЗДІЛ 2. РЕЧОВИНИ, ЩО ЗНАХОДЯТЬСЯ НА СТАДІЇ

РОЗРОБКИ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

2.1. Речовини що проходять доклінічні дослідження

Сарсасапогенін знаходить на доклінічній стадії досліджень. Попередні дані показали, що сарсасапогенін (1 мг/мл) має значну токсичність проти клітин гепатоми людини HepG2, де життєздатність клітин показала IC_{50} 42,4 мкг/мл протягом 48 годин шляхом чіткого зменшення дози та часу. Цитотоксичну дію перевіряють на мишах [59]. Сарсасапогенін вперше було виділено від *Asparagus racemosus*, але з розвитком генної інженерії можна використовувати рекомбінантні штами мікроорганізмів для його одержання [60].

Рубіадін, 1,3-дигідрокси-2-метил антрахінон, в основному походить від *Rubia cordifolia* Linn (*Rubiaceae*). Вперше він був виявлений у 1981 році, і повідомлялося про багато біологічних активностей. Рубіадін також біосинтезується за допомогою полікетидного та хоризматного шляху за допомогою о-сукцинілбензойної кислоти. Рубіадін є потужною молекулою з протираковими властивостями. Наразі препарат знаходиться на стадії доклінічних досліджень. Рубіадін продемонстрував фотосенсибілізуючу здатність на монокультурі клітин раку товстої кишки (SW 480) при низькій концентрації, де стався некроз. При 100 рубіадін показала значну фотоцитотоксичність для ракових клітин MCF-7c3. Препарат також продемонстрував значну цитотоксичність проти клітин HepG2, зі значеннями мінімальної інгібуючої концентрації IC_{50} 3,6-4,8 мкМ. Він також надав цитотоксичність щодо CEM-SS (Т-лімфобластний лейкоз) клітинні лінії MCF 7 (карцинома молочної залози) і HeLa (карцинома шийки матки) з IC_{50} 3, 10 і >30 мкг/мл відповідно. В іншому дослідженні рубіадін продемонстрував значну цитотоксичність проти клітин NCI H187 зі значеннями IC_{50} 14,2 мкг/мл. Актуальні дослідження проводять на щурах [61].

Фізетин є одним із найпопулярніших флавоноїдів, які містяться в овочах і фруктах, і має низку переваг для здоров'я, таких як антидіабетична, протипухлинна та протизапальна дія. Біотехнологія або інструменти

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ		
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат			
Розроб.		Возна			Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Резніченко				6	3
Н. Контр.					Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков					

РОЗДІЛ 2

хемосинтезу використовувалися для синтезу фізетину та його аналогів, щоб підвищити їх вихід та ефективність. Фізетин виявляє сильний цитотоксичний ефект проти кількох типів раку, таких як рак легенів, печінки, яєчників, товстої кишки, молочної залози тощо. Даний препарат синтезується мікробіологічним шляхом за допомогою рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* та *E. coli*. Наразі, фізетин вважається дієтичною добавкою у типовій дозі 20 мг/кг/день, його також додавали до лікувальної їжі під назвою GlaucoCetin. Проте, наявної інформації недостатньо для виготовлення лікарських засобів на основі цього препарату, а тому ліки для онкотерапії на основі фізетину знаходяться на стадії доклінічних розробок [62].

Урсолова кислота, природний пентациклічний терпеноїд, пригнічує ріст раку та метастазування, але точний молекулярний механізм її протиракової дії недостатньо вивчений, через що дана речовина знаходиться на стадії доклінічних досліджень. Кислота збільшує зупинку клітинного циклу та апоптозну смерть у клітинах гепатоцелюлярної карциноми НСС і зменшує активацію онкогенних сигнальних факторів росту [63]. Синтез урсолової кислоти можна здійснювати за допомогою рекомбінантного штаму *S. cerevisiae* ScLCZ08 [64].

Також, наразі на стадії доклінічних досліджень знаходиться екстракт грибу *Inonotus obliquus*. Він містить в собі декілька речовин, які мають протипухлинні властивості, до яких відноситься ергостеролу пероксид, 3 β -гідроксиланоста-8,24-дієн-21-ал, гісполон (пригнічує ріст клітин (клітин KB епідермоїду людини)), гіспідін (пригнічує ріст пухлини (клітини раку товстої кишки людини HT-29)), ланоста-24-ен-3 β ,21-діол, протокатехінова кислота, ланоста-7, 9(11),23Е-трієн-3 β , 22R, 25-тріол та бетулінова кислота (клітини аденокарциноми легені (A549)). Екстракт *I. obliquus* знижує життєздатність клітинних ліній гепатоми людини (клітинна лінія HepG2). Подібним чином дослідження *in vivo* на мишах Balb/c, яким імплантували клітини меланоми B16-F10, показали, що 10-денне внутрішньочеревне введення водних екстрактів *I. obliquus* у дозі 20 мг/кг/день пригнічувало ріст пухлини. Дослідження на лінії клітин недрібноклітинної карциноми легенів людини (клітинна лінія A549)

також підтвердило, що полісахариди, отримані з *I. obliquus*, пригнічують метастази ракових клітин. Крім того, водні екстракти *I. obliquus* пригнічували проліферацію колоректального раку, а лікування мишей AOM/DSS такими ж водними екстрактами пригнічувало ріст пухлини товстої кишки. Крім того, дослідження *in vitro* на лініях клітин колоректального раку HCT116, HT-29, SW620 і DLD-1 показали, що пероксид ергостеролу з *I. obliquus* пригнічує ріст і формування клоногенної колонії клітин колоректального раку [65].

На стадії доклінічних досліджень наразі знаходяться нанобульбашки, що синтезуються галофільними археями *Halobacterium* NRC-1. Доклінічні тести проводяться на мишах лінії Balb/c. Вже на початкових стадіях досліджень було виявлено, що дані наноречовини мають високу цитотоксичну активність проти лінії раку 4T1. Але за обмеженої кількості інформації, нанобульбашки ще потребують додаткових досліджень для виявлення не лише їх потенціалу, а й безпечності для здоров'я людини [66].

Халепін і халепенсин – речовини, що вперше були виділені *Ruta chalepensis* L., проте також зустрічаються у представниках інших видів, таких як *Boenninghausenia* та *Clausena*. Було встановлено, що халепін має значну цитотоксичність проти п'яти ліній ракових клітин людини, включаючи лейкемію людини (HL-60), гепатокарциному (SMMC-7721), карциному легенів (A-549), молочної залози раку (MCF-7) та аденокарциноми товстої кишки (SW-480). Також відомо, що халепін і халепенсин можуть індукувати мітохондріальний апоптоз у клітинах карциноми легенів (A-549), причому халепін має більшу токсичність. Халепін продемонстрував селективну цитотоксичність проти клітин A-549 зі значенням IC_{50} 8,69 мкг/мл (27,64 мкМ). Халепенсин проти клітинної лінії A-549 мав значення IC_{50} 18,5 мкг/мл. Ці речовини потребують додаткових досліджень, оскільки точно невідомо, як вони можуть вплинути на здоров'я людини [67].

2.2. Речовини, що проходять клінічні дослідження

Облімерсен - специфічний антисмисловий олігонуклеотидний препарат, спрямований проти Bcl-2, був першою сполукою, яка досягла клінічних досліджень у боротьбі з Bcl-2. Після неефективності облімерсену як монопрепарату, його ефективність у комбінації з іншими препаратами оцінювали в кількох клінічних дослідженнях I–III фази у пацієнтів із прогресуючими солідними злоякісними новоутвореннями, але вони були припинені [68].

Комбінація анти-PD-1 антитіл і антиангіогенезного агента, які синтезують рекомбінантними штамми *E. coli*, продемонструвала більш потужні протипухлинні ефекти на ранніх етапах клінічних випробувань і зараз є гарячою точкою в клінічних дослідженнях. Крім того, ці препарати досліджуються в комбінованому лікуванні з хірургічним втручанням або іншими місцево-регіонарними методами лікування у пацієнтів з ранньою або середньою стадією гепатоцелюлярної карциноми [69].

Зазвичай онкотерапію проводять за допомогою антрациклінових антибіотиків, проте цей список обмежений малою кількістю препаратів, які більшою мірою володіють неприємним побічним ефектом – кардіотоксичністю. Нещадовно було одержано ще кількі антибіотиків цього ряду, до яких увійшли ногаломіцин, стеффіміцин В, пірарубіцин та родоміцин В. Всі ці речовини одержуть біосинтетичним або напівсинтетичним шляхом. Незважаючи на це, дані сполуки знаходяться на стадіях клінічних досліджень для подальшої заміни вже відомих лікарських засобів на основі доксарубіцини, даунорубіцину, ідарубіцину та епірубіцину. Наразі, на фінальній стадії дослідження знаходиться ногаломіцин та пірарубіцин [70].

Низка ферментів наразі розглядаються як можливі помічники у онкотерапії. Індоліамін 2,3-діоксигеназа пропонується використовувати для низки препаратів у комбінації з різними діючими речовинами для більш дієвого лікування меланоми, злоякісних солідних пухлин, злоякісної гліоми та інших. Цей самий фермент пропонується використовувати в парі з триптофан 2,3-

діоксигеназозу для лікування злоякісних солідних пухлин, препарат знаходиться на I фазі клінічних досліджень. Також, на від II до III фаз знаходяться дослідження комбінованих препаратів з глутаміназою. Ці препарати мають на меті лікування меланом, метастазів, колоректального раку та злоякісних солідних пухлин [71].

Морські мікроорганізми є чи не основним джерелом новітніх сполук різноманітної природи. Діазепіноміцин є дибензодіазепіноновим алкалоїдом. Ця сполука виробляється штамом DPJ12 морської бактерії *Micromonospora*, виділеної з оболонки асцидії *Didemnum proliferum*. Діазепіноміцин продемонстрував цитотоксичність широкого спектру на клітини лінії раку NCI 60 у низькому мікромолярному діапазоні. Крім того, ця сполука показала велику протипухлинну активність щодо пухлин гліоми щурів, ксенотрансплантатів передміхурової залози (PC432 3) і клітинної лінії гормононезалежного раку молочної залози людини (MDA-MB-231). Доклінічні дослідження як протипухлинного засобу були завершені в 2006 році. Наразі речовина знаходиться на III/IV стадії клінічних досліджень [72].

В табл.2.1. наведено ще декілька прикладів речовин, що виділено з морських мікро- та макроорганізмів, які наразі проходять доклінічні та клінічні випробування.

Таблиця 2.1.

Речовини морських мікроорганізмів, що проходять доклінічні або клінічні тести [73]

Метаболіт	Джерело виділення	Стадія
Похідне бенгаміду (LAF389)	<i>Jaspis</i> sp.	Клінічна, фаза I
Похідне геміастерліну (HTI-286)	<i>Cymbastella</i> sp.	Клінічна, фаза I
Дегідродіемнін В (Aplidine™)	<i>Aplidium albicans</i>	Клінічна, фаза II
Доластатин 10	<i>Dolabella auricularia</i>	Клінічна, фаза II
Кахалалід F	<i>Elysia rufescens</i>	Клінічна, фаза II
Бріостатин 1	<i>Bugula neritina</i>	Клінічна, фаза III
Діазонамід	<i>Diazona angulata</i>	Доклінічна
Тіокоралін Мі	<i>Cromonospora marina</i>	Доклінічна
Вітілевуамід	<i>Didemnum cuciferum</i> і <i>Polysyncraton lithrostrotum</i>	Доклінічна

Також, сучасна наукова спільнота розглядає використання деяких мікроорганізмів, як препаратів для онкотерапії. На першій фазі клінічних досліджень вже знаходяться екстракти бактерій *S. typhimurium* VNP20009, *S. typhimurium* TAPET-CD, *Corynebacterium diphtheriae* Tf-CRM 107, *Pseudomonas* IL4-PE та *Pseudomonas* IL13-PE. З 2011 року ведуться клінічні дослідження бактеріального екстракту на основі *L. monocytogenes* ANZ-100, а з 2018 року - *L. monocytogenes* CRS-207. Тривають клінічні дослідження екстракту з *Clostridium novyi*-NT [36].

Також, дуже поширені клінічні дослідження статинів, які зазвичай використовуються для зниження рівня холестерину в крові. Щонайменше, клінічні дослідження щодо можливого лікування колоректального раку наразі проходять 32 препарати на основі вже відомих статинів (наприклад, до таких відносяться розувастатин, ловастатин, сімвастатин та інші). Багато з цих речовин вже пройшли I та II стадії клінічних досліджень і наразі знаходяться на I/IV [74]. Статини можна синтезувати за допомогою рекомбінантної *E. coli* [75].

Протиракові препарати ресвератролу також знаходяться на декількох стадіях клінічних досліджень. Детальніше ознайомитись з ними можна в табл.2.2.

Таблиця 2.2.

**Клінічні дослідження ресвератролу в хіміопрофілактичних і
хіміотерапевтичних препаратах [76]**

Фаза	Тип раку	Суб'єкти	Форма препарату	Дозування та період
I	Рак молочної залози	39 пацієнтів з постменопаузою	Пероральний розчин	5, 50 мг, 12 тижнів
II	Загальна хіміопрофілактика	40 здорових пацієнтів	Пероральний розчин	0,5, 1,0, 2,5, 5 г, 29 днів
I	Загальна хіміопрофілактика	40 здорових пацієнтів	Пероральний розчин	0,5, 1,0, 2,5, 5 г, одинарна доза
I	Загальна хіміопрофілактика	42 здорових пацієнтів	Пероральний розчин	1 г протягом 4 тижнів
I	Профілактика раку молочної залози	40 здорових пацієнтів з постменопаузою	Пероральний розчин	1 г протягом 12 тижнів
I	Загальна хіміопрофілактика	9 здорових пацієнтів	Пероральний розчин	1 г протягом 28 днів
I	Профілактика колоректального раку	30 здорових пацієнтів	Виноград	0,15, 0,30, 0,45 кг (~7,5, 15, 22,5 мг препарату) протягом 2 тижнів
I	Колоректальний рак	8 пацієнтів	Оральний розчин (таблетка/ виноградинний порошок)	0,89, 15,54 мг (пероральний ресвератрол) 0,07, 0,11 мг (виноградинний порошок) 2 тижні
I	Колоректальний рак	24 пацієнти	Пероральний розчин	5 мг, 1 г протягом 6 днів
I	Колоректальний рак	20 пацієнтів	Таблетки	0,5, 1 г протягом 8 днів

Закінчення таблиці 2.2

I	Колоректальний рак, метастази в печінці	9 пацієнтів	Оральний розчин	5 г, 10–21 днів
I	Рак грудей	19 пацієнтів	Оральний розчин	161,55 мг протягом 6 ± 2 днів
I/II	Рак простати	14 пацієнтів	Капсули	8,8, 17,6, 26,4, 35,2 мкг протягом 28 днів
II	Рак простати	125 пацієнтів	Капсули	4,4, 35,2 мкг протягом 12 місяців
I	Рак простати	22 пацієнти	Порошок	30 мг протягом 12 тижнів
II	Множинна мієлома	24 пацієнти	Оральний розчин	5 г з 5 г Бортезомібу протягом 21 днів

Очікується, що ресвератрол сприятиме проривам у лікуванні раку. Серед різноманітних обмежень, погана фармакокінетика та низька ефективність, здається, є двома основними вузькими місцями ресвератролу. Були запропоновані нові ідеї та стратегії для прискорення перетворення ресвератролу. Найбільш перспективним підходом є підвищення біодоступності ресвератролу за допомогою нових рецептур. Якщо вдасться досягти значного прогресу, ресвератрол можна буде використовувати для лікування раку [76].

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ

ВИРОБНИЦТВО РЕСВЕРАТРОЛУ

3.1. Аналіз онкологічної захворюваності

Рак є одним із найпоширеніших захворювань, а пов'язана з ним захворюваність і смертність становлять серйозну проблему охорони здоров'я в усьому світі. Незважаючи на те, що було докладено великих зусиль, щоб знайти ліки, рак залишається дуже важливою причиною смертності серед людей, а ефективне лікування залишається серйозною проблемою. Лише у 2017 році в Сполучених Штатах очікується 1,6 мільйона нових діагнозів раку та приблизно 600 000 смертей, пов'язаних із раком [78].

Незважаючи на кілька нових удосконалень у діагностиці та нагляді, загальний рівень виживаності при раку не покращився. З'явилося декілька препаратів для персоналізованого догляду, таких як цільова терапія, що забезпечує покращені клінічні результати для хворих на рак. Однак деякі з останніх передових удосконалень у лікуванні раку призвели до розвитку набутої резистентності до хіміотерапевтичних засобів [79,80].

Рак, проблема зі здоров'ям, яка зростає у всьому світі, щороку вражає мільйони людей. Загальна виживаність людей, хворих на рак, завдячує зусиллям клініцистів і вчених. Однак деякі пухлини розвивають резистентність до хіміорадіотерапевтичних засобів, а спільнота дослідників раку продовжує пошуки ефективних сенсibilізаторів. Ресвератрол, природний поліфенольний фітоалексин, продемонстрував багатообіцяючі ефекти щодо пригнічення проліферації та раку прогресування в кількох моделях пухлини. Однак його молекулярні механізми та застосування в хіміотерапії та променевої терапії ще належить повністю визначити [81].

