МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет)__Біотехнології та екологічного контролю__
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____

«До захисту в ЕК»	**«До захисту допущено»**
Директор інституту(декан факультету)	Завідувач кафедри
_____ Наталія ГРЕГІРЧАК	_____ Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)	(підпис) (прізвище та ініціали)
«___» __січень___ 2022 р.	«___» ____січень___ 2022 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності_____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____ _
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнологія»_____

на тему: **Особливості одержання ферментів з протизапальними та антивірусними властивостями**

Виконав: здобувач__2_ курсу, групи__2___

ПОДОЛЯНЧУК Валентин Леонідович

(прізвище, ім'я, по батькові повністю) _____ (підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна (прізвище , ім'я та по батькові повністю) _____ (підпис)

Консультанти_____ . (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

Рецензент Володимир ЗАВ'ЯЛОВ (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

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

Здобувач_____
(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) __Біотехнології та екологічного контролю_____
Кафедра _____біотехнології і мікробіології_____
Освітній ступінь____магістр_____
Спеціальність____162 «Біотехнології та біоінженерія»_____
(код і назва)
Освітньо-професійна програма _____«Фармацевтична біотехнологія»___
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри _біотехнології і_____
_____мікробіології_____

_____Віктор СТАБНІКОВ_
“_01_” ___листопада___2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Подолянчук Валентина Леонідовича
(прізвище, ім’я, по батькові)

Тема роботи *«Особливості одержання ферментів з протизапальними та антивірусними властивостями»*
керівник роботи **Красінько Вікторія Олегівна**,
(прізвище, ім’я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 780-кс
2. Строк подання здобувачем роботи___07.02.2023_____
3. Вихідні дані до роботи біологічний агент – *Serratia marcescens,* цільовий продукт – серратіопептидаза .
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
РОЗДІЛ 1. Сучасний стан та перспективи одержання ферментів спрямованого терапевтичного призначення РОЗДІЛ 2. Технологічні особливості одержання ферментного препарату комбінованої терапевтичної дії серратіопептидази. РОЗДІЛ 3. Технологічні особливості одержання субстанції серратіопептидази. РОЗДІЛ 4. Технологічні особливості одержання таблетованої форми серратіопептидази. РОЗДІЛ 5. Опис технологічної схеми отримання таблетованої форми серратіопептидази . РОЗДІЛ 6. Проект анд на випуск серратіопептидази у формі таблеток
5. Перелік графічного матеріалу *Технологічна схема виробництва субстанції – 1 аркуш формату А1. Технологічна схема отримання води очищеної та підготовки вентиляційного повітря – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва готового продукту – 1 аркуш формату А1.*

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання____01 листопада 2022 року_____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	*Огляд літератури*	*01.11.22-05.11.22*	
2	*Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу Серратіопептидаза*	*06.11.22-11.11.22*	
3	*Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях*	*12.11.21-20.11.22*	
4	*Специфікація обладнання*	*21.11.22-25.11.22*	
5	*Опис технологічної схеми післяферментаційних етапів отримання Серратіопептидази*	*26.11.22-30.11.22*	
6	*Контроль виробництва субстанції для ЛЗ*	*01.12.22-04.12.22*	
7	*Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ*	*05.12.22-10.12.22*	
8	*Матбаланс на серію ЛЗ*	*11.12.22-15.12.22*	
9	*Опис лікарського засобу згідно АНД (Проект АНД)*	*16.12.22-19.12.22*	

Здобувач _____ Валентин ПОДОЛЯНЧУК
(підпис) (ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____ Вікторія КРАСІНЬКО
(підпис) (ім'я та прізвище)

Реферат

Представлено кваліфікаційну роботу, присвячену отриманню ферментів з протизапальними та антивірусними властивостями.