Рак є основною проблемою охорони здоров'я в усьому світі, і він став другою основною причиною смерті в Америці. Американський національний центр статистики охорони здоров'я вважає, що буде понад 1.6 мільйона нових

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ			
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 3	Лім.	Арк.	Акрушів
Розроб.	Возна						6	3
Перевір.	Резніченко							
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков							
						Кафедра БТМ⁴³		

діагнозів раку та понад 600 000 смертей, пов'язаних з раком, у 2017 році. Хірургічне втручання, хіміотерапія та променева терапія найпоширеніші методи лікування раку. Хіміотерапія і променева терапія використовуються як основні схеми лікування у більшості хворих на рак і відіграють життєво важливу роль у лікуванні раку, тому що багато пацієнтів діагностовано хвороба на запущених стадіях. Однак пухлини стають все більш стійкі до хіміотерапії (хіміорезистентність) і радіотерапія (радіорезистентність), яка стала головною перешкодою в лікуванні раку. Крім того, при розвитку ракових клітин виникають ускладнення хіміорезистентності та радіорезистентності через множинні механізми, а також хіміотерапевтичні агенти і радіотерапія часто викликає побічні ефекти. Тому потрібно визначити нову стратегію або новий терапевтичний засіб, який може подолати хіміорезистентність і радіостійкість [81].

З давніх часів натуральні продукти використовувалися для профілактики кількох хронічних захворювань, у тому числі раку. Відродження інтересу до фітохімічних речовин, отриманих з харчових або лікарських рослинних джерел, забезпечило альтернативне джерело біологічно активних сполук, які можна використовувати як профілактичні або терапевтичні засоби проти різноманітних захворювань [77,78,79,80 ,].

Ресвератрол стає все більш популярним, оскільки він має профілактичні та протиракові властивості [1]. Нефлавоноїдний поліфенол, ресвератрол (3,4',5-тригідрокси- *транс*-stilbene) є фітоалексином, який природним чином зустрічається в багатьох видах рослин, включаючи арахіс, виноград, сосни та ягоди, і допомагає у відповідь проти патогенних інфекцій [77]. Цікаво, що китайська та японська традиційна медицина також містять його у формі екстрактів, таких як екстракти, отримані з *Polygonum cuspidatum* , які можна використовувати для лікування запалення, головного болю, раку та аменореї.

3.2.Захворюваність на рак в Україні

Україна за рівнем онкозахворюваності (347,8) входить у першу десятку країн світу – більше 158 тисяч хворих на рік, а до 2020 року, за прогнозами експертів, щорічна кількість онкохворих зросте до 200 тисяч. На обліку знаходиться близько

одного мільйона хворих. Покращення показників діагностики та лікування онкозахворювань відбувається дуже поволі (*табл. 1.1*), а проблема залишається не вирішеною [77].

Таблиця 3.1

Захворюваність на рак в Україні

Показники	2001	2011
Захворюваність	324,5	347,8
Виявлено хворих	155319	158584
Виявлено в I–II ст.	48,6 %	52,2 %,
Виявлено в III–IV ст.	36,1%	33,3 %
Смертність	189,5	180,0
Не прожили 1 року	39,5%	33,6 %(56т.)
Морфологічна верифікація	73,8%	83,3 %
Оперовані	43,7 %	33,6 %
Отримали комбіноване лікування	29,5 %	39,4 %
Отримали спецлікування	61,4 %	68,7 %

Попри доволі непоганий рівні технічного забезпечення, рівень своєчасної діагностики найбільш розповсюджених пухлинних захворювань залишається низьким, наприклад, рак легенів (з понад 16,5 тисячі пацієнтів щорічно), усього 22,4 % випадків у I–II стадіях, рак шлунка (з 10,5 тисячі) – в 35,3 %, пухлини товстої кишки (19,0 тисяч хворих) – в 53,3–63,6 % випадків, рак молочної залози (16,3 тисячі хворих) – в 76,7 %, що значно менше, ніж в розвинутих країнах. У більшості випадків онкозахворювання діагностуються за «принципом звернення», тому порівняння річного та 5-річного виживання у хворих в Україні та, наприклад, в США далеко не на нашу користь (*табл. 1.2*) [88].

Таблиця 3.2

Летальність до року та 5-річна виживаність хворих в Україні та США

Локалізація	Летальність до року		Живуть понад 5 років	
	<i>Україна</i>	<i>США</i>	<i>Україна</i>	<i>США</i>
Всі пухлини	33,6	26,0	41,4	64,0
Легені	63,9	60,0	9,4	15,0
Молочна залоза	11,5	2,0	56,2	88,0
Шлунок	62,2	34,0	13,8	21,0
Товста кишка	35,7	18,5	32,0	62,5
Матка	14,5	10,0	60,1	75,4
Меланома	16,1	2,0	49,7	90,0

За темпами поширення раку Україна посідає друге місце у Європі. Щорічно діагноз злоякісного новоутворення уперше в Україні встановлюється в 136 тисяч осіб (дані Національного канцер-реєстру України за 2015 р.). Згідно з Національним канцер-реєстром України на 2016 р., 919 тисяч наших співгромадян перебувають на обліку з приводу онкологічних захворювань в онкологічних закладах нашої країни. Причому чоловіки частіше хворіють на злоякісні новоутворення шкіри, передміхурової залози, сечового міхура, легень та колоректальний рак (58,5 %), а в жіночій популяції виявляються злоякісні новоутворення шкіри, грудної залози, тіла, шийки матки, щитоподібної залози (66,9 %) [88].

За останні десять років частка хворих зросла на 25 %, загальна чисельність населення скоротилася на 4 млн осіб за рахунок онкопатології. Ця група нозологій є причиною 15 % усіх смертей в Україні. Онкологічна захворюваність стабільно зростає на 2,6–3 % на рік, і рак продовжує «молодіти». Щороку українське суспільство з цієї причини втрачає майже 70 тисяч людей, серед яких понад 35 % — особи працездатного віку. Щодня в Україні захворюють раком 450 людей, із них гинуть 250, тобто щогодини реєструється понад 20 нових випадків

захворювання, а 10 жителів України помирають від раку. Причому рівень онкологічної смертності чоловічого населення працездатного віку в Україні перевищує такий у розвинутих країнах на 40 %, а жіночого — на 20 %. Здавалося б, за цими показниками ми не сильно відрізняємося від розвинених країн, проте слід враховувати, що середня тривалість життя українців на 10–20 років нижча, а захворюваність на рак істотно зростає після 50 років. І далеко не кожен українець доживає до «свого раку», вмираючи від інших причин [89].

У 2019 році показник захворюваності молочної залози в Україні склав 65.0 осіб на 100 тисяч жіночого населення. Рівень виявлення раку на профілактичних оглядах 40.5 осіб на 100 тисяч жіночого населення. Показник занедбаності-24.1%. Смертність – 22,3 осіб на 100 тисяч жіночого населення [90].

Для подальшого підрахунку визначимо приблизну кількість хворих жінок на рак молочної залози. Так, згідно даних за 2019 рік [91], кількість жінок в Україні складала приблизно 20млн. осіб.

Тоді приблизна кількість хворих становить:

65.0 жінок – 100 тис. населення

X жінок – 20млн. населення

$$X = \frac{20\text{млн.} \times 65.0}{100\text{тис}} = 13000 \text{ жінок}$$

3.3. Потреба у виробництві ресвератролу

Все більше доказів доклінічних досліджень дослідження показують, що ресвератрол має потенціал впливають на різні захворювання людини, в тому числі і на онкологічні хвороби [92].

Надзвичайно обнадійливим для майбутнього клінічного розвитку ресвератролу є те, що дози до 5 г/день, приймати протягом місяця, є безпечними та досить добре переносяться. Однак видається вірогідним, що поява залежних від дози легких або помірних побічних ефектів, у поєднанні зі здатністю ресвератролу змінювати активність ферментів, що метаболізують ліки, обмежить дозування, що використовується в майбутніх дослідженнях, до **<1,0 г/день**. У людей ресвератрол ефективно засвоюється після перорального прийому; однак швидкий метаболізм II фази різко обмежує його біодоступність у плазмі. У

зв'язку з відсутністю даних щодо розподілу для певних тканин людини, рівні, досягнуті в плазмі, повинні бути досягнуті керувати вибором концентрацій, які використовуються в доклінічних дослідженнях *in vitro*, щоб більш точно відобразити клінічний сценарій. Тому, використовувані концентрації не повинні перевищувати $\sim 1\text{M}$ для імітації рівень ресвератролу, досягнутий шляхом споживання 1 г/день або менше. Наявність високих концентрацій вихідного ресвератролу в колоректальних тканинах, у надлишок, необхідний для діяльності *in vitro*, підтримує товста кишка як орган-мішень. Ефективність ресвератролу в інших тканинах може значною мірою залежати від чи мають його метаболіти значну активність або здатні регенерувати ресвератрол локально або системно. Крім того, концентрації ресвератролу нижче діапазону, який зазвичай вивчають *in vitro*, принаймні в дослідженнях раку, може бути достатньо для активності. ***Існують деякі докази біологічної активності при надзвичайно низьких концентраціях ресвератролу***, а також двофазні залежності доза-реакція; ці ефекти повинні бути досліджені далі і в основі механізми з'ясовані, щоб допомогти ідентифікувати оптимальні дози для використання на наступному етапі клінічних випробувань, спрямованих на оцінку ефективності [92].

Ресвератрол має багатогранні цілющі властивості, наприклад, протизапальні, антиоксидантні та антивікові властивості. Ресвератрол є складовою червоного вина, і тому часто постулюють, що ресвератрол є важливим елементом французького парадоксу, зниження ризику серцево-судинних захворювань у французів, незважаючи на високе споживання насичених жирів; що було пов'язано з великим споживанням червоного вина. Було показано, що ресвератрол має ***цитотоксичну дію in vitro проти широкого діапазону пухлинних клітин людини***, включаючи мієлоїдні та лімфоїдні ракові клітини, а також клітини карциноми грудей, шкіри, шийки матки, яєчників, шлунка, простати, товстої кишки, печінки, підшлункової залози та щитовидної залози [93].

На ринку України, ресвератрол представлений у вигляді біологічної добавки. Тому, подальший свій розрахунок, а також рекомендації щодо дозування, будемо зосереджувати на рекомендації до БАД.

Так, згідно даних інструкції [94], дана біологічна добавка, у своєму складі містить 200мг діючої речовини. Тому, свій подальший розрахунок будемо проводити згідно потреби, а саме:

1 капсула препарату – 200мг(ресвератролу)/доба.

Оскільки, відсутні рекомендації щодо тривалості застосування даного БАД, пропонуємо забезпечити тривалість терапії станом на рік.

Згідно вище проведених розрахунків, кількість хворих на рак молочної залози (летальність до року) становить **13000 людей**. Так як ми плануємо розробляти саме лікарський засіб а не БАД, то для початку пропонуємо запустити пілотне, невелике виробництво даної субстанції.

Отже, пропонуємо забезпечити від загальної кількості хворих (13000), даним препаратом 10% потреби:

13000 людей – 100%

X людей – 10%

$$X = \frac{13000 \times 10}{100} = 1300 \text{ людей}$$

Далі, потреба даним препаратом на добу становить:

$$1300 \times 200 = 260000 \text{мг} = 260 \text{ г ресвератролу}$$

Тоді, річна потреба буде становити:

$260 \times 365 = 94900 \text{г} \approx 95 \text{кг}$ ресвератролу/рік – для забезпечення препаратом 10% людей від загальної кількості.

3.4.Розрахунок потужності виробництва

Для одержання такої кількості субстанції річний об'єм культуральної рідини має становити:

$$0,000125 \text{кг} - 1 \text{ л};$$

$$95 \text{ кг} - X \text{л};$$

$$X = 95/0,000125 \approx 760000 \text{ л/рік}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (40 %), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр.}} = 760000/(1-(0,3+0,1)) \approx 1266667 \text{ л}$$

Тобто, для накопичення 88 кг ресвератролу необхідно 1266667 л

культуральної рідини.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) 330, тоді кількість продукту за цикл становитиме:

$$V_d = V_{гп} / T_{рд} = 1266667 / 330 \approx 3838 \text{ л/доба}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{кр} = (K_1 \times V_d \times T_{цф}) / 24 = (1,1 \times 3838 \times 107) / 24 \approx 18822 \text{ л/цикл}$$

де, $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (96 год) та час підготовки ферментера до роботи (11 год).

Тривалість підготовчих робіт та сам виробничий біосинтез складатимуть 107 год (див. *табл. 1.3*).

Таблиця 4.3.

Тривалість біосинтезу *Rhodotorula toruloides* NP11

Процес	Час операції, год
Миття та огляд ферментеру	1,5
Перевірка на герметичність	2
Підігрів апарату	0,5
Стерилізація апарату	2
Охолодження апарату	2
Завантаження середовища	1
Засів культури	0,5
Ферментація	96
Вивантаження культуральної рідини	1,5
Разом	107

Тоді таку кількість культуральної рідини можна отримати у ферментері геометричний об'єм якого має становити:

$$V_r = V_{цк} / K_z = 18822 / 0,6 \approx 31370 \text{ л} = 30000 \text{ л}$$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_{зф} = V_{цк} / V_{ф} = 18822 / 30000 = 0,62 \text{ що не перевищує заданого значення.}$$

РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ СТАДІЙ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ

Після процесу ферментації культуральне середовище містить мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, залишки культурального середовища, піногасники, розчинні та нерозчинні речовини. Цільовими продуктами біосинтезу можуть бути самі мікроорганізми або їх метаболіти, розчинені в культуральному середовищі або містяться в клітинах мікроорганізмів [94].

Зважаючи, що ресвератрол є вторинним метаболітом, а локалізація даної сполуки при культивуванні буде накопичуватись у культуральній рідині. Враховуючи це і підбираємо наступні етапи виділення та очищення даної речовини.

При виборі методу виділення та концентрування того чи іншого продукту мікробіологічного синтезу необхідно враховувати наступні фактори [94]:

1. Фізико-хімічні властивості культуральної рідини.
2. Властивості виділяється продукту (термолабільність, стійкість до різних хімічних агентів та ін.).
3. Вимоги до кінцевої форми продукту (ступінь чистоти і ступінь концентрування).
4. Технологічні та техніко-економічні показники (вихід продукту, продуктивність обладнання, необхідність подальшої обробки та ін.).

Всі методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини ділять на дві групи [94]:

- Екстракція, іонний обмін, адсорбція, кристалізація – якщо цільовий продукт в розчині.
- Осадження, фільтрування, центрифугування, сепарування – якщо цільовий продукт у вигляді твердої фази.

Так, згідно даних науково – дослідної літератури [95], ресвератрол є поліфенолом з антибіотичною активністю. Так, згідно статті [96], основним

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ		
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 4		
Розроб.	Возна						
Перевір.	Резніченко						
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков						
					Літ.	Арк.	Акрушів
						6	3
					51 Кафедра БТМ		

етапом очищення поліфенолів є – екстракція. Тому, виділення та очищення, даної субстанції буде в себе включати наступні етапи:

- Відокремлення біомаси клітин;
- Екстракція;
- Висушування;
- Подрібнення субстанції;
- Фасування та пакування.

4.1. Вибір способу та відповідного обладнання для відокремлення та біомаси

Для цього етапу, є кілька доступних методів відокремлення біомаси, які задовольняють наші потреби, а саме:

- Центрифугування;
- Сепарування;
- Фільтрування.

Центрифугування – це вплив на речовини шляхом надшвидкісного обертання в спеціалізованому апараті. Головною частиною будь-центрифуги виступає ротор, який містить гнізда для установки пробірок з матеріалом, що підлягає сепарації на окремі фракції. Під час обертання ротора на підвищених швидкостях в дію вступає відцентрова сила [98].

Сепарування – процес розділення змішаних об'ємів сумішей різної густини, емульсій, суспензій твердих частинок або краплинок в газі. Відділення клітин за допомогою сепарування Сепарація можлива, якщо розчин має відмінності в характеристиках компонентів у суміші: розмірах або формі твердих частинок, їх масах, густині, коефіцієнтів тертя, міцності, пружності, змочуваності поверхні, магнітної сприйнятливості, електропровідності, радіоактивності [99].

Фільтрування – процес розділення з допомогою пористої перегородки, здатної пропускати рідину або газ, але затримувати завислі в середовищі тверді частинки. Воно здійснюється під дією сил тиску або відцентрових сил і застосовується для більш тонкого розділення суспензій і пилу, ніж шляхом осадження [100].

Більш детальна інформація переваг та недоліків наведені у *таблиці 4.1*.

Таблиця 4.1

Порівняльна характеристика способів концентрування біомаси

Спосіб	Переваги	Недоліки
Центрифугування	-максимальне очищення культуральної рідини від біомаси та залишків компонентів ПС; -відсутність необхідності попередньої обробки КР; -висока продуктивність;	-Більш складне та дороге обслуговування
Сепарування	-перспективність у автоматизуванні процесу; -малі габарити обладнання та вага;	-Вартість обладнання;
Фільтрування	-не утворюється осад на фільтрі -концентрування та очищення	-відносно габаритне обладнання; -вартість обладнання;

Порівнявши вищезгадані методи відокремлення біомаси, свій вибір зупинимо на центрифугуванні, як такий, що повною мірою задовольняє виробничі потреби. Цей метод має багато переваг сепаруванням та фільтрацією, а саме: максимальне очищення культуральної рідини від біомаси та залишків компонентів ПС; відсутність необхідності попередньої обробки КР; висока продуктивність.

4.2. Обґрунтування способу виділення та очищення субстанції

У культуральній рідині, окрім ресвератролу, містяться поживні компоненти середовища, продукти метаболізму та автолізу клітин. Видалення таких добавок є першою і важливою стадією очищення субстанції. Для цього використовують такі методи, а саме [101]:

- Екстракція;
- Іонообмінна сорбція;
- Осадження.

Екстракція – процес очищення речовини від різних домішок шляхом його багаторазового переведення із одного розчинника в інший з попереднім осадженням кристалізацією. Такий прийом називається перекристалізацією.

Іонообмінна сорбція – процес пропускання водних розчинів речовин, які за хімічною природою є кислотами, основами або амфотерними сполуками, через колонки з відповідними іонообмінними смолами, вони сорбуються на них, а розчин з домішками проходить через колонку. Адсорбовану речовину десорбують (процес елюції), в результаті чого одержують більш очищений та сконцентрований препарат.

Осадження – речовину обробляють органічними або неорганічними речовинами з метою переведення його в осад. Осад за допомогою фільтрування або центрифугування відділяють від нативного розчину, промивають і висушують. Сухий осад розчиняють і з розчину екстрагують речовини або знову осаджують (кристалізують).

Більш детальна інформація переваг та недоліків наведені у *таблиці 4.2*.

Порівняльна характеристика способів виділення та очищення субстанції

Спосіб	Переваги	Недоліки
Екстракція	- широкі можливості використання для екстракції матеріалів різної структури і вологості; - простота конструктивного оформлення екстракційних апаратів і малі площі, які вони займають; - високий коефіцієнт корисного використання геометричного об'єму (до 95,5 %) апарату, що запобігає можливості утворення в ньому вибухонебезпечних сумішей повітря і розчинника	-більш складне та дороге обслуговування
Іонообмінна сорбція	- ефективне відділення цільових речовин, -відсутність впливу на хімічну структуру цільової речовини;	-високовартісне обладнання; -необхідність висококваліфікованого персоналу.
Осадження	- осадження органічними розчинниками можна проводити за температур нижче нуля	-розтягнутість процесу у часі; -можливий вплив на нативну природу речовини.

Порівнявши вищезгадані методи виділення та очищення, можна зробити висновок, що метод екстракції є оптимальним. У порівнянні з іншими методами він має ряд переваг, а саме: простота використання апаратів і малі площі, які вони займають; високий коефіцієнт корисного використання геометричного об'єму апарату.

* Проміжним етапом для максимального виділення та очищення цільового продукту, буде виступати хроматографічна колона або етап хроматографії, далі сублімаційне осушення.

4.3. Обґрунтування вибору способу приготування кінцевої форми продукту

Сушіння – видалення рідини (вологи) з твердих та рідких матеріалів (продуктів, препаратів). Здійснюється за допомогою сушильних установок різного типу. У біотехнологічному виробництві застосовують різноманітні сушарки, в яких висушують дуже різні матеріали [102].

Кінцевою формою препарату є тверда желатинова капсула з ресвератролом (у вигляді сухого порошку), оскільки при сублімації мінімізується ризик пошкодження нативної структури речовини, а також збільшується термін зберігання даного препарату.

Для процесу висушування можуть застосовуватися такі методи, як:

- Вакуум-випарювання;
- Розпилювальне сушіння;
- Сублімація.

Вакуум-випарювання – це процес концентрування рідких розчинів нелетких речовин шляхом часткового видалення розчинника при кипінні рідини в умовах вакууму. При випарюванні під вакуумом можна проводити процес при більш низьких температурах, що запобігає руйнуванню речовин, схильних до розкладання [103].

Розпилювальне сушіння - це процес, при якому рідкий продукт подається в сушильну камеру і розпилюється високошвидкісними дисками або форсунками. Одночасно подається гаряче повітря, яке тонко очищується батареєю циклонів і скрубєрів. Сушильні камери виготовляються з нержавіючої сталі. Вони можуть бути з плоским або конічним дном, причому перші мають привід для витягування висушеного продукту. У резервуарах з конічним дном сухий продукт виводиться у вигляді порошку під дією сили тяжіння. [104].

Сублімація використовується тоді, коли інші методи і техніки сушіння не можуть забезпечити продукт зі строго визначеним показником якості. У процесі сублімаційного сушіння волога вивільняється під дією осмотичного тиску і капілярної дії при температурі нижче точки замерзання води, що зберігається в

матеріалі. Таким чином, термопластичний матеріал не зазнає значних змін, а мікробіологічні процеси пригнічуються. Замерзла вода не містить розчинних речовин. Тому не відбувається внутрішньої міграції розчинних речовин, а розчинні леткі компоненти продукту помітно втрачаються з паром при сублімації льоду [104].

Більш детальна інформація переваг та недоліків наведені у *таблиці 4.3*.

Таблиця 4.3

Порівняльна характеристика способів сушіння субстанції

Спосіб	Переваги	Недоліки
Вакуум-випарювання	-Висока продуктивність процесу	- Можлива інактивація та руйнація нативної структури речовини під час процесу сушіння.
Розпилювальне сушіння	-Висока продуктивність процесу.	- Під впливом високих температур можлива руйнація нативної природи речовини. - великі питомі габарити установок
Сублімація	- Процес випарювання відбувається при низькій температурі, - Відсутнє вспінювання; - Зразки після ліофільної сушки легко розчиняються. - Цей метод дозволяє висушувати нестабільні ліпідні компоненти ліпопротеїдів та інші гідрофобні речовини; - Завдяки низькій температурі відсутня небезпека мікробіологічного зараження. - У висушуємо продукту залишається менше 1% вологи, тому його можна довго зберігати.	- Процес сушіння розтягнутий у часі

Порівнюючи вище описані методи висушування, свій вибір зупинимо на сублімації. Так як даний метод має більше переваг, у порівнянні з вакуум-випарюванням та розпилювальним сушінням.

Головна перевага даного методу – це можливість максимально зберегти нативність даних клітин. Також використання сублімації подовжує термін зберігання готового препарату.

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

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 18,822 м³;
2. Концентрація ресвератролу ($C_{бар}$) = 125 мг/л;
3. Концентрація біомаси ($C_{біо}$) = 5 г/л;
4. Втрати на стадіях виділення і очищення ресвератролу = 40%.

Таблиця 5.1.

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ п/ п	Назва стадії (операції)	Матеріальн і потоки на стадії	Кількість по стадіям			
			Надійшло	Витрати разом 40%	Вийшл о	Необхідне обладнання
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1. Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 1. Зберігання культуральної рідини	Культураль на рідина	18822 л	-	18822л	Збірник для культуральн ої рідини з мішалкою об'ємом 25000 л
ТП 2. Відділення біомаси						
2	ТП 2. Центрифугува ння культуральної рідини	Культуральна рідина з продуктом	18822 л	-	-	Центрифуга продуктивніст ю 1000л /год
		Біомаса	94 кг	-	-	На утилізацію
		Супернатант	18728 л	5 %	17 791,6 л	На випарювання
ТП 3. Вакуум випарювання						
3	ТП 3. Вакуум випарювання	Супернатант	17 791,6 л	-	-	Вакуумний апарат. Продуктивність 3400л/год
		Упарений супернатант (в 50 раз)	355,83 л	10%	302,25 л	До екстрактору

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ		
Змн.	Арк.	№	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 5		
Розроб.	Возна						
Перевір.	Резніченко						
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков						
					Лім.	Арк.	Акрушіє
						6	3
					59		
					Кафедра БТМ		

ТП 4. Екстракція						
4	ТП 4. Екстракція	Упарений супернатант	302,25 л	-	-	Екстрактор пропусна здатність 600л
		95-% етиловий спирт	200 л	-	-	-
		Відпрацьований розчин з етанолом	-	-	501,14 л	На регенерацію за докомогою рефрактометричної колонни
		Екстракт ресвератолу	75,56 л	10%	68 л	До хроматографа
ТП 5. Хроматографічне очищення						
5	ТП 5. Хроматографічне очищення	Екстракт ресвератолу	68 л	-	-	Хроматографічна колонка. Продуктивність 10 л/год
		Екстракт без ресвератолу (пройшовший колонку)	-	-	61,2 л	На утилізацію
		Очищений розчин ресвератолу	7,55 л	10%	6,8 л	На піддони
ТП6. Отримання напівпродукту						
6	ТП 6.1 Розлив у піддони	Очищений розчин ресвератолу	6,8 л	-	-	На піддони об'ємом заповнення 4 л
		Розчин ресвератолу в піддонах	По 3,4 л на кожен піддон (2 шт.)	-	6,8 л	До сублимаційної сушарки
ТП7. Сублимаційне сушіння препарату						
7	ТП 7. Сублимаційне сушіння препарату	Розчин ресвератолу в піддонах	По 3,4 л на кожен піддон (2 шт.)			Сублимаційна установка
		Суша маса ресвератолу	1,53 кг	3%	1,46 кг	На подрібнення
ТП 8. Подрібнення та просіювання						
ТП 8.1. Подрібнення						
8	ТП 8.1. Подрібнення	Суша маса ресвератолу	1,46 кг	-	-	До подрібнювача
		Подрібнена маса ресвератолу	-	1%	1,44 кг	На просіювання
ТП 8.2. Просіювання						
8	ТП 8.2. Подрібнення	Подрібнена маса ресвератолу	1,44 кг	-	-	До просіювача
		Просіяна маса ресвератолу	-	1%	1,42 кг	Фасування по пакетам по 500 г

РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

6.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва ресвератролу

Специфікація обладнання для виділення ресвератролу з культуральної рідини, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в *табл. 6.1.*

Таблиця 6.1.

Специфікація обладнання ділянки після ферментаційного виробництва ресвератролу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
33 – 1	Збірник змішувач	1	Збірник-змішувач об'ємом 25000 л [1] оснащений сорочкою та перемішувальним пристроєм (100 об/хв), виготовлений зі сталі AISI 316. Виробник: Україна.
Ц – 2	Центрифуга	1	Виробник HAUS Країна походження: Туреччина Потужність, кВт 22 Частота обертання, об/хв 7 200 Електроживлення 3х380 V, 50 Hz.[2]
ВА-4	Вакуум-випарювач	1	Склад установки: - Реактор-випарник робочим об'ємом, л 500; - Теплообмінник, робочою площею, м.кв 2,2; - Збірник, робочим об'ємом, л 500; Опис випарника: – корпус з приварним еліптичним днищем та відокремленою еліптичною кришкою; – сорочки корпусу: теплообмінна (парова) та теплоізолююча; Верхній штуцер теплообмінної сорочки оснащений пропорційним клапаном подачі пари за командою ПІД-регулятора. - якірна мішалка з плавно регульованою швидкістю обертання; – вал мішалки ущільнюється подвійним торцевим ущільненням із незалежною системою мастила та охолодження [3].

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ		
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат			
Розроб.	Возна				РОЗДІЛ 6		
Перевір.	Резніченко						
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков						
						Літ.	Арк.
							6
							Акрушів
							91
						Кафедра БТМ	

НВ – 3	Насос відцентровий	1	Виробник PEDROLLO (Італія) Гарантія 12 місяців Вага кг.48 Максимальна подача 60.0 м ³ /год Максимальна потужність 4000 Вт [4].
НВ-5	Насос відцентровий	1	Насос відцентровий 1.5кВт Нmax 22,5м Qmax 500л/хв 2" LEO 3.0 (775290)[5]
ЕК – 6	Екстрактор	1	Місткість: 1000 г ~ 1500 г Точність екстрагування: ≤0,1% Час екстрагування: (20~40) хвилин за раз Швидкість центрифугування: 5500 об./хв, 11000 об./хв Робоче середовище: (5~40) °С, відносна вологість <80% Джерело живлення: АС380V±10%, 50 Гц, 5000 Вт Охолоджувальна вода: Тиск : ≤2 бари, температура : >12°C Вага нетто: 300 кг Розміри: 1400 мм (Д) × 800 мм (Ш) × 1600 мм (В) [6].
ХК – 7	Хроматографічна колонка	1	Хроматографічна колонка. Пропускна здатність 10 л/год. Виробник: Україна [7]
СС – 8	Сублімаційна сушарка	1	Об'єм камери до 10 л, 5330х1520х3100 мм, ліофілізація із зміною 1°C за годину, під вакуумом [8].

Примітка: 1. https://agrovektor.com/ua/physical_product/621126-emkosti-promyshlennye.html ;
2. https://bts.net.ua/ua/technological-equipment/separator-centrifuges/maxcream-20t/?gad_source=1&gclid=CjwKCAiA8YyuBhBSEiwA5R3-E33Hr9ykQ29iXc8LARfU0-BHmYZxOJPM-h0k4mKjoRRGoEgB-cYabxoC9u4QAvD_BwE; 3.
<https://promvit.com.ua/vakuum-vyparnaya-ustanovka-vvu-500>; 4.
<https://pedrollo.org.ua/ua/centrobezhnyi-nasos-pedrollo-f-50-160c-380v>; 5.
<https://skvagina.com.ua/>; 6. [https://aquagradus.com/ekstraktor-dlya-efirnih-masel?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=\[campaign\]&gclid=CjwKCAiA8YyuBhBSEiwA5R3-E77ysUWwOdAOXCGc2u5Sj7VMTkNgK1B29iHo5M1b8GyB7veTXpQ10RoCciQQAuV_D_BwE](https://aquagradus.com/ekstraktor-dlya-efirnih-masel?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=[campaign]&gclid=CjwKCAiA8YyuBhBSEiwA5R3-E77ysUWwOdAOXCGc2u5Sj7VMTkNgK1B29iHo5M1b8GyB7veTXpQ10RoCciQQAuV_D_BwE);
7. <https://bimedis.net/search/search-items/laboratorne-obladnannya-hromatografi-ridinni>; 8.
<https://www.sublimat.com.ua/uk/liofilnyye-sushilki>

РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину отриману зі стадії ферментації за допомогою насоса перекачують у реактор змішувач (ЗЗ-1). Температура КР підтримується в апараті на рівні 10°C.

ТП 2. Відділення біомаси

ТП 2.1 Центрифугування культуральної рідини

По закінченню культивування культуральна рідина зберігається у збірнику (ЗЗ-1). Потім, за допомогою насосу (Н-3) культуральна рідина перекачується до промислової центрифуги. Центрифугування відбувається упродовж 30 хвилин, у центрифугі (Ц-9) при частоті обертання 10200 об/хв. Супернатант після центрифугування подаються до вакуум-випарної установки (ВА-4). Біомаса подаються до (ЗВ).

ТП 3. Вакуум випарювання

Використовуємо однокорпусну вакуумну випарну установку (ВА-4). Розчин після центрифугування подають до вакуумного випарного апарата (РЗ 17), закривають випарний апарат, підключають вакуум та встановлюють тиск 0,005 МПа. Подають пару до калорифера випарного апарата, підтримують температуру 50 °С та починають процес випарювання. Після упарювання концентрат, за допомогою насоса (НВ-5), перекачують до екстрактора (ЕК-6).

ТП 4. Екстракція

Після етапу вакуумного-випарювання концентрат подають на етап екстракції (ЕК-6), для звільнення продукту від сторонніх домішок.

ТП 5. Хроматографічне очищення

Після етапу екстракції проводимо фінальний хроматографічний метод очистки концентрату. Після очистки концентрат подається на стадію розлив у піддони.

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ				
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат					
Розроб.		Возна			РОЗДІЛ 7		Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.		Резніченко						6	3
							Кафедра БТМ ⁶³		
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков							

ТП 6. Отримання напівпродукту

ТП 6.1 Розлив у піддони

Концентрат розливається у стерильні піддони, для подальшого сушіння у сублімаційній сушарці.

ТП 7. Сублімаційне сушіння препарату

Після розливу, піддони завантажують в сублімаційну сушарку (СС-15). Піддони з біомасою охолоджують до температури $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ шляхом подачі фреону в змієвиковий випарник. Заморожування відбувається протягом 16-18 годин. Оптимальна швидкість заморожування становить $-4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$.

Після закінчення процесу заморожування, температуру в сушарці піднімають до $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 72 годин при тиску не більше 0,016 МПа. Температуру піднімають у сушильній камері поступово, приблизно $1-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ за 1 годину. Після сублімації продукт подається на подальшу стадію – подрібнення.

РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

Контроль готової субстанції

Після процесу сублімаційного сушіння здійснюють проміжний контроль таких показників:

- Вміст води.
- Мікробіологічна чистота;
- Якісне визначення ресвератролу.

8.1. Визначення вологовмісту

Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA призначений для точного визначення вологості найрізноманітніших зразків гравіметричним методом [116].

Вимірювання вмісту води в досліджуваному зразку відбувається у такий спосіб [105]:

- проводиться попереднє зважування зразка
- потім зразок нагрівають за спеціально розробленими методиками, режимами і температурними показниками
- після чого знову зважують й визначають втрату води.