Ферменти відіграють невід'ємно важливу роль у нашому світі, вони актуальні як біокаталізатори. Завдяки своїй широкій спорідненості до різних субстратів ферментативна активність використовується у багатьох областях, включаючи промисловість, сільське господарство, наукові дослідження треба зазначити, що ферменти мають великі перспективи в медицині.

Серратіопептидазу отримують культивуванням бактерій *Serratia marcescens* AD-W2 на середовищі складу, (г/л): глюкоза – 20; соєвий шрот – 20; казеїн – 15; $NH_4H_2PO_4$ – 7,5; соєва олія – 5; NaCl – 0,5; KCl – 0,1; $MgSO_4$ - 0,1; $ZnSO_4$ – 0,1;

Обґрунтувано вибір технологічної схеми отримання серратіопептидази: основні етапи отримання субстанції та готового кінцевого продукту у вигляді твердої лікарської форми (ТЛФ) – таблеток із захисною оболонкою.

Також проведений розрахунок втрат по технологічному процес, враховуючи отримані дані було обрано відповідні об'єми та продуктивність обладнання. Наведені методики контролю післяферментаційних процесів.

Новизною даної роботи є отримання вітчизняного лікарського засобу з протизапальними та антивірусними властивостями у вигляді таблеток покритих подвійною оболонкою.

Кваліфікаційна робота складається з 6 розділів , 107 джерел використаної літератури та графічної частини, що включає два креслення формату А1. На кресленнях зображені апаратурна та технологічна схеми післяферментаційних процесів виробництва Серратіопептидази (СП). Загальний обсяг роботи без літературних джерел – 94 сторінок.

Ключові слова: Серратіопептидаза, COVID-19, Серцево-судинні захворювання, виділення цільового продукту, рецептура таблеток.

ЗМІСТ

Реферат **4**

ВСТУП **7**

РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТІВ СПРЯМОВАНОГО ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ **9**

1.1 Перспектива використання ферментних препаратів мікробного походження 9

1.2 Ферменти з фібринолітичними властивостями 12

1.3 Ферменти з протипухлинними властивостями 14

1.4 Ферменти з противірусними властивостями 16

1.5 Ферменти з протизапальними властивостями 17

1.6 Ферменти з комбінованими властивостями 18

РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ КОМБІНОВАНОЇ ТЕРАПЕВТИЧНОЇ ДІЇ СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ **25**

2.1. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу **25**

2.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу, галузей використання, потреби у даному лікарському засобі 27

2.1.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу 29

2.2. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції для інженерної частини роботи 38

РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ **45**

3.1.Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях отримання субстанції **45**

3.2. Специфікація обладнання 50

3.3. Опис технологічного процесу отримання субстанції серратіопептидази 52

3.4. Контроль виробництва субстанції серратіопептидази **54**

3.4.1. Ідентифікація очищеної серраціопептидази методом гель-електрофарез 54

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ ТАБЛЕТОВАНОЇ ФОРМИ СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ **59**

4.1. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу **59**

4.1.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу та кількості серій на рік. 59

4.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря). 60

4.3. Підготовка персоналу 61

4.4. Підготовка дезінфікуючих засобів 62

7.5. Підготовка вентиляційного повітря 64

4.6. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки. 66
4.7. Вибір технологічних стадії отримання води очищеної 68
4.8. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання 68
4.9. Матбаланс на серію лікарського засобу **73**
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ТАБЛЕТОВАНОЇ ФОРМИ СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ **77**
РОЗДІЛ 6. ПРОЕКТ АНД НА ВИПУСК СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ У ФОРМІ ТАБЛЕТОК **88**
Список використаних джерел **100**

ВСТУП

Серцево-судинні захворювання разом з COVID-19 займають ведуче місце в рейтингу захворюваності людей у всьому світі, що обумовлено їх широким розповсюдженням, поліорганністю уражень, ускладненнями, несприятливими наслідками. Протягом останніх декількох років дані захворювання були і залишаються найбільш небезпечними для людського організму через їх здатність залучати в епідемічний процес велику кількість здорових людей за короткий період.

Необхідність отримання препарату природного походження з м'якою терапевтичною дією та низькою токсичністю, що дозволить використання протягом тривалого часу.

Метою даної роботи є розроблення науково обґрунтованих підходів до моделювання ділянки виробництва субстанції серратіопептидази (СП) й оцінка можливості реалізації сучасної технології отримання таблетованої форми з покриттям на технологічній дільниці 5 цеху фармацевтичної компанії «ФарКос».

Актуальність: Отримання ТЛФ з діючою речовиною, що проявляє протизапальні та антивірусні властивості. Методика відтворення технологічних параметрів таблетування з підбором обладнання та подальшим розрахунком від залежності отримання діючої речовини.

Новизна: Новизною кваліфікаційної роботи є застосування штаму бактерій *Serratia marcescens* AD-W2 з метою надсинтезу СП на відносно дешевому ростовому субстраті. Перевагою даного генно-інженерного штаму є можливість отримання напряму СП, минаючи етапи хімічного отримання, що в свою чергу дозволить застосовувати протягом тривалого часу.

Особливістю даної роботи, це опис технологічної стадії отримання готового продукту (ГП) на існуючих обладнаннях підприємства ФК ”ФарКос” з подальшою візуалізацією обладнання.

Для оптимізації технологічних стадій отримання субстанції й ГП запропоновано використання технології отримання ТЛЗ з попередньою компоновкою рецептури під необхідність виробництва та параметри таблетування.

РОЗДІЛ 1. СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТІВ СПРЯМОВАНОГО ТЕРАПЕВТИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1 Перспектива використання ферментних препаратів мікробного походження

Станом на сьогодні в Україні, як і у всьому світі спостерігається великий попит на лікарські засоби на основі ферментних препаратів. Ферментні препарати - це група фармакологічних засобів, що сприяють поліпшенню фізіологічних процесів в організмі людини. На даний момент є перспективним впровадження у виробництво ферментних препаратів мікробного походження, які за фармакологічною активністю будуть тотожні відомим препаратам тваринного походження [1].

В даний момент в Україні існує декілька найбільших осередків, а саме Харків, Одеса, Львів та Київ, де ведуться дослідження особливостей мікробного синтезу ферментів та проводяться клінічні випробування ферментних препаратів з протизапальними, противірусними і фібринолітичними властивостями. Це пов’язано з тим, що саме в цих містах розташована велика кількість дослідницьких центрів.

В Україні діє низка підприємств, а саме: ПАТ “Вітаміни” (Черкаська обл., м. Умань); ЗАТ “Технолог” (Черкаська обл., м. Умань); ПрАТ “Біофарма” (м. Київ); ВАТ “Дніпрофарм” (м. Дніпропетровськ). Дані підприємства виробляють біофармацевтичну продукцію, зокрема медичні ферментні препарати.

Особливу увагу у науковій розробці у сфері створення ферментних препаратів займають: Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (м. Київ); Інститут біології клітини НАН України (м. Львів); Технопарк "Хемо-Поль" (Одеська обл., м. Теплодар); [2].

До окремої групи необхідно віднести дослідження і публікації стосовно ферментативної активності вищих базидіальних грибів, оскільки вищі базидіальні лігнотрофні гриби є відомими продуцентами сполук лікувально-профілактичного та промислового значення.

Слід звернути увагу, що дослідах Бухало, Дуган, Максимюк, Ліновецька з інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, розглянута ферментна активність вищого базидіального гриба *Schizophyllum commune.*

Із літературних джерел відомо про наявність у *S. commune* ферментів гідролітичного та окислювального комплексів:

- протеаз ;
- ендоглюконази;
- β-глюкозидази;
- екзоглюконази;
- ксиланази;

Для виявлення та оцінювання спектра і активності гідролітичних ферментів у вищого базидіоміцету *S. commune* вчені відібрали штами за спектром наявних ферментів та проводили їх культивування глибинним способом на комплексних середовищах різного складу. Дослідження ферментативної активності проводили в умовах глибинного культивування в колбах Ерленмеєра при постійному перемішуванні [3].