При такому аналізі теплового нагрівання зразка можливо також визначати масову частку вільної та зв'язаної води в досліджуваному зразку. Швидкість нагріву і його високі граничні значення (до 199 градусів Цельсія) в аналізаторах вологості METRINCO забезпечуються наявністю галогенного нагрівального елемента.

Висока точність зваження забезпечується ваговим модулем НВМ (Німеччина) – 0,005 г дискретності.

Аналізатор вологості METRINCO M105MA має просте й інтуїтивно зрозуміле керування. Можливо задавати програми за параметрами температури і часу.

Прилад має широке застосування в аналітичних лабораторіях, на виробництві, у харчовій галузі тощо.

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ				
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат					
Розроб.	Возна				РОЗДІЛ 8		Літ.	Арк.	Акрушіє
Перевір.	Резніченко							6	365
							Кафедра БТМ		
Н. Контр.									
Затверд.	Стабніков								



Рис. 5.1 Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA [105]

8.2. Мікробіологічна чистота

Дослідний зразок переносять у колбу, та доводять об'єм зразка до 100 мл стерильною дистильованою водою. негайно фільтрують. Після відмивання мембранний фільтр переносять у живильне середовище або розрізають його, дотримуючись правил асептики, на дві рівні частини, кожен з яких поміщають у відповідне живильне середовище. Використовують ті самі кількості живильного середовища. При використанні установки закритого типу живильне середовище вносять безпосередньо в установку. Посіви інкубують не менше 14 діб при температурі від 30°C до 35°C (живильні середовища, призначені переважно для виявлення бактерій) і при температурі від 20°C до 25°C (живильні середовища, призначені переважно для виявлення грибів) [117].

8.3. Якісне визначення ресвератролу

Аналіз ресвератролу проводили методом рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для аналізу відбирали та змішували 3 мл проб ферментації з 3 мл етилацетату, ретельно перемішують і центрифугували при 12 000 об/хв, протягом 5 хв при 4 °C. Супернатант висушували при кімнатній кімнаті температурі, та повторно розчиняли у 300 мкл ацетонітрилу та фільтрували мембраною 0,22 мкм перед аналізом методом рідинної хроматографії (ВЕРХ) [118].

8.4. Карта постадійного контролю

Таблиця 8.1.

Карта постадійного контролю виробництва ресвератролу

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 2 Зберігання культуральної рідини	Температура	Термометр технічний	Перед початком кожного виробничого циклу	$t = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$
Кт 3.1 Центрифугування культуральної рідини	Час Кількість обертів на хвилину	Тахометр Годинник	Після етапу зберігання культуральної рідини	$T=30\text{хв}$ $w=10200\text{ об/хв}$
Кт 8 Сублімаційне сушіння	Тиск Температура	Манометр Термометр	Під час процесу сублімації	$t = -40\text{ }^{\circ}\text{C}$ $p = 0,016\text{ МПа}$
Кт 12.2 Маркування	Якість маркування, вологості продукту	Аналізатор вологості, ваги, візуально	Після маркування	Відповідність нормативам
Кт 12.3 Пакування	Маса продукту	Аналізатор вологості, ваги, візуально	В процесі пакування	Відповідність нормативам

РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

9.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу

Кількість культуральної рідини за цикл складає $18,8 \text{ м}^3$, при цьому, 30% припадає на втрати. Тоді, за один цикл кількість багреміцинів буде еквівалентно:

$$18,8 \times 0,7 = 13,16 \text{ м}^3$$

Враховуючи концентрацію ресвератролу (125 мг/л), за один цикл отримуємо таку кількість очищеної речовини:

$$13160 \times 125 = 1645000 \text{ мг} \approx 1645 \text{ г}$$

На одну капсулу припадає $0,2 \text{ г}$ ресвератролу. Отже, кількість капсул на 1 серію становить:

$$\frac{1645}{0,2} \approx 8225 \text{ капсул}$$

З врахуванням того, що на одну упаковку припадає 30 капсул препарату, за одну серію одержують упаковок:

$$\frac{8225}{30} \approx 274 \text{ упаковки (1 серія)}$$

Тоді, кількість серій препарату на рік становитиме:

$$\frac{8225}{274} \approx 30 \text{ серій}$$

9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

Для виробництва як стерильних, так і нестерильних продуктів ставляться особливі вимоги з метою мінімізації ризиків забруднення мікроорганізмами та екзотермічними речовинами. Для цього використовуються валідовані умови і методи виробництва [117].

Вимоги до виробництва стерильних лікарських засобів включають наступне:

1. Виробництво стерильних препаратів повинно проводитися в чистих зонах з герметичним доступом до персоналу, обладнання, сировини та матеріалів. Чисті зони повинні відповідати стандартам чистоти та мати ефективне фільтроване повітря.

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ						
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат							
Розроб.		Возна			РОЗДІЛ 9			Лім.	Арк.	Акрушіє	
Перевір.		Резніченко								6	368
Н. Контр.								Кафедра БТМ			
Затверд.		Стабніков									

2. Підготовка компонентів первинного пакування, виробництво та операції з дозування повинні виконуватися в окремих зонах чистого приміщення. Виробничі операції розділяються на ті, де продукт остаточно стерилізується в первинній упаковці, і ті, де етапи виробництва проводяться в асептичних умовах.
3. Чисті зони для виробництва асептичних продуктів класифікуються відповідно до їх характеристик з урахуванням вимог GMP та необхідності чистоти прилеглої території для зменшення ризику забруднення асептичних продуктів. Ці зони повинні бути спроектовані для забезпечення чіткого рівня чистоти повітря в обладнаному стані. Оснащений стан чистого приміщення визначається як готовий до використання, але не зайнятий, тоді як функціональний стан визначається як працюючий відповідно до встановленого режиму та з необхідним персоналом. Розрізняють чотири класи стерильних фармацевтичних виробництв.

У фармацевтичній продукції можуть існувати три типи забруднювачів: частинки (механічний пил, неорганічні речовини), хімічні речовини і мікробні/біологічні речовини. Джерелами цих забруднень може бути навколишнє середовище. Таким чином, чистота навколишнього середовища та обладнання вважається ключовою вимогою GMP [118].

Приміщення для виробництва лікарських засобів повинні відповідати вимогам функціональної придатності для виконання робіт, які в них проводяться. Їх розташування та дизайн мають мінімізувати можливість помилок, запобігати перехресній контамінації та забезпечувати ефективне обслуговування, щоб не впливати негативно на якість продукції [118].

Класифікація чистих приміщень ґрунтується на принципах контролю, розрахунку та забезпечення необхідного класу чистоти повітря для виробничих зон. Необхідний клас чистоти повітря визначається видом робіт у чистому приміщенні та поділяється на стерильні та нестерильні фармацевтичні класи. Класи чистоти включають Клас А (для високоризикових операцій), Клас В (для

навколишнього середовища Класу А), та Класи С і D (для менш критичних етапів виробництва стерильної продукції) [118].

Клас А представляє собою локальну зону, де проводяться операції, при яких ризик контамінації може бути високим і для якості продукції це є критичним (наприклад, зона дозування, закупорювання ємностей, відкривання ампул і флаконів, змішування в асептичних умовах). Ці умови забезпечуються ламінарним потоком повітря на робочому місці з рівномірною швидкістю повітря $0,45 \text{ м/с} \pm 20\%$ [1].

Клас В є навколишнім середовищем для зони класу А у випадках виготовлення і дозування в асептичних умовах.

Класи С і D представляють чисті зони для проведення менш критичних етапів виробництва стерильної продукції [117].

Таблиця 9.1

Вимоги до класу чистоти D

Клас чистоти приміщення	Припустима кількість життєздатних м/о у 1 м^3 повітря у «функціонуючому» стані		Припустима кількість часток розміром	
	Проба повітря КУО/ м^3	Седиментація на пластину ($d=90 \text{ мм}$) КУО/4 год	«Оснащений» стан	
			$\geq 0,5 \text{ мкм}$	$\geq 5,0 \text{ мкм}$
D	200	100	3520000	29000

Отже, виробництво капсул ресвератролу проводять у класі чистоти D, де відбувається виготовлення нестерильних лікарських засобів.

9.3. Обґрунтування вибору підготовки вентиляційного повітря

Вентиляційне повітря підготовлюється за допомогою системи вентиляції та кондиціонування, призначеної для забезпечення внутрішнього мікроклімату відповідно до класів чистоти, параметрів тиску між приміщеннями та кратності повітрообміну. Повітря з оточуючого середовища, при температурі 20°C та вологості 60-90%, всмоктується вентиляторами через припливні шахти висотою 20-30 м для стабілізації концентрації мікроорганізмів. Забірник представляє собою металеву трубу діаметром 100-150 мм [119].

Повітряні фільтри використовуються для забезпечення чистоти повітря згідно з технічними вимогами. Фільтри розподіляються за ефективністю дії або фільтруючою здатністю:

- Фільтри грубої очистки (затримують частинки розміром більше 10 мікрон);
- Фільтри тонкого очищення (затримують частинки розміром більше 1 мікрона);
- Фільтри "абсолютної" високої чистоти (індивідуальні фільтри) [119].

Фільтри тонкого очищення часто використовуються як другий етап очищення в системах вентиляції та кондиціонування повітря, маючи високу ефективність та продуктивність [120].

Технологічна схема стиснення та очищення повітря включає три підсистеми:

1. Атмосферне повітря забирається турбокомпресором через забірну шахту, де стабілізується концентрація мікроорганізмів. Потім повітря проходить через фільтри попереднього очищення, які звільняють його від грубого аерозолі - пилу.
2. Далі повітря проходить через вентилятор, потрапляє у високоефективний фільтр, а потім до теплового обмінника охолоджувача, де видається зайве зволоження.
3. Складається з двох фільтрів другого і третього рівнів очищення (HEPA). Фільтр другого рівня, або головний фільтр, розміщений біля цеху. Після очищення повітря подається у систему повітрообміну для різних класів чистоти приміщень.

Така система дозволяє забезпечити відповідний ступінь чистоти повітря у виробничих приміщеннях фармацевтичного підприємства.

9.4. Підготовка персоналу

На відміну від галузевих нормативів, універсальний за сферою призначення стандарт ДСТУ ISO 9001:2009 (ISO 9001:2008) у п. 6.2.1 містить вимоги стосовно персоналу у такому формулюванні: «Персонал, залучений до робіт, які впливають

на відповідність продукції вимогам до неї, повинен бути компетентним, тобто мати належну освіту, професійну підготовленість, навички та досвід». Також додається, що персонал, залучений до будь-яких робіт в межах системи управління якістю (СУЯ), може впливати на відповідність продукції вимогам до неї безпосередньо чи опосередковано. П. 6.2.2 ДСТУ ISO 9001:2009 вимагає, щоб організація [121]:

- а) визначала необхідний рівень компетентності для персоналу, залученого до робіт, які впливають на відповідність продукції вимогам до неї;
- б) якщо це застосовно, забезпечувала проведення навчання або вживала інших заходів для досягнення потрібної компетентності;
- в) оцінювала результативність вжитих заходів;
- г) забезпечувала обізнаність персоналу щодо доцільності та важливості своєї діяльності та щодо свого внеску в досягнення цілей у сфері якості;
- д) вела відповідні записи стосовно освіти, професійної підготовленості навичок і досвіду.

За результатами порівняння й узгодження відповідних вимог стандарту ДСТУ ISO 9001:2009 та ліцензійних вимог, до яких імплементовані вимоги GMP ЄС, можна зробити такі висновки [121]:

- підприємства з виробництва лікарських засобів (ПВЛЗ) має забезпечувати належну кваліфікацію і компетентність (за визначенням ДСТУ ISO 9000:2007 [10, п. 3.1.6] – доведена здатність застосовувати знання та вміння персоналу, робота якого прямо або опосередковано впливає на відповідність вимогам до продукції);
 - ПВЛЗ має забезпечувати первинне та періодичне навчання персоналу;
 - ПВЛЗ повинне мати затверджені навчальні програми, застосовні для підготовки персоналу, охопленого ФСЯ. Ці програми мають стосуватись теорії і прикладних аспектів застосування концепції забезпечення якості та GMP, а також специфічні фахові питання;
 - ПВЛЗ має періодично оцінювати практичну ефективність навчання.
- Можна впевнено констатувати, що від правильності і повноти виконання цих

вимог напряду залежить успіх впровадження фармацевтичної системи якості (ФСЯ) та рівень «дієздатності» системи у подальшому. Отже, дослідження з визначення методів і засобів підготовки персоналу ПВЛЗ з питань управління якістю при формуванні і постійній підтримці ФСЯ слід визнати важливими і необхідними.

9.5. Підготовки дезінфікуючих засобів

Загальна характеристика дезінфікуючих та миючих засобів

Очищення та дезінфекція в промисловості представляють собою ключові процеси у будь-якому виробничому циклі. Неправильне виконання цих процесів може призвести до серйозних наслідків. Для досягнення ретельності та ефективності очищення та дезінфекції важливо розуміти різновиди забруднень і залишків, які потрібно видалити. Ці забруднення можуть бути органічного або неорганічного походження [122].

Очищення та дезінфекція є двома відмінними процесами. Ефективне очищення означає повне видалення забруднень і залишків з поверхні, в результаті чого поверхня стає візуально чистою. Після успішного очищення слідує етап дезінфекції. Очищені поверхні можуть виглядати чистими, проте мікроорганізми залишаються присутніми до моменту дезінфекції [122].

Процедури очищення та дезінфекції включають наступні кроки:

Крок 1: Загальне прибирання з миючим засобом

Цей етап передбачає комплексне очищення поверхонь або обладнання, використовуючи відповідний миючий засіб. Метою є видалення видимого бруду, частинок їжі, жиру та сміття. Процес починається і закінчується ополіскуванням, щоб переконатися, що всі видимі залишки забруднень видалені з поверхонь миючим розчином.

Крок 2: Дезінфекція

Другий етап виконується з метою зниження кількості присутніх бактерій до стандартних рівнів. Для цього використовують дезінфікуючі засоби з дотриманням інструкцій. Важливо враховувати, що дезінфекція ефективна лише

на чистих поверхнях. Щоб завершити процес дезінфекції, дезінфікуючий засіб слід змити чистою водою, якщо це не є розчин, що не потребує змивання [123].

Основна мета дезінфекції - це запобігти або усунути накопичення, розмноження і поширення збудників інфекційних захворювань у навколишньому середовищі. Для досягнення цієї мети використовують різноманітні методи, такі як механічні, фізичні, хімічні, біологічні та комбіновані.

Механічні методи дезінфекції забезпечують видалення патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів з об'єктів навколишнього середовища за допомогою струшування, вологого протирання, провітрювання, миття, вологого чищення та очищення. Ці методи є простими і доступними, хоча їх недоліком є неможливість повного знезараження об'єкта.

Фізичні методи дезінфекції використовують фізичні фактори, такі як висушування, висока температура, гаряче повітря, пара, ультрафіолетові промені та ультразвук для видалення мікроорганізмів з об'єктів [124].

Хімічна дезінфекція є основним методом для знищення патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів на поверхнях, всередині об'єктів та навколишньому середовищі, а також у повітрі та на різних субстратах. Цей метод використовує різноманітні хімічні речовини та їх сполуки [124].

Усі хімічні речовини для дезінфекції можна розділити на кілька основних груп відповідно до їхніх активних інгредієнтів:

- Галогеновмісні сполуки;
- Окислювачі або кисневмісні сполуки;
- Поверхнево-активні речовини (ПАР);
- Гуанідиновмісні сполуки;
- Альдегідовмісні речовини;
- Спирти;
- Луги;
- Кислоти;
- Комплекси (містять деякі діючі речовини з вищезазначених груп дезінфікуючих засобів) [124].

Мийні засоби, або миючі засоби, представляють собою поверхнево-активні речовини (ПАР) або їх суміші, які мають "мийні властивості в розведеному розчині". Згідно з Постановою Кабінету Міністрів України, мийні засоби в Україні - це речовини і препарати, які містять мило та інші поверхнево-активні речовини, призначені для миття і чищення, і можуть мати різні форми, такі як рідина, порошок, паста, брусок, плитка або таблетка [124].

Миючі засоби повинні відповідати певним критеріям, таким як:

- Інгредієнти мийного засобу не повинні бути мутагенними, тератогенними, канцерогенними або ембріотоксичними для організму;
- Добре розчинятися у воді;
- Мати високу миючу здатність;
- Легко та швидко виполіскувати посуд та інвентар;
- Біологічно розкладатися (>80%) у воді, оскільки вони мають негативний вплив на природне самоочищення та водні організми.

З іншого боку, миючі засоби не повинні:

- Накопичуватися в організмі людини;
- Мати різкий та стійкий запах;
- Впливати на якість продукту;
- Чинити шкідливого впливу на об'єкти, що очищаються [125].