Для різних варіантів досліджень вносили різні ростові фактори та додаткові джерела азоту та вуглецю (пептон, дріжджовий екстракт, меляса тощо). Вчені встановили, що сприятлива для росту міцелію температура +28 °С, так само як і +37 °С, призводила до прискорення ферментативних реакцій.

Таким чином, дослідження ферментів різних класів є актуальним для вивчення фізіологічних та біохімічних особливостей цього гриба та можливості їх практичного застосування [3].

Також, в окрему групу слід віднести проект з виробництва офтальмологічних плівок на основі ферментних препаратів для лікування опіків та інших пошкоджень органів зору (розробка співробітників Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України під керівництвом академії НАН України С.А. Андронаті), а саме:

— лікувальні очні полімерні плівки (вставки) з іммобілізованим ферментом (папаїном) та карбамідом;

— покриття "Еластотераза іммобілізована" (марлеві серветки або нетканий бинт). Продуцентом ферменту, нанесеного на покриття, є культура *Bacillus mesentericus* 316 М. Засіб можна використовувати для прискореного загоєння ран при опіках II—IV ступенів, трофічних виразках, пролежнях і гнійних ранах [4].

Ферменти відіграють невід'ємно важливу роль у нашому світі, вони актуальні як біокаталізатори. Завдяки своїй широкій спорідненості до різних субстратів ферментативна активність використовується у багатьох областях, включаючи промисловість, сільське господарство, наукові дослідження [15]; треба зазначити, що ферменти мають великі перспективи в медицині.

В останні кілька десятиліть ферменти різної спрямованості дії почали активно використовувати у терапевтичних цілях: лікуванні онкологічних захворювань, патологій серцево-судинної системи, для подолання дефіциту ферментів в організмі та як альтернативні протизапальні препарати [16, 17].

Терапевтичні ферменти можна класифікувати на ферменти з регуляторною активністю та ферменти зі спеціальною цільовою діяльністю [18].

До 2015 року американська асоціація FDA (Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів) схвалила понад 200 білкових і пептидних препаратів для лікування генетичних захворювань (наприклад, хвороба Фабрі, хвороба Гоше, хвороба накопичення глікогену) та

негенетичні захворювання людства (наприклад: рак, хронічні серцево-судинні захворювання) [19, 20, 21].

Ферменти відіграють значну та життєво важливу роль так як вони широко використовуються як терапевтичні препарати при проблемах із здоров'ям [8].

Застосування ферментів у медицині є досить широким, в даний час найбільше відомим застосуванням мікробних ферментів у медицині є видалення омертвілої шкіри при лікуванні опіків, а також при розщепленні згустків фібринолітичними ферментами [22].

1.2 Ферменти з фібринолітичними властивостями

Осередки основних досліджень, пов'язаних із захворюваннями серцево -судинної системи, зосередженні у Львові та Києві.

Науковець Абрагамович отримував стрептокіназу (СК) (КФ 3.4.99.22, яка складається з 414 амінокислот, молекулярна маса 47 000 Да) з *B. subtilis* IFO3335 з активністю ферменту 2000 од\мл. Для дослідження ефективності отриманої СК, вчений додавав її до базового курсу лікування для хворих на гострий інфаркт міокарда. До дослідження було залучено 80 чоловік із гострими серцевими розладами (середній вік людей 53 роки). Результатами досліджень виявлено виражену дію СК на організм [5].

Дослідженнями в біотехнологічному напрямку займалися Вовк, Кравченко, Остапченко з Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Вчені займалися підтвердженням ефективності СК котру отримували із такого самого продуцента який був наведений в попередньому дослідженні (*B. subtilis* IFO3335) на багатому білковому середовищі. Для прояву активності отриманого ферменту, вченими було використано кров хворих людей. Результатом показали пришвидшення згортання крові та активацію плазмогенезу, за рахунок того, що активний цент СК утворює так званий комплекс стрептокіназа-плазміноген [6].

Було розглянуті мета-аналізи, які досліджували та пояснювати різницю в результатах незалежних досліджень однієї і тієї самої проблеми. Бактеріальна стрептокіназа здатна активувати цілий ряд процесів в організмі,

а саме чинити опосередкований вплив на серцево-судинну систему, особливо на клітини ендотелію.

Певним протизапальним ефектом володіють фібриолітичні ферменти. Перші фібринолітичні ферменти були отримані з різних мікроорганізмів, які зустрічаються в ферментованих продуктах. Натто – це популярна харчова добавка в Японії, яку з 1987 року виготовляють шляхом ферментації соєвих бобів. Користь від вживання натто пов'язана з таким ферментом як наттокіназа.

Цей фермент не містить дисульфідних зв'язків і тому проявляє сильну фібринолітичну дію, це було відмічено в роботі Сутіма в 1992 році [23].

Дослідження ферменту проводила Naomi Tepper зі своїми колегам з Японії. Нанокіназа (Наттокінази, скорочено - НТ) у клінічних дослідженнях виявляла фібринолітичну дію, тобто в незначній концентрації близько 0,005 г\кг з активністю 600 од\г при введені до організму допомагав зменшити тромбоутворення та артеріальний тиск у 17 з 20 пацієнтів віком від 55-85 років [24].

Вчені О'Brien та Wong, дослідах виділили фермент з *Bacillus subtilis var natto,* що мешкав у кишечному тракті вільно живучої нематоди *Caenorhabditis elegans.* Для культивування продуцента використовували середовище, яке складалося з триптон-соєвого бульйону і триптон-соєвого агару у відсотковому співвідношенні 75:25.

Досить цікавим є дослідження *in vitro* , вченим Hitosugi з колегами. Для дослідів в яких визначали ступінь агрегації еритроцитів і в'язкість крові, був використаний фермент, отриманий з продуцента *Bacillus subtilis var natto* (з середньою активністю ферменту 600 од\мл). Результати показали зниження досліджуваних показників а саме, зниження агрегації еритроцитів, а також покращення самопочуття пацієнтів.

Через рік праці з ферментом вчені запропонували використання НТ (з активністю ферменту 2000 од/мл) як дієтичну добавку (по 100 мг на добу) до продуктів харчування, так як вона проявляє фібринолітичну дію, а також є антикоагулятивним засобом, який знижує ризик тромбоутворення [25].

Слід також відмітити вченого із Туреччини Satoh з колегами, який у своїх дослідах *in vivo* досліджував властивості фібринолітичного ферменту стрептокінази (СК), синтезованої *B. subtilis* CIR110 на поживному середовищі з великим вмістом білкових компонентів з додаванням 2 % сахарози [26]. Для дослідів фермент було іммобілізовано шляхом його нанесення на водорозчинну полісахаридну матрицю. Вченими було виявлено активацію тромбоцитів при внесенні стрептокінази до позбавленої плазміногену плазми крові кроля з високим титром антитіл до стрептокінази. Отримані дані досліджень *in vivo* показали вплив стрептокінази (0,4 мл з активністю 200 од\мл) на антитіла та тромбоцити кроля у плазмі крові за відсутності в ній плазміногену. Цим дослідженням показано, що СК активує імунний комплекс, впливаючи на тромбоцити, в той момент як інші досліджувані імунні комплекси не зумовлюють активації клітин. При цьому в жодному експерименті не спостерігали агрегації тромбоцитів [27].