Щоденне прибирання. Виробничі приміщення піддаються очищенню за допомогою 2% розчину Хлорантоїну. Кожен день ручки та нижню частину дверей ретельно протирають ганчіркою, змоченою у дезінфікуючому розчині. Підлога в приміщенні покрита плиткою з нахилом у бік сходів. Всі роботи виконуються в захисних окулярах, гумових рукавичках, респіраторах і гумових фартухах. Прибиральниці відповідають за генеральне прибирання виробничих, підсобних та побутових приміщень, тоді як самі працівники відповідають за прибирання робочих зон. Для виробничих приміщень, а також стін, підліг, вікон та дверей використовують Хлорантоїн та Дезекон, змінюючи засіб кожні 3 місяці для уникнення утворення резистентних форм мікроорганізмів. Для миття обладнання

використовують Каустичну соду та Біомой, також змінюючи засіб кожні 3 місяці. Об'єм дезінфікуючого розчину становить приблизно 100 мл на метр площі.

Генеральне прибирання проводиться раз на місяць, використовуючи аналогічні дезінфікуючі розчини, і при виявленні грибків у повітрі підвищують концентрацію дезінфікуючого засобу.

9.6. Обґрунтування форми випуску ЛЗ

У кваліфікаційній роботі розглядається виробництво профілактичного та протиракового лікарського препарату ресвератрол. На даний час, дослідження та впровадження цього препарату тільки ведуться. Зараз на ринку США та світу він представлений, як біологічно-активна добавка, основна речовина якої є ресвератрол. Випускається БАД (переважно) у вигляді твердих желатинових капсул у пластиковій або скляній тарі. Тому, основною формою застосування обираємо перорального спосіб введення.

Введення через рот (per os). Цей шлях введення застосовується найчастіше, тому що він простий, зручний і не вимагає стерильності лікарських препаратів внаслідок бактерицидної дії шлункового соку. Однак, варто мати на увазі, що лікарські речовини (наприклад, інсулін, пітуїтрин, адреналін, пеніцилін і ін.), прийняті через рот, піддаються руйнівній дії шлункового і кишкового соку. Щоб захистити лікарські засоби від цього, застосовують нерозчинні в шлунку або розчинні в кишечнику оболонки[125].

Варто пам'ятати, що в ряді випадків застосовувати лікарські препарати перорально не можна: при непрохідності стравоходу, якщо лікарські засоби володіють вираженими подразнюючими властивостями, при блювоті та ін [125].

Переваги лікарських засобів в желатинових капсулах [126]:

- висока біодоступність;
- точність дозування;
- гарний зовнішній вигляд;
- легко проковтуються, швидко набухають;
- желатинові капсули легко розчинні, вони проникні для травних соків і

лікувальна дія лікарської речовини проявляється швидко (у середньому через 4 – 5 хв). Шляхом введення до складу желатинових стінок допоміжних речовин або покриття спеціальними плівками вдається одержувати капсули з різною швидкістю вивільнення й локалізацією дії лікарської речовини;

- оболонка з желатину захищає лікарську форму від впливу повітря, світла, вологи, пилу, захищає від механічних зовнішніх впливів, коливань температури. Желатинова оболонка непроникна для кисню, що має велике значення для збереження засобів, які легко окиснюються, наприклад вітамінів, вона непроникна для летких рідин;

- уміщення в оболонку зручне для відпускання речовин, що мають неприємний смак, запах та колір, оскільки руйнування її і вивільнення діючих речовин відбувається в певному відділі шлунково-кишкового тракту. Тому капсули дуже перспективні для застосування в педіатрії і геронтології;

- виготовлення капсул майже цілком механізоване й автоматизоване.

Недоліки лікарських засобів в желатинових капсулах:

- у желатинових капсулах можуть відпускатися тільки ті речовини, що не вступають у взаємодію із гліцерином і желатином та не розчиняють їх;

- желатинова маса є прекрасним середовищем для розвитку мікроорганізмів;

- висока чутливість до вологи – гігроскопічність.

Отже, зважаючи на всі вищезазначені особливості застосування даної ЛФ, можна зробити висновок, що наразі єдина оптимальна форма випуску лікарського препарату з ресвератролом – є тверда желатинова капсула для перорального застосування.

9.7 Обґрунтування вибору упаковки ЛЗ
АНАЛІТИЧНИЙ НОРМАТИВНИЙ ДОКУМЕНТ
 для проведення вихідного контролю якості

Банки пластикові
СПЕЦИФІКАЦІЯ

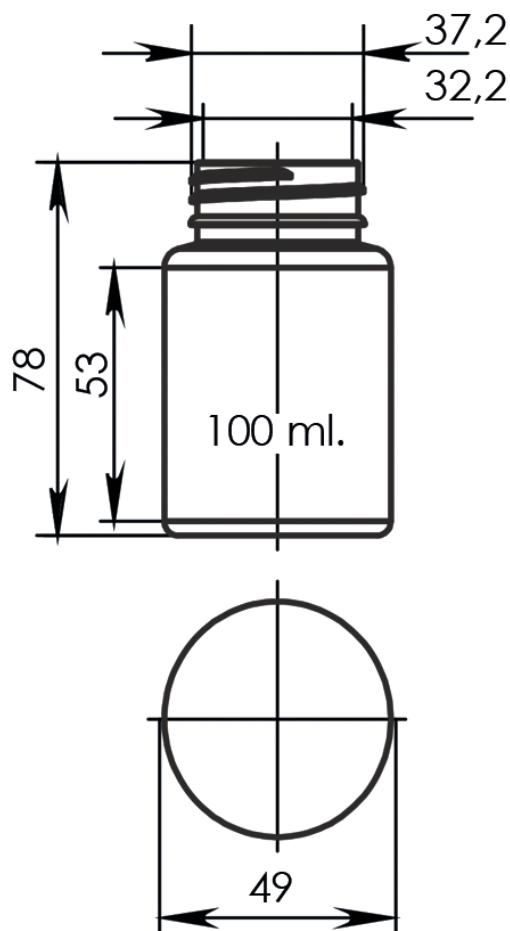


Рис. 9.1 Приклад пластикової баночки для ЛЗ

Лікарська форма	Вид споживчої тари	Закупорювальний засіб або метод закупорювання
Капсули	Полімерна банка круглого перетину для лікарських засобів	Надягається полімерна кришка полімерна пробка Полімерна пробка з амортизатором

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю	Примітка
Зовнішній вигляд*	Допустимі межі відхилення та відповідності згідно внутрішнього контролю та відповідності внутрішньої документації (ТУ).	За п. 1	Контроль здійснює ВКЯ
Контроль та обробка результатів вимірювань*	При контролі перевіряють зовнішні габаритні розміри упаковки (діаметр, довжина, ширина і висота), а також приєднувальні розміри горловини упаковки (внутрішні та зовнішні діаметри).	За п. 2	Контроль здійснює ВКЯ
Контроль діаметрів, довжини, ширини упаковки штангенциркулем*	Відхилення та відповідність параметрів згідно внутрішнього контролю та відповідності внутрішньої документації (ТУ).	За п. 3	Контроль здійснює ВКЯ
Контроль висоти упаковки штангенрейсмасом*	Контрольований зразок упаковки встановлюють вертикально на перевірочну (розмічальні) плиту по ГОСТ 10905. Встановлюють на цю ж плиту штангенрейсмас по ГОСТ 164. Плавню зменшують висоту ніжки штангенрейсмаса до торкання з торцем горловини упаковки. Фіксують свідчення штангенрейсмаса.	За п. 4	Контроль здійснює ВКЯ
Контроль калібрами*	При контролі висоти упаковки калібрами - зразок при обертанні навколо своєї осі повинен проходити під площиною "максимальна висота" або не проходити під площиною "мінімальна висота".	За п. 5	Контроль здійснює ВКЯ
Контроль товщини стінки*	Відхилення та відповідність параметрів згідно внутрішнього контролю та відповідності внутрішньої документації (ТУ).	За п. 6	Контроль здійснює ВКЯ
Контроль маси*	Відхилення та відповідність параметрів згідно внутрішнього контролю та відповідності внутрішньої документації (ТУ).	За п. 7	Контроль здійснює ВКЯ

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1.1. Зовнішній вигляд. Зовнішній вигляд, якість поверхні і покриттів, маркування перевіряють візуально без застосування збільшувальних приладів, шляхом порівняння із зразками-еталонами (при наявності), по стандартам і технічній документації на конкретні види упаковки.

Колір виробу оцінюють візуально порівнянням із зразком-еталоном при природному і штучному освітленні і / або в світловому шафі (на світловому столі).

1.2. Контроль та обробка результатів вимірювань. Зовнішній діаметр упаковки вимірюють в місці найбільшого діаметра в двох взаємно перпендикулярних напрямках. За результат вимірювання беруть середнє арифметичне значення двох вимірювань, при цьому різниця між двома вимірами не повинна перевищувати сумарний допуск.

При контролі габаритних розмірів упаковки контроль проводять в місці найбільшого перетину упаковки.

Внутрішній і зовнішній діаметри горловини упаковки вимірюють в двох взаємно перпендикулярних положеннях. За значення вимірювання приймають середньоарифметичне значення двох вимірювань, при цьому різниця між двома визначеннями не повинна перевищувати сумарний допуск.

Висоту упаковки визначають в двох протилежних напрямках. За результат вимірювання висоти приймають середньоарифметичне значення двох визначень.

Розміри повинні відповідати встановленим в стандартах і / або технічній документації на конкретні види упаковки.

1.3. Контроль діаметрів, довжини, ширини упаковки штангенциркулем. Губки штангенциркуля за ГОСТ 166 розсовують на величину, трохи більшу, ніж вимірюваний розмір упаковки. Встановлюють штангенциркуль так, щоб зразок був розташований паралельно осі, а губки штангенциркуля - перпендикулярно до вимірюваного розміру зразка упаковки. Плавнo зменшують відстань між губками штангенциркуля до їхнього зіткнення із зразком упаковки.

1.4. Контроль висоти упаковки штангенрейсмасом. Контрольований зразок упаковки встановлюють вертикально на перевірочну (розмічальні) плиту по ГОСТ 10905. Встановлюють на цю ж плиту штангенрейсмас по ГОСТ 164. Плавно зменшують висоту ніжки штангенрейсмаса до торкання з торцем горловини упаковки. Фіксують свідчення штангенрейсмаса.

1.5. Контроль калібрами. Зразок упаковки встановлюють між прохідними сторонами калібру, а потім між непрохідними. Зразок повинен вільно проходити між прохідними і не проходити між непрохідними сторонами. При контролі діаметра горловини упаковки калібр по черзі вставляють прохідної й непрохідної стороною в горловину зразка упаковки. Прохідна сторона повинна проходити вільно, без зусилля. Непрохідна сторона калібру повинна бути більше діаметра горловини.

1.6. Контроль толщины стінки. Для контролю товщини стінки методом неразрушающего контроля используют магнитно-индукционные толщиномеры; при контроле толщин изделий методом разрушающего контроля на плоских участках могут быть использованы гладкие микрометры по ГОСТ 6507, на закругленных участках - индикаторы часового типа по ГОСТ 577, штативы для измерительных головок - по ГОСТ 10197.

1.7. Контроль маси. Засоби контролю і допоміжні пристрої - відповідно до стандартів або технічною документацією на конкретний вид упаковки.

Порядок підготовки і проведення контролю

Кожен зразок зважують на терезах по ГОСТ OIML R 76-1.

Маса упаковки повинна відповідати зазначеній в технічній документації на конкретний вид упаковки.

МАРКУВАННЯ

Державна служба з лікарських засобів та контролю за наркотиками нагадує, що частиною першою ст. 12 Закону України «Про лікарські засоби» від 04.04.1996 № 123/96-ВР (далі – Закон № 123/96-ВР) передбачено: маркування, що наноситься на етикетку, зовнішню та внутрішню упаковку лікарського засобу, повинно містити такі відомості [127]:

- назву лікарського засобу;
- назву та адресу його виробника;
- реєстраційний номер;
- номер серії;
- способи застосування;
- дозу діючої речовини в кожній одиниці та їх кількість в упаковці;
- термін придатності;
- умови зберігання;
- запобіжні заходи.

ТРАНСПОРТУВАННЯ І ЗБЕРІГАННЯ

- Транспортування і зберігання пакувальних лікарських засобів повинні проводитися відповідно до ГОСТ 17768-80.
- При транспортуванні морським транспортом лікарські засоби упаковують в контейнери.

9.8. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Отже, до допоміжних стадій буде відноситись підготовка вентиляційного повітря. Далі відбуватиметься технологічний процес, який буде починатись зі створення самого препарату (у формі твердих желатинових капсул), а саме утворення маси для наповнення (діоксид кремнію, стеарат магнію, ресвератрол).



Рис. 9.2. Мобільний лабораторний змішувач сипучих компонентів [128].

Після отримання гомогенізованої капсульної маси її направляють на гранулювання у гранулювальний апарат. Гомогенізація та гранулювання гранул сухих і мокрих, подрібнення і гранулювання грануляту агломерату, гранулювання мокрих матеріалів і розкидання теплочутливих матеріалів. Екран виготовлений із неіржавкої сталі.



Рис. 9.3. Гранулятор [129].

Після готову капсульну масу подають на автоматичну лінію наповнення та формування твердих желатинових капсул. Повністю автоматична машина для наповнення капсул - це новітнє обладнання, яке повністю відповідає вимогам GMP, ISO та США FDA. Ця машина дуже приємна, пристойна і проста в експлуатації, особливо шафа електричного управління незалежна від машини, яка відповідає вимогам FDA і CE, що стосується безпеки оператора. Це новостворений повністю автоматичний закритий переривистий капсульна машина для заповнення капсул з декількома станціями для ущільнення. Вона завершує наступний процес: подача капсули, від'єднання капсули, наповнення, викидання несправної капсули, закриття капсули, вивантаження готової капсули автоматично. Ця машина може бути оснащена вакуумним навантажувачем для капсул і порошку, що знижує вартість вокерів, а всі операції проводяться на

сенсорному екрані, який є машиною з високою автоматизацією води, електрики та пневматики [130].



Рис. 9.4. Автоматична машина для наповнення капсул [130].

Після наповнення вже готові капсули подаються на автоматичну лінію підрахунку та фасування. Лічильник капсул і таблеток був розроблений і створений спеціально для рахунку та наповнення баночек. Автоматичний Лічильник Капсул і таблеток "S-1700" може бути використана для різних форм і розмірів м'яких желатинових капсул, для фасування та рахунку твердих желатинових капсул, для фасування таблеток, для лічби цукрозамінника, таблеток з оболонкою після коутера, таблеток із лікарськими травами, глазуrowані драже.



Рис. 9.5. Автоматична лінія підрахунку та наповнення капсулами [131].

Після фасування капсул у баночку їх вручну пакують в групову тару у вигляді картонної коробки. На цій коробці вказують номер партії та дату виготовлення. Передають на склад на зберігання.

РОЗДІЛ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ВИРОБНИЦТВА

ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ РЕСВЕРАТРОЛУ

10.1. Специфікація обладнання ділянки виробництва препарату

Специфікація обладнання для виробництва лікарського засобу ресвератролу, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в *табл. 10.1*.

Таблиця 10.1.

Специфікація обладнання ділянки виробництва ресвератролу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Пристрій забірний, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Виробник: Україна [1].
Ф – 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯП, Фільтруючий матеріал – мати зі скловолокна, $E = 80 \pm 5 \%$, продуктивність – $7000 \text{ м}^3/\text{год}$ [2].
В – 3	Вентилятор	1	Вентилятор VENTS, Україна. Його корпус виготовлений з оцинкованої сталі, що робить його стійким до різного роду пошкоджень і забезпечує тривалий термін служби вентилятора. Використовується для повітроводів діаметром 150 мм. Продуктивність - $455,0 \text{ м}^3/\text{год}$. Частота обертання 2770 об./хв [https://vents.ua/catalog/domestic/].
ВЕФ – 4	Високоєфективний фільтр	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає $3400 \text{ м}^3/\text{год}$ [4].
ТО – 5	Теплообмінник-охолоджувач	1	Витрата: до $640 \text{ м}^3/\text{год}$ Робочий тиск: 140 атм. Температура: -195°C - $+220^\circ \text{C}$ Нержавіюча сталь AISI 316 Виробник: Швеція [5].
ТН – 6	Теплообмінник-нагрівач	1	Корпус виконаний з оцинкованої сталі, колектори виконані з мідної труби, теплообмінні пластини з алюмінію. Монтажний розмір 1000×500 (мм), довжина 200 мм, приєднання труб муфтове G1. Потужність теплообмінника складає 80 кВт, при температурі теплоносія 70°C . [6].