Для дослідження активність стрептокінази були відібрані схожі штами продуцентів СК: *B. subtilis* CIR 110 та *B. subtilis* CIR 120 (з середньою активністю ферменту 200 од/мл). Для покращення дослідних даних було відібрано також два типових штами продуцентів СК *B. subtilis* IFO 3936 та IFO3335 (з середньою активністю ферменту 200 од/мл). Усі штами демонстрували майже однакові моделі росту клітин на L-середовищі [28]. Варто зазначити, що у порівнянні з іншими один з досліджених штамів – *B. subtilis* CIR 110 продукував СК з низькою казеїнолітичною та найвищою фібринолітичною активністю, а також був здатний продукувати високо фібринолітичну протеазу без соєвого молока. Ця перевага може бути перспективною для можливих застосувань у великомасштабному виробництві ферментів [29].

1.3 Ферменти з протипухлинними властивостями

Досить перспективними є результати досліджень ферментів з протипухлинними властивостями. Одним із таких є рибонуклеази (КФ 3.1.26.5, яка складається з 124 амінокислот, молекулярна маса 13 700 Да), отримана

науковцями: Шляховенко, Самойленко, Вербиненко, Стаховський. У досліді було представлено використання зразків пухлинних тканин, периферичної крові та сечі із 120 хворих в різних стадіях. Пацієнтам давали дозовано ферментний препарат рибонуклеази (з активністю 2000 од\мг, отриманої з продуцента *B. licheniformis* ATCC 14580, який культивували на стандартому середовищі Лурія Бертані, що містить пептон дріжджовий екстракт та сіль).

Результати у відібраних зразках показали, що рибонуклеаза пригнічує активність РНКаз у пухлинних тканинах, за рахунок імідазольної групи. Яка сприяє активації активний центру, котрий в свою чергу має кислотно-основним прояв. Отже це дає подальші перспективи для напрацювання досліджень в даному напрямку [7, 8].

Ферменти, які проявляють протипухлинні властивості, почали досить інтенсивно вивчати з появою нових технологій.

Можна відзначити вчених Glinka, Newton, Houser-Scott, науковий доробок яких присвячений дослідженню властивостей рибонуклеази (РН), синтезованої дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-448 на поживному середовищі сусло-агарі з додаванням амінокислот триптофану, лейцин і лізин [30,31]. У проведених дослідах *in vitro* було показано, що вже у концентрації 0,05 мл/л (середня активність ферменту у культуральній рідині становила 1000 од\мл) фермент проявляв потужну протипухлинну активність. Також можна відмітити, те що вчені вказали на певну токсичність для клітин-хостів. В свою чергу це обмеження впливає на можливість серйозних досліджень через неможливість повного контролю над процесом лікування [32,33].

Ще одна група вчених Ti Cai, Aulds, Gill, Gerio, базуючись на результатах своїх колег з попередніх досліджень, намагалися створити нову плазміду для збільшення синтезу з подальшим надсинтезом рибонуклеази у *S. cerevisiae* ВКПМ Y-448. Для еукаріотичної експресії вони використовували 4D5-дибарнази, яка складається з двох молекул барнази (штучний бактеріальний білок, який складається з 110 амінокислот), послідовно злитих з одноланцюговим змінним фрагментом (scFv) гуманізованого антитіла 4D5.

Вченими було зроблено висновок, що антитіло 4D5 може сприяти доставці барнази до позитивних клітин та покращувати синтез ферменту [34, 35].

Також слід сказати, що протипухлинні властивості ферменту пегаспаргаза досліджував професор біологічного університету в Китаї (Нанкінський університет біології) Luyue з групою вчених з Німеччини на чолі з Müller [38,39, 40]. Для своїх досліджень *in vitro* вчені використовували фермент, отриманий з модифікованої *Escherichia coli* (активність ферменту 750 од\мл). Результати показали, що фермент іммобілізовує ракові клітини, тобто нормальні клітини