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ		
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 10		
Розроб.	Возна						
Перевір.	Резніченко						
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков				Кафедра БТМ		
					Лім.	Арк.	Акрушів
						6	386

ФН – 7	Фільтр НЕРА	2	Високоєфективні НЕРА-фільтри призначені для високоєфективного (остаточного) очищення повітря. Для стандартного використання фільтра температура повітря, що очищується, повинна бути від -40°C до +80°C, а відносна вологість - нижче 95%. Продуктивність фільтра - 3 400 м3/год. Ступінь очищення повітря 99,95% [7].
ДР – 8	Дробарка	1	Модель: YF8-1 Продуктивність: 10-50 кг/год Кіл-ть сит, розмір сит 4 шт: 6мм, 250, 177, 149, 105 мікрон Кіл-ть обертів: 2800 об/хв Напруга: 220 вольтів Потужність: 3 кВт Вага: 65 кг Розміри: 580x360x480 мм Водяне охолодження відсутнє [8].
ОВД – 10	Об'ємно-ваговий дозатор	1	Матеріал корпусу: нержавіюча сталь Діапазон зважування, г 10-5000 Діапазон зважування з двома бункерами, г 10-10000 Продуктивність, зважувань/хв 10-20 Швидкість наповнення, пакунків/год 600 Точність зважування, г 2-6 Робочий діапазон температур, °C 10...40 Потужність, Вт 360 Напруга живлення, В/Гц 220/50 Розміри бункера, мм 640 x 320 x 320 Габаритні розміри, мм 640 x 650 x 1570 Вага машини, кг 80 [9]
ВС – 9 ВС – 12	Вібросито	2	Вібросито Компанія: BUDMASH Виробник: Україна [10].
3 – 11 3 – 15 3 – 17	Збірник	3	Ємність з нержавіючої сталі Виробник: Україна [11].
ГР – 14	Гранулятор	1	Фармацевтичний гранулятор Арех Multiplex модель DUA-12. Гранулятор обладнаний ротором маятникового типу, для грануляції порошків. Завантажувальна горловина має розмір 150 x 150 мм. Привід з частотним перетворювачем потужністю 0,75 кВт. Виготовлений з нержавіючої сталі [12].
ПТНК – 16	Підготовка та наповнення капсул	1	Споживана потужність: 3 кВт ○ Країна виробник: Китай ○ Максимальна продуктивність: 450000 кг/год ● Загальні параметри ○ Вага: 800 кг ○ Висота: 1700 мм

			○ Ширина: 720 мм ○ Довжина: 680 мм • Параметри мережі ○ Напруга: 380 В [13].
ПКМ – 18	Пристрій для контролю маси капсул	1	Автоматичний пристрій для контролю маси капсул Виробник: Україна
ЗБ – 19	Завантаження баночки капсулами	1	Автомат для фасування капсул або таблеток в банку Виробник: Україна
НК – 20	Накручування кришечкою	1	Автомат закручування кришки Виробник: Україна
УК – 21	У коробки	1	Автоматична картонажна машина Виробник: Україна
ЗК – 22	Загальна коробка	1	Наповнення в коробки по 10 упаковок

Примітка:

1.

[https://prom.ua/ua/p3866044-vozduhosborniki-gorizontalnye-vertikalnye.html?&primelead=NC4z](https://prom.ua/ua/p3866044-vozduhosborniki-gorizontalnye-vertikalnye.html?&primelead=NC4z;);

2. <https://newfilter.com.ua/ua/ventilacia/filtruyuchiy-material-g4.html>;

3.

https://vents-shop.com.ua/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAkeSsBhDUARIsAK3tiefd6BkotpL0qKv8exyrCxCIJoB_ejqGna1pjTjkkPDDclAPf3wAjgt3YaAsd4EALw_wcB&sl=uk;

5.

<https://termoprom.com.ua/teploobmenniki/po-naznacheniyu/teploobmenniki-dlya-kotlov-ventilyacii-kondicionirovaniya>;

6.

https://www.galactic.kiev.ua/pages/painting_cameras_equipment/air_heating_system.php;

7.

<https://tehno-parts.com.ua/ventiliatsiia/filtry-dlia-ventiliatsii/hepa-filtry>;

8.

<https://chumaki.in.ua/ua/p606012619-podribnyuvach-yf8-mlin.html>;

9.

https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz-5000?pk_campaign=GoogleMerchant&gad_source=1&gclid=CjwKCAiA8YyuBhBSEiwA5R3-EzJ2pHeVJV-54wmOrWu0MTrgPGdN5LWRqltwZ4gTwo1r2oPQXQpDuxoCJnsQAvD_BwE;

<https://budmash.ua/vibrosita>;

<https://wise-master.com.ua/ua/g24447793-emkosti-nerzhaveyuschie>;

<https://prom.ua/ua/p1417310245-sushka-psevdoozhizhennom-sloe.html?&primelead=MC44NQ>;

<https://www.sinoped.com/uk/products-detail-979118>;

РОЗДІЛ 11. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюється повітрозбірником (ПЗ-1) Повітря збирають з висоти приблизно 20-30 м.

ДР 1.2. Очищення повітря на фільтрі грубої очистки

На стадії попереднього очищення повітря видаляється основна маса великих частинок пилу діаметром 150-300 мкм. В якості фільтрів попереднього очищення використовують фільтри грубої очистки – ФЯП. Який складається з рамки, виготовленої з оцинкованої сталі, усередині якої покладений об'ємний фільтруючий матеріал (поліуретан) (Ф-2).

Повітря, яке подається в чисті приміщення піддається очищенню спочатку в фільтрах типу G4 в кондиціонері, потім в фільтрах тонкого очищення типу F9 в кондиціонері.

ДР 1.3. Очищення повітря на вискоефективному фільтрі

Такі фільтри здатні вловлювати частинки розміром від 10 до 100 мкм. При цьому вони мають клас фільтрації F5-F9. Вони використовуються як другий ступінь очищення повітря в приміщеннях з підвищеними вимогами до чистоти повітря. Ступінь очистки складає 99%.

ДР 1.4. Охолодження та видалення вологи

Повітря «переохолоджують» до температури 25–40 °С в теплообміннику-охолоджувачі (ТО-5). При охолодженні стисненого повітря випадає 50 – 70 % вихідної вологи, яка відділяється вологовідділювачами.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи головного і індивідуального фільтрів, повітря нагрівають до температури до 60°С в теплообміннику-нагрівачі (ТН-6).

ДР 1.6. Очищення повітря на вискоефективних фільтрах HEPA

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ		
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 11		
Розроб.	Возна						
Перевір.	Резніченко						
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков				Кафедра БТМ		
						Літ.	Арк.
							6
							3
						89	

Повітря, очищене в фільтрах тонкого очищення далі очищується в фільтрах високоефективного очищення повітря типу H12 (ступінь очистки 99,95%) безпосередньо перед випуском в чисті приміщення.

ТП 2. Подрібнення та просіювання

ТП 2.1 Подрібнення

Далі, готовий сублімат, подають на стадію подрібнення, на молотковій дробарці (ДР-8, розмір частинок 2 мм). Після подрібнення препарат подають на стадію просіювання (ТП 2.2).

ТП 2.2 Просіювання

Подрібнену сировину (від ТП 9.1), просіюють на вібраційному ситі (ВС -7, діаметр пор 2 мм). Просів подають на стадію ПМВ. Відсів подається на стадію знищення відходів (ЗВ 6.2).

ТП 3. Підготовка капсульної маси

ТП 3.1. Контроль вихідної сировини

ТП 3.1.1. Зважування сировини

На об'ємно-ваговому дозаторі (ОВД-10) зважують діоксид кремнію та стеарат магнію (зі складу) та завантажують сухий порошок ресвератролу (від ТП 2.2). Зважена сировина завантажується до збірника (З-11).

ТП 3.1.2. Просіювання сировини

Зважені компоненти зі збірника (від ТП 3.1.1) пропускають через вібраційне сито (ВС-12) та збирають до збірника – змішувача (ЗЗ-13), та зволожують водою очищеною.

ТП 3.2. Гранулювання маси для наповнення капсул

ТП 4. Наповнення. Обезпилення. Палірування.

ТП 4.1. Орієнтування порожніх капсул

ТП 4.2. Розкриття порожніх капсул

ТП 4.3. Наповнення корпусу капсул

ТП 4.4. Закриття корпусу капсул

ТП 4.5. Обезпилення та палірування наповнених капсул

ПМВ 5. Пакування. Маркування. Відвантаження

ПМВ 5.1. Фасування наповнених капсул у пластикові баночки з кришечкою.

ПМВ 5.2. Маркування

Закриті баночки з капсулами, маркуються на автоматичній лінії фасування етикеткою, на якій зазначають назву препарату, номер партії, дату виготовлення, термін та умови зберігання, особливі відмітки.

ПМВ 5.3. Пакування наповнених баночок у вторинну картонну упаковку

ПМВ 5.4. Пакування баночок у групову тару

Готові баночки, пакують у групову тару зі складу, для подальшого зберігання

ПМВ 5.5. Зберігання готового продукту

Зберігати готовий препарат рекомендовано за кімнатною температурою(20°C).

ЗВ 6. Знешкодження відходів

ЗВ 6.1. Знешкодження рідких відходів

Рідкі відходи, зібрані в каналізаційній системі, направляються на біофільтр, який біологічно очищає забруднену воду. У біофільтрі рідкі відходи проходять через фільтруючий матеріал і очищаються біологічною плівкою, яка утворюється на ньому. Проходячи через завантаження біофільтра, забруднені відходи залишають після себе нерозчинні домішки в біофільтрі.

ЗВ 6.2. Знешкодження твердих відходів

Тверді відходи, а саме біомаса після процесу фільтрації потрапляє у ємність. Після чого біомасу термічно інактивують та утилізують.

РОЗДІЛ 12. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД

Відповідно до вітчизняних та міжнародних вимог до виробництва лікарських препаратів на готову субстанцію повинна бути розроблена нормативна документація.

АНАЛІТИЧНИЙ НОРМАТИВНИЙ ДОКУМЕНТ

для проведення вихідного контролю якості

Тверда желатинова капсула

Ресвератрол у твердій желатиновій капсулі

Resveratrol in a hard gelatin capsule

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю	Примітка
Зовнішній вигляд*	Допустимі межі відхилення та відповідності згідно внутрішнього контролю та відповідності внутрішньої документації (ТУ), та ДФУ	За п. 1	Контроль здійснює ВКЯ, ДФУ
Маса капсули*	Лікарський засіб витримав випробування, якщо не більше двох індивідуальних мас відхиляються від середньої маси на величину, яка перевищує значення, середня маса менше 300 мг (припустиме відхилення 10%), 300мг і більше (7,5%)	За п. 2	Контроль здійснює ВКЯ, ДФУ 2.9.5
Однорідність вмісту*	Відхилення та відповідність параметрів згідно внутрішнього контролю та відповідності внутрішньої документації (ТУ).	За п. 3	Контроль здійснює ВКЯ, ДФУ 2.9.6
Розмір капсул*	Допустимі межі відхилення та відповідності згідно внутрішнього контролю та відповідності внутрішньої документації (ТУ), та ДФУ	За п. 4	Контроль здійснює ВКЯ, ДФУ

*Державна Фармакопея України

					НУХТ БТЕК КР 02.02.05 ПЗ		
Змн	Арк.	№	Підпис	Дат	РОЗДІЛ 12		
Розроб.	Возна						
Перевір.	Резніченко						
Н. Контр.							
Затверд.	Стабніков				Кафедра БТМ		
					Літ.	Арк.	Акрушів
						6	3
					92		

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ КАПСУЛ

1.1.Зовнішній вигляд. Зовнішній вигляд, якість поверхні і покриттів, маркування перевіряють візуально без застосування збільшувальних приладів, шляхом порівняння із зразками-еталонами (при наявності), по стандартам і технічній документації на конкретні види упаковки.

Колір виробу оцінюють візуально порівнянням із зразком-еталоном при природному і штучному освітленні і / або в світловому шафі (на світловому столі).

Тверді капсули призначені для дозування сипких порошкоподібних, гранульованих і мікрокапсульованих речовин. Капсули повинні мати гладку поверхню без пошкоджень і видимих повітряних і механічних включень.

1.2.Маса капсули. Зважують нерозпаковану капсулу. Потім розпаковують капсулу в такий спосіб, щоб не була втрачена будь-яка частина оболонки, і видаляють якомога повніше її вміст. Якщо капсули з м'якою оболонкою, промивають оболонку ефіром або іншим підходящим розчинником і залишають на повітрі до видалення запаху розчинника. Потім зважують оболонку. За різницею зважувань розраховують масу вмісту капсули. Повторюють процедуру з іншими 19 капсулами.

1.3.Однорідність вмісту. Капсули з вмістом діючої речовини менше 2 мг або менше 2 % від маси вмісту мають витримувати випробування однорідності вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу (тест В), якщо немає інших зазначень в окремій статті. Якщо лікарська форма містить більше однієї діючої речовини, вимоги поширюються лише на ті речовини, вміст яких відповідає вищезазначеним умовам. Дане випробування не поширюється на полівітамінні препарати і препарати, що містять мікроелементи.

1.4.Розміри капсул. Тверді капсули залежно від місткості виготовляють вісьмох розмірів — від 000 (найбільшого розміру) до 5 (найменшого розміру). Номери капсул і відповідна їм місткість наведені у таблиці нижче.

Показники якості	Регламентовані дані	Методи контролю
Опис	Білий кристалічний порошок	п. 1 (візуально). Контроль здійснює ВКЯ
Мікробіологічна чистота	Згідно прийнятих критеріїв від виробника	ДФУ 2.6.1
Упаковка	Полімерна банка круглого перетину для лікарських засобів з кришкою	
Маркування	На етикетці англійською мовою зазначають країну - виробник, фірму - виробник, її товарний знак і адресу, назву субстанції, масу субстанції, відповідність Європейській Фармакопеї, умови зберігання, номер серії, дату виготовлення, термін зберігання.	
Умови зберігання	В захищеному від світла місці при температурі не вище 25 °C	
Термін придатності	5 років	

СПЕЦИФІКАЦІЯ СУБСТАНЦІЇ

Ресвератрол

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ СУБСТАНЦІЇ

1.1. Опис. Кристалічний порошок білого або майже білого кольору.

1.2. Мікробіологічна чистота. Випробування методом мембранної фільтрації. Використовують мембранні фільтри з номінальним розміром пор не більше 0.45 мкм, здатні ефективно затримувати мікроорганізми. Для водних, розведених спиртових розчинів та розчинів в оліях використовують, наприклад, целюлозно-нітратні мембранні фільтри, а для концентрованих спиртових розчинів - целюлозно-ацетатні мембранні фільтри. Якщо необхідно, для деяких лікарських засобів, наприклад, для антибіотиків, можуть бути використані спеціальні мембранні фільтри.

Використовують мембранні фільтри діаметром близько 50 мм. При використанні мембранних фільтрів іншого діаметра об'єм розчинника і промивної рідини змінюють відповідним чином. Фільтраційну установку і мембранні фільтри стерилізують підходящим способом. Конструкція фільтраційної установки має забезпечувати асептичні умови при внесенні та фільтрації лікарського засобу, а також при видаленні мембранного фільтра для переносу його у живильне середовище або має дозволяти проводити інкубацію посівів безпосередньо у самій установці після додавання в неї живильного середовища.

1.3. Визначення кількісного вмісту ресвератролу методом ВЕРХ [132].

Для визначення кількісного вмісту ресвератролу в препараті було використано рідинний хроматограф Agilent 1290 з чотирьох канальним насосом для формування градієнту низького тиску, автосамплером, термостатом колонки та мас-спектрометром Agilent 6420 Triple Quad. Для обробки отриманих результатів дослідження використовували програмне забезпечення MassHunter B04.01. В якості стандартного зразку використовували СЗ ресвератрол фірми Sigma Aldrich, Німеччина (серія №SLBS8228).

Рухома фаза: А: 0,005М розчин форміату амонію в воді Р; В: 0,005М розчин форміату амонію в суміші ацетонітрил Р – вода Р (90:10), дегазовані будь яким зручним способом. Режим елюювання: градієнтний від 5 до 100% рухомої фази В за 30 хв.

Випробовуваний розчин. 1,00 г (точна наважка) препарату поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 90,0 мл метанолу Р та обробляють ультразвуком протягом 10 хв. Після чого розчин охолоджують до кімнатної температури, доводять до позначки тим самим розчинником та перемішують протягом 10 хв.

Розчин порівняння. 70,0 мг (точна наважка) СЗ ресвератролу поміщають в мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 170,0 мл метанолу Р та обробляють ультразвуком до повного розчинення. Після чого розчин охолоджують до кімнатної температури, доводять до позначки тим самим розчинником та

перемішують. 2 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу місткістю 20 мл доводять до позначки метанолом Р та перемішують.

Перед хроматографуванням розчини фільтрують крізь PTFE мембранний фільтр з розміром пор не більше 0,2 мкм.

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі з маспектрометричним детектором за таких умов: колонка InfinityLab Poroshell 120 Bonus-RP, розміром 2.1 x 50 мм та сорбентом з діаметром пор 2.7 мкм, швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв, температура колонки –30 °С, об'єм інжекції – 5 мкл.

Тип іонізації – позитивний, електроспрей (+ESI). Детектування проводили в режимі вимірювання накопичення іонів з масою 229 а.е. Напруга на фрагментаторі складала 50 В, витрата азоту була на рівні 10 мл/хв, температура азоту – 350 °С.

Хроматографічну систему вважали придатною, якщо виконувались наступні вимоги: ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком ресвератролу з хроматограми розчину порівняння має бути не меншою 1000 теоретичний тарілок; коефіцієнт симетрії піка ресвератролу – не більше 2,0; відносне стандартне відхилення розраховане за результатом 5 інжекцій – не більше 1,0%.

1.4 Антимікробна активність [133]

Ресвератрол вивчався щодо здатності інгібувати зростання деяких патогенних мікроорганізмів, таких як грампозитивні та грамнегативні бактерії та грибки. Було показано, що поліфенол ефективно пригнічує зростання *Candida albicans*. Однак механізм, що лежить в основі його антибактеріальної активності, до кінця не зрозумілий, і його передбачувана кандидацидна активність викликає суперечки.

Ресвератрол є потенційно корисним засобом при лікуванні пневмонії, спричиненої *Staphylococcus aureus*, та інфекційних захворювань, спричинених *S. aureus*. Крім того, він може полегшити діарею, спричинену ротавірусною інфекцією.

Антимікробну активність перевіряють шляхом висіву тест кльтур на чашки Петрі, з відповідними поживними середовищами (МПА для бактерій, та СА для грибів та дріжджів), з наступним заміром затримки росту тест-культури.

Цей метод може показати потенційну антимікробну активність ресвератролу та визначити його ефективність проти конкретних мікроорганізмів.

1.5 Перевірка на стерильність

Перевірка на стерильність здійснюється шляхом висіву на агаризоване середовище розчину ресвератролу.

Наважку ресвератроду розчиняють у 10мл стерильної води. Після цього піпеткою відбирають 0,1 мл розчину. В асептичних умовах вносять та розподіляють по поверхні чашки Петрі (стерильним шпателем Дригальського). Після чого чашки інкубують. По завершенню часу інкубації, чашки оглядають. Не маємо спостерігати зони росту сторонньої мікрофлори.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Mahmood T., Shahbaz A., Hussain N., Ali R., Bashir H., Rizwan K. Recent advancements in fusion protein technologies in oncotherapy: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023: 123161. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123161>
2. Banerjee A., Sanyal S., Kulkarni K. K., Jana K., Roy S., Das C., Dasgupta D. Anticancer drug mithramycin interacts with core histones: An additional mode of action of the DNA groove binder. *FEBS Open Bio*. 2014, 4: 987-995. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.10.007>
3. Kormanec J., Novakova R., Csolleiova D., Feckova L., Rezuchova B., Sevcikova B., Homerova D. The antitumor antibiotic mithramycin: new advanced approaches in modification and production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, 104: 7701-7721. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10782-x>
4. Florez A. B., Alvarez S., Zabala D., Brana A. F., Salas J. A., Mendez C. Transcriptional regulation of mithramycin biosynthesis in *Streptomyces argillaceus*: dual role as activator and repressor of the *PadR*-like regulator *MtrY*. *Microbiology*. 2015, 161(2): 272-284. <https://doi.org/10.1099/mic.0.080895-0>
5. Karpiński T. M., Adamczak A. Anticancer activity of bacterial proteins and peptides. *Pharmaceutics*. 2018, 10(2): 54. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020054>
6. Kaur S., Kaur S. Bacteriocins as potential anticancer agents. *Frontiers in pharmacology*. 2015, 6: 272. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272>
7. Saadat Y. R., Khosroushahi A. Y., Gargari B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate polymers*. 2019, 217: 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>
8. Li W., Xia X., Tang W., Ji J., Rui X., Chen X., et al. Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015, 63(13): 3454-3463. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01086>

-
9. Hu X., Li D., Qiao Y., Wang X., Zhang Q., Zhao W., Huang L. Purification, characterization and anticancer activities of exopolysaccharide produced by *Rhodococcus erythropolis* HX-2. *International journal of biological macromolecules*. 2020, 145: 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.228>
 10. Wang L., Wang Y., Li Q., Tian K., Xu L., Liu G., Guo C. Exopolysaccharide, isolated from a novel strain *Bifidobacterium breve* lw01 possess an anticancer effect on head and neck cancer—genetic and biochemical evidences. *Frontiers in microbiology*. 2019, 10: 1044. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01044>
 11. Karadayi Y. I., Aykutoglu G., Arslan N. P., Baltaci M. O., Adiguzel A., Taskin M. Production of water- soluble sulfated exopolysaccharide with anticancer activity from *Anoxybacillus gonensis* YK25. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2021, 96(5): 1258-1266. <https://doi.org/10.1002/jctb.6638>
 12. Vinothkanna A., Sathiyarayanan G., Rai A. K., Mathivanan K., Saravanan K., Sudharsan K., et al. Exopolysaccharide produced by probiotic *Bacillus albus* DM-15 isolated from ayurvedic fermented dasamoolarishta: Characterization, antioxidant, and anticancer activities. *Frontiers in Microbiology*. 2022, 13: 832109. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.832109>
 13. Wang J., Yuan P., Zhang W., Liu C., Chen K., Wang G., Shao T. Separation, Purification, Structural Characterization, and Anticancer Activity of a Novel Exopolysaccharide from *Mucor* sp. *Molecules*. 2022, 27(7): 2071. <https://doi.org/10.3390/molecules27072071>
 14. Kheni K., Vyas T. K. Characterization of exopolysaccharide produced by *Ganoderma* sp TV1 and its potential as antioxidant and anticancer agent. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 2017, 7(2): 72-80. <https://doi.org/10.1080/22311866.2017.1306461>
 15. El Awady M. E., Eldin M. A. N., Ibrahim H. M., Al Bahnasy M. E., Aziz S. H. A. *In vitro* evaluation of antioxidant, anticancer, and antiviral activities of exopolysaccharide from *Streptomyces hirsutus* NRC2018. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2019, 9(11): 010-018. <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2019.91102>

-
16. Shrivastava A., Khan A. A., Khurshid M., Kalam M. A., Jain S. K., Singhal P. K. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016, 100: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.002>
17. Baskar G., Lalitha K., Bikku George G. Synthesis, characterization and anticancer activity of selenium nanobiocomposite of L-asparaginase. *Bulletin of Materials Science*. 2019, 42: 1-7. <https://doi.org/10.1007/s12034-018-1686-z>
18. Baskar G., Lalitha K., Aiswarya R., Naveenkumar R. Synthesis, characterization and synergistic activity of cerium-selenium nanobiocomposite of fungal l-asparaginase against lung cancer. *Materials science and engineering: c*. 2018, 93: 809-815. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.08.051>
19. Baskar G., Sree N. S. Synthesis, characterization and anticancer activity of β -cyclodextrin-Asparaginase nanobiocomposite on prostate and lymphoma cancer cells. *Journal of drug delivery science and technology*. 2020, 55: 101417. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101417>
20. Al-Dulimi A. G., Al-Saffar A. Z., Sulaiman G. M., Khalil K. A., Khashan K. S., Al-Shmgani H. S., Ahmed E. M. Immobilization of l-asparaginase on gold nanoparticles for novel drug delivery approach as anti-cancer agent against human breast carcinoma cells. *Journal of Materials Research and Technology*. 2020, 9(6): 15394-15411. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.10.021>
21. Alrumman S. A., Mostafa Y. S., Al-Izran K. A., Alfaifi M. Y., Taha T. H., Elbehairi S. E. Production and anticancer activity of an L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. *Scientific reports*. 2019, 9(1): 3756. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40512-x>
22. Fatima N., Khan M. M., Khan I. A. L-asparaginase produced from soil isolates of *Pseudomonas aeruginosa* shows potent anti-cancer activity on HeLa cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019, 26(6): 1146-1153. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.001>
23. Othman S. I., Mekawey A. A., ElMetwally M. M., Gabr S. A., Alwaele M. A., Al Fassam H., et al. *Rhizopus oryzae* AM16; a new hyperactive

L-asparaginase producer: Semi solid-state production and anticancer activity of the partially purified protein. *Biomedical Reports*. 2022, 16(3): 1-9. <https://doi.org/10.3892/br.2022.1498>

24. Mostafa Y., Alrumman S., Alamri S., Hashem M., Al-izran K., Alfai M., et al. Enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase by marine *Bacillus velezensis* and cytotoxic activity against breast cancer cell lines. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2019, 42: 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.001>

25. El-Naggar N. E. A., El-Shweihy N. M. Bioprocess development for L-asparaginase production by *Streptomyces rochei*, purification and *in-vitro* efficacy against various human carcinoma cell lines. *Scientific reports*. 2020, 10(1): 7942. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64052-x>

26. Kawatra A., Dhankhar R., Gulati P. Microbial arginine deiminase: A multifaceted green catalyst in biomedical sciences. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, 196: 151-162. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.015>

27. Bala K., Husain I., Sharma A. Arginine deaminase from *Pseudomonas aeruginosa* PS2: purification, biochemical characterization and *in-vitro* evaluation of anticancer activity. *3 Biotech*. 2020, 10: 1-17. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02212-6>

28. Kaur B., Kaur R. Purification of a dimeric arginine deiminase from *Enterococcus faecium* GR7 and study of its anti-cancerous activity. *Protein Expression and Purification*. 2016, 125: 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.011>

29. Gutef E. H. Cytotoxic activity of arginine deiminase purified from *Lactobacillus* sp. *World Journal of Advanced Research and Reviews*. 2022, 16(1): 647-652. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.16.1.1094>

30. Zaki Mahdi N. Investigation of the lethal effect of purified Arginine deiminase purified from *Lactobacillus plantarum* p5 on murine mammary adenocarcinoma and vero cell lines. *Archives of Razi Institute*. 2022, 77(1): 241-247. <https://doi.org/10.22092/2FARI.2021.356587.1873>

-
31. Dhankhar R., Kawatra A., Gupta V., Mohanty A., Gulati P. *In silico* and *in vitro* analysis of arginine deiminase from *Pseudomonas furukawaii* as a potential anticancer enzyme. *3 Biotech.* 2022, 12(9): 220. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1000203/v2>
32. Patil M. D., Shinde K. D., Patel G., Chisti Y., Banerjee U. C. Use of response surface method for maximizing the production of arginine deiminase by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology Reports.* 2016, 10: 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.002>
33. Unissa R., Sudhakar M., Sunil Kumar Reddy A. Condition optimization and production of extracellular l-Arginine deiminase from *Vibrio alginolyticus* 1374. *Current Biotechnology.* 2015, 4(3): 254-260. <http://dx.doi.org/10.2174/2211550104666151028190346>
34. Martynyuk N., Skorohod V. Development of cultivation technology for the *Escherichia coli* recombinant strain producing arginine deiminase of *Mycoplasma hominis*. *Science.* 2014, 10(4): 29-36. <https://doi.org/10.15407/scin10.04.032>
35. Ahn K. Y., Lee B., Han K. Y., Song J. A., Lee D. S., Lee J. Synthesis of *Mycoplasma* arginine deiminase in *E. coli* using stress-responsive proteins. *Enzyme and microbial technology.* 2014, 63: 46-49. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.05.004>
36. Baindara P., Mandal S. M. Bacteria and bacterial anticancer agents as a promising alternative for cancer therapeutics. *Biochimie.* 2020, 177: 164-189. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.020>
37. Michelsen C. F., Jensen H., Venditto V. J., Hennessy R. C., Stougaard P. Bioactivities by a crude extract from the Greenlandic *Pseudomonas* sp. In5 involves the nonribosomal peptides, nunamycin and nunapeptin. *PeerJ.* 2015, 3: e1476. <https://doi.org/10.7717/peerj.1476>
38. Niu X., Thaochan N., Hu Q. Diversity of linear non-ribosomal peptide in biocontrol fungi. *Journal of Fungi.* 2020, 6(2): 61. <https://doi.org/10.3390/jof6020061>

-
39. Jahangeer M., Riasat A., Mahmood Z., Numan M., Munir N., Ashiq M., et al. Secondary Metabolites from *Saccharomyces cerevisiae* Species with Anticancer Potential. In *Saccharomyces*. 2021. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95067>
40. Alsaggaf M. S., Elbaz A. F., El-baday S., Moussa S. H. Anticancer and antibacterial activity of cadmium sulfide nanoparticles by *Aspergillus niger*. *Advances in Polymer Technology*. 2020: 1-13. <https://doi.org/10.1155/2020/4909054>
41. Balraj B., Senthilkumar N., Siva C., Krithikadevi R., Julie A., Potheher I. V., Arulmozhi M. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using marine *Streptomyces* sp. with its investigations on anticancer and antibacterial activity. *Research on Chemical Intermediates*. 2017, 43: 2367-2376. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2766-6>
42. Shunmugam R., Balusamy S. R., Kumar V., Menon S., Lakshmi T., Perumalsamy H. Biosynthesis of gold nanoparticles using marine microbe (*Vibrio alginolyticus*) and its anticancer and antioxidant analysis. *Journal of King Saud University-Science*. 2021, 33(1): 101260. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101260>
43. Srinivasulu C., Ramgopal M., Ramanjaneyulu G., Anuradha C. M., Kumar C. S. Syringic acid (SA)—a review of its occurrence, biosynthesis, pharmacological and industrial importance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018, 108: 547-557. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.069>
44. Numata K., Morisaki K. Screening of marine bacteria to synthesize polyhydroxyalkanoate from lignin: contribution of lignin derivatives to biosynthesis by *Oceanimonas doudoroffii*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2015, 3(4): 569-573. <http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00031>
45. Snoch W., Wnuk D., Witko T., Staroń J., Bojarski A. J., Jarek E., et al. In search of effective anticancer agents—Novel sugar esters based on polyhydroxyalkanoate monomers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(13): 7238. <https://doi.org/10.3390/ijms22137238>
46. Odinet E., Fine F., Sigoillot J. C., Navarro D., Laguna O., Bisotto A., et al. A two-step bioconversion process for canolol production from rapeseed meal combining an *Aspergillus niger* feruloyl esterase and the fungus *Neolentinus*

-
- lepideus*. *Microorganisms*. 2017, 5(4): 67.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms5040067>
47. Zhang J., Li L., Wang X., Wang Z., Zheng C., Zhang H., et al. Inhibitory mechanism against oxidative stress and biological activities of canolol. *Acta Pol. Pharm.-Drug Res*. 2017, 74: 25-29. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29474758/>
48. Kai G., Wu C., Gen L., Zhang L., Cui L., Ni X. Biosynthesis and biotechnological production of anti-cancer drug Camptothecin. *Phytochemistry Reviews*. 2015, 14: 525-539. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9405-5>
49. Mohinudeen I. K., Kanumuri R., Soujanya K. N., Shaanker R. U., Rayala S. K., Srivastava S. Sustainable production of camptothecin from an *Alternaria* sp. isolated from *Nothapodytes nimmoniana*. *Scientific Reports*. 2021, 11(1): 1478. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79239-5>
50. El-Sayed A. S., George N. M., Abou-Elnour A., El-Mekkawy R. M., El-Demerdash M. M. Production and bioprocessing of camptothecin from *Aspergillus terreus*, an endophyte of *Cestrum parqui*, restoring their biosynthetic potency by *Citrus limonum* peel extracts. *Microbial Cell Factories*. 2023, 22(1): 4. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02012-y>
51. Pu X., Chen F., Yang Y., Qu X., Zhang G., Luo Y. Isolation and characterization of *Paenibacillus polymyxa* LY214, a camptothecin-producing endophytic bacterium from *Camptotheca acuminata*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015, 42(8): 1197-1202. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1643-4>
52. Nakashima T., Miyano R., Iwatsuki M., Shirahata T., Kimura T., Asami Y., et al. Iminimycin A, the new iminium metabolite produced by *Streptomyces griseus* OS-3601. *The Journal of Antibiotics*. 2016, 69(8): 611-615. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.142>
53. Barzkar N., Jahromi S. T., Poorsaheli H. B., Vianello F. Metabolites from marine microorganisms, micro, and macroalgae: Immense scope for pharmacology. *Marine drugs*. 2019, 17(8): 464. <https://doi.org/10.3390/md17080464>

-
54. Taechowisan T., Chaisaeng S., Phutdhawong W. S. Antibacterial, antioxidant and anticancer activities of biphenyls from *Streptomyces* sp. BO-07: an endophyte in *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf A. *Food and Agricultural Immunology*. 2017, 28(6): 1330-1346. <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1339669>
55. Ali O. M., Hasanin M. S., Suleiman W. B., Helal E. E. H., Hashem A. H. Green biosynthesis of titanium dioxide quantum dots using watermelon peel waste: Antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02772-y>
56. Wang J., Yang Y., Yan Y. Bioproduction of resveratrol. *Biotechnology of natural products*. 2018: 61-79. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67903-7_3
57. Ashrafizadeh M., Javanmardi S., Moradi-Ozarlou M., Mohammadinejad R., Farkhondeh T., Samarghandian S., Garg M. Natural products and phytochemical nanoformulations targeting mitochondria in oncotherapy: an updated review on resveratrol. *Bioscience Reports*. 2020, 40(4): BSR20200257. <https://doi.org/10.1042/BSR20200257>
58. Zhang M., Gao Q., Liu Y., Fang Z., Gong Z., Zhao Z. K., Yang X. Metabolic engineering of *Rhodotorula toruloides* for resveratrol production. *Microbial Cell Factories*. 2022, 21(1): 270. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-02006-w>
59. Mustafa N. H., Sekar M., Fuloria S., Begum M. Y., Gan S. H., Rani N. N. I. M., et al. Chemistry, biosynthesis and pharmacology of sarsasapogenin: a potential natural steroid molecule for new drug design, development and therapy. *Molecules*. 2022, 27(6): 2032. <https://doi.org/10.3390/molecules27062032>
60. Halder S., Mohapatra S., Singh R., Katiyar C. K. Quantitative evaluation of shatavarin IV by high-performance thin-layer chromatography and its isolation from *Asparagus racemosus* Willd. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*. 2018, 31(3): 197-201. <https://doi.org/10.1556/1006.2018.31.3.3>
61. Watroly M. N., Sekar M., Fuloria S., Gan S. H., Jeyabalan S., Wu Y. S., et al. Chemistry, biosynthesis, physicochemical and biological properties of rubiadin:

A promising natural anthraquinone for new drug discovery and development. *Drug design, development and therapy*. 2021: 4527-4549. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S338548>

62. Zhong R., Farag M. A., Chen M., He C., Xiao J. Recent advances in the biosynthesis, structure–activity relationships, formulations, pharmacology, and clinical trials of fisetin. *EFood*. 2022, 3(1-2): e3. <https://doi.org/10.1002/efd2.3>

63. Kim G. H., Kan S. Y., Kang H., Lee S., Ko H. M., Kim J. H., Lim J. H. Ursolic acid suppresses cholesterol biosynthesis and exerts anti-cancer effects in hepatocellular carcinoma cells. *International journal of molecular sciences*. 2019, 20(19): 4767. <https://doi.org/10.3390/ijms20194767>

64. Lu C., Zhang C., Zhao F., Li D., Lu W. Biosynthesis of ursolic acid and oleanolic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *AIChE Journal*. 2018, 64(11): 3794-3802. <https://doi.org/10.1002/aic.16370>

65. Duru K. C., Kovaleva E. G., Danilova I. G., van der Bijl P. The pharmacological potential and possible molecular mechanisms of action of *Inonotus obliquus* from preclinical studies. *Phytotherapy Research*. 2019, 33(8): 1966-1980. <https://doi.org/10.1002/ptr.6384>

66. Tayier B., Deng Z., Wang Y., Wang W., Mu Y., Yan F. Biosynthetic nanobubbles for targeted gene delivery by focused ultrasound. *Nanoscale*. 2019, 11(31): 14757-14768. <https://doi.org/10.1039/C9NR03402A>

67. Nahar L., Al-Majmaie S., Al-Groshi A., Rasul A., Sarker S. D. Chalepin and chalepinsin: Occurrence, biosynthesis and therapeutic potential. *Molecules*. 2021, 26(6): 1609. <https://doi.org/10.3390/molecules26061609>

68. Zhu X. D., Sun H. C. Emerging agents and regimens for hepatocellular carcinoma. *Journal of hematology & oncology*. 2019, 12(1): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0794-6>

69. D'Aguanno S., Del Bufalo D. Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 proteins in preclinical and clinical studies: Current overview in cancer. *Cells*. 2020, 9(5): 1287. <https://doi.org/10.3390/cells9051287>

-
70. Hulst M. B., Grocholski T., Neefjes J. J., van Wezel G. P., Metsä-Ketelä M. Anthracyclines: Biosynthesis, engineering and clinical applications. *Natural Product Reports*. 2022, 39(4): 814-841. <https://doi.org/10.1039/d1np00059d>
71. Lieu E. L., Nguyen T., Rhyne S., Kim J. Amino acids in cancer. *Experimental & molecular medicine*. 2020, 52(1): 15-30. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0375-3>
72. Gozari M., Alborz M., El-Seedi H. R., Jassbi A. R. Chemistry, biosynthesis and biological activity of terpenoids and meroterpenoids in bacteria and fungi isolated from different marine habitats. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021, 210: 112957. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112957>
73. Agrawal S., Acharya D., Adholeya A., Barrow C. J., Deshmukh S. K. Nonribosomal peptides from marine microbes and their antimicrobial and anticancer potential. *Frontiers in Pharmacology*. 2017, 8: 828. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00828>
74. Ahmadi M., Amiri S., Pecic S., Machaj F., Rosik J., Łos M. J., et al. Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2020, 1866(12): 165968. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165968>
75. Vajdič T., Ošljaj M., Kopitar G., Mrak P. Engineered, highly productive biosynthesis of artificial, lactonized statin side-chain building blocks: The hidden potential of *Escherichia coli* unleashed. *Metabolic Engineering*. 2014, 24: 160-172. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.05.012>
76. Ren B., Kwah M. X. Y., Liu C., Ma Z., Shanmugam M. K., Ding L., et al. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer letters*. 2021, 515: 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.001>
- ⁷⁷7. Mahmood T., Shahbaz A., Hussain N., Ali R., Bashir H., Rizwan K. Recent advancements in fusion protein technologies in oncotherapy: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023: 123161. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123161>

-
77. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7–30. doi:10.3322/caac.21387
78. Okimoto, R. A., & Bivona, T. G. (2014). *Recent advances in personalized lung cancer medicine. Personalized Medicine*, 11(3), 309–321. doi:10.2217/pme.14.19
79. Krepler, C., Xiao, M., Sproesser, K., Brafford, P. A., Shannan, B., Beqiri, M., ... Herlyn, M. (2015). *Personalized Preclinical Trials in BRAF Inhibitor-Resistant Patient-Derived Xenograft Models Identify Second-Line Combination Therapies. Clinical Cancer Research*, 22(7), 1592–1602. doi:10.1158/1078-0432.ccr-15-1762
- ¹. Jiang, Z., Chen, K., Cheng, L., Yan, B., Qian, W., Cao, J., ... Yang, W. (2017). *Resveratrol and cancer treatment: updates. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1403(1), 59–69. doi:10.1111/nyas.13466
80. Shanmugam, M. K., Nguyen, A. H., Kumar, A. P., Tan, B. K. H., & Sethi, G. (2012). *Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. Cancer Letters*, 320(2), 158–170. doi:10.1016/j.canlet.2012.02.03
81. Shanmugam, M. K., Lee, J. H., Chai, E. Z. P., Kanchi, M. M., Kar, S., Arfuso, F., ... Sethi, G. (2016). *Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. Seminars in Cancer Biology*, 40-41, 35–47. doi:10.1016/j.semcancer.2016.03.005.
82. Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., Wang, L., Goh, B. C., Ahn, K. S., ... Sethi, G. (2018). *Modulation of diverse oncogenic transcription factors by thymoquinone, an essential oil compound isolated from the seeds of Nigella sativa Linn. Pharmacological Research*, 129, 357–364. doi:10.1016/j.phrs.2017.11.023
83. Prasannan, R., Kalesh, K. A., Shanmugam, M. K., Nachiyappan, A., Ramachandran, L., Nguyen, A. H., ... Sethi, G. (2012). *Key cell signaling pathways modulated by zerumbone: Role in the prevention and treatment of cancer. Biochemical Pharmacology*, 84(10), 1268–1276. doi:10.1016/j.bcp.2012.07.015

-
84. Sinha, D., Sarkar, N., Biswas, J., & Bishayee, A. (2016). Resveratrol for breast cancer prevention and therapy: Preclinical evidence and molecular mechanisms. *Seminars in Cancer Biology*, 40-41, 209–232. doi:10.1016/j.semcancer.2015.11.001.
85. Cucciolla, V., Borriello, A., Oliva, A., Galletti, P., Zappia, V., & Ragione, F. D. (2007). *Resveratrol: From Basic Science to the Clinic*. *Cell Cycle*, 6(20), 2495–2510. doi:10.4161/cc.6.20.4815
86. Бондар, Г. В., Думанський, Ю. В., Сєдаков, І. Є., Попович, О. Ю., & Русин, А. В. (2013). Практичні питання викладання онкології в умовах України.
87. Ivankova, V. S. (2018). Актуальні питання радіаційної онкології в Україні. *Practical oncology*, 1(1), 45-47.
88. Кухарь, Ірина Олександрівна, Ольга Сергіївна Монакова, and Ольга Сергеевна Монакова. *Аналіз динаміки захворюваності на рак грудної залози серед жіночого населення України за 2014-2019 роки*. Diss. 2022. [Електронний ресурс]// Режим доступу: https://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/30612/1/%D0%9A%D1%83%D1%85%D0%B0%D1%80%D1%8C_%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%BA%D0%BE%D0%B2%D0%B0.pdf
89. Жінок в Україні на 2,7 млн більше, ніж чоловіків — результати електронного перепису [Електронний ресурс]// Режим доступу: <https://hromadske.ua/posts/zhinok-v-ukrayini-na-27-mln-bilshe-nizh-cholovikiv-rezultati-elektronnogo-perepisu>
90. Patel, K. R., Scott, E., Brown, V. A., Gescher, A. J., Steward, W. P., & Brown, K. (2011). *Clinical trials of resveratrol*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 161–169. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05853.x
91. Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarriás, A., Tomás-Barberán, F., García-Conesa, M., & Espín, J. Resveratrol and Clinical Trials: The Crossroad from In Vitro Studies to Human Evidence. *Current Pharmaceutical Design*, 19(34), 6064–6093.2013. doi: 10.2174/13816128113199990407.

-
92. NOW Foods, натуральний ресвератрол, 200 мг, 120 вегетаріанських капсул [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://ua.iherb.com/pr/now-foods-resveratrol-200-mg-120-veg-capsules/16093?gclid=Cj0KCQjwla-hBhD7ARIsAM9tQKsu0Vjzm6VKZCmeUjzf4syoa6OrxwxDaDXff81LyKTzCZ4XO77MQHkaAg1VEALw_wcB&gclsrc=aw.ds
93. Концентрування та висушування біопрепаратів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <http://moyaosvita.com.ua/biologija/koncentruvannya-ta-visushuvannya-biopreparativ/>
94. Cichewicz, R. H., & Kouzi, S. A. (2002). Resveratrol oligomers: Structure, chemistry, and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 507–579. doi:10.1016/s1572-5995(02)80014-x
95. Suwal, S., & Marciniak, A. (2019). *Technologies for the Extraction, Separation and Purification of polyphenols – A Review. Nepal Journal of Biotechnology*, 6(1), 74–91. doi:10.3126/njb.v6i1.22341
96. Що таке центрифугування? [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://yrok.pp.ua/serednya-osvta/5337-scho-take-centrifuguvannya-viznachennya-ta-princip-metodu.html>
97. Одержання продуктів біотехнології [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.slideshare.net/YuriPenchuk/7-75376046>
98. Розділення неоднорідних систем. Відстоювання. Фільтрування. Центрифугування. Відстійники. Будова, порівняння і вибір фільтрів і центрифуг. Перемішування в рідких середовищах. [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/Processes-and-apparatus-of-chemical-productionLecture6.pdf>
99. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. - К.: НУХТ, 2009. - 336 с.
100. Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудованиемикробиологических производств: Агропромиздат. – М., 1987. – 398 с.

-
101. ВАКУУМ-ВИПАРНИЙ АПАРАТ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1656/vakuum-viparnij-aparat>
102. Малежик І.Ф., Процеси і апарати харчових виробництв: підручник. – К.: НУХТ, 2003. – 400 с.
103. Реактор – змішувач РС 100 [Електронний ресурс] //Режим доступу: <http://www.kft2.com.ua/real100.html>
104. Сепаратор-бактофуга Турція [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://flagma.ua/uk/separator-baktofuga-turciya-o10587106.html>
105. Відцентровий насос Pedrollo F 50 / 160С (380V) [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://pedrollo.org.ua/ua/centrobezhnyi-nasos-pedrollo-f-50-160c-380v>
106. Автоматичний відцентровий екстрактор [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1452655772-avtomaticheskij-tsentrobezhnij-ekstraktor.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAsIGrBhAAEiwAEzMlC7kDJALCIXFwcGgCRur098Nhb6UDc-DagrCYKOmiKOaj2nlLTEEBBRoCvxkQAvD_BwE
107. Сублімаційна ліофільна сушарка [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://flagma.ua/uk/sublimacionnaya-liofilnaya-sushilka-o11331998.html>
108. Подрібнювач YF8-1 Млин Молоткова Дробарка [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://chumaki.in.ua/ua/p606012619-podribnyuvach-yf8-mlin.html>
109. Дозатор ваговий FOYER FZ-5000-II вібрототковий прямої дії [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://kozakplus.ua/products/granule-packaging-machines/fz-5000-2?pk_campaign=GoogleMerchant&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAsIGrBhAAEiwAEzMlCyJHnjypzIIPe7GVqphtOCG1Jj7SDwUKqqeYNnT4L466DBBpUCCxRoC1jUQAvD_BwE

-
110. Вібросита [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://budmash.ua/vibrosita>
111. Ємність з нержавіючої сталі [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://wise-master.com.ua/ua/p730905377-emkost-emkosti-emkost.html>
112. Фармацевтичний гранулятор Apex Multiplex модель DUA-12 [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1417310356-farmatsevticheskij-granulyator-apex.html?&primelead=MS4wNjI1>
113. Автоматичний капсулятор моделі NJP (наповнення пустих твердих желатинових капсул) [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://prom.ua/ua/p1684787130-avtomaticheskij-kapsulyator-modeli.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_1&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAsIGrBhAAEiwAEzMlC7YZNcbe01ZJI2LeRC8fkJ1_XBaOS9pc_WF5E7QsqEqVrLVCe5hihoCgiMQAvD_BwE
114. Лабораторний аналізатор вологості METRINCO M105MA [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://simvolt.ua/laboratorniy-analzator-vologost-metrinco-m105ma.html/>
115. Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEГ, 2001. — 556 с. ISBN 966-95824-3-1
116. Zhang M., Gao Q., Liu Y., Fang Z., Gong Z., Zhao Z. K., & Yang X. Metabolic engineering of *Rhodotorula toruloides* for resveratrol production. *Microbial Cell Factories*, 21(1), 1-9. 2022. doi.org/10.1186/s12934-022-02006-w
117. КЛАСИФІКАЦІЯ ВИРОБНИЧИХ ПРИМІЩЕНЬ [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>
118. Класифікація чистих приміщень [Електронний ресурс] //Режим доступу: <https://studfile.net/preview/7443252/page:35/>

-
119. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. - К.: НУХТ, 2009. - 336 с.
119. Модульний картриджний фільтр *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: <http://www.trion.in.ua/fm.html>
120. Лебединець, В. О. "Підготовка персоналу підприємства з виробництва лікарських засобів при впровадженні та в умовах функціонування системи управління якістю." Управління, економіка та забезпечення якості в фармації 1 (2014): 28-35. *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/5279/1/%D0%A1%D1%82%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%86%D1%8B%20%D0%B8%D0%B7%20UEC_1_2014-5.pdf
121. Очищення і дезінфекція в харчовій промисловості *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: <https://www.bettaservice.com.ua/novyny-kompanii/item/1172-ochistki-i-dezinfektsiya-v-pishchevoy-promyshlennosti.html>.
122. Методичні настанови з дотримання вимог законодавства України щодо безпечності харчових продуктів у закладах ресторанного господарства *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: <http://www.vosst.vn.ua/19-normatyvni-akty/182-metodychni-nastanovy-z-dotrymannia-vymoh-zakonodavstva-ukrainy-shchodo-bezpechnosti-kharchovykh-produktiv-u-zakladakh-restorannoho-hospodarstva-ukrkoopspilka>.
123. Дезінфекція. Методичні вказівки для самостійної роботи студентів 5-го курсу медичного факультету з дисципліни «Епідеміологія». *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: <http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/28042/1/%D0%A7%D1%83%D0%BC%D0%B0%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%BA%D0%BE%20%D0%94%D0%B5%D0%B7%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%20%E2%84%9620-347073.pdf>
124. Гігієнічні вимоги до мийних засобів *[Електронний ресурс]* // Режим доступу: <http://medbib.in.ua/gigienicheskie-trebovaniya-moyuschim.html>

-
125. Принципи класифікації лікарських форм [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://studfile.net/preview/9761653/>
126. Що краще: капсули чи таблетки? [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://3i.ua/scho-krasche-kapsuli-chi-tabletki>
127. Інформація щодо маркування, що наноситься на етикетку, зовнішню та внутрішню упаковку лікарського засобу [Електронний ресурс] // Режим доступу: https://www.dls.gov.ua/for_subjec
128. Мобільний лабораторний змішувач сипучих [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.agierre.eu/public/index.php?node=43&subpg=catalogo-prodotti-view&idntree=23&idprod=31&idlang=uk>
129. Гранулятор [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1443735306-granulyator.html?&primelead=MC40MjU>
130. Автоматичне фармацевтичне наповнювальне обладнання для капсул напівавтоматичне обладнання для наповнення капсул для виготовлення лікарських засобів [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://uk.nicefiller.com/automatic-pharmaceutical-capsule-filling-machine-semi-automated-capsule-filler-equipment-medicines-making.html>
131. Автоматичний Лічильник Капсул і таблеток "S-1700" [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://chumaki.in.ua/ua/p1067118980-avtomaticheskij-schetchik-kapsul.html>
132. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ РЕСВЕРАТРОЛУ [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/22502/1/ATL-20-03-20-Book-1%281%29.pdf>
133. Ресвератрол – де міститься та яка користь для здоров'я? Детальніше: <https://fitomarket.com.ua/ua/fitoblog/resveratrol-gde-soderzhitsja-i-kakaja-polza-dlja-zdorovja> [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://fitomarket.com.ua/ua/fitoblog/resveratrol-gde-soderzhitsja-i-kakaja-polza-dlja-zdorovja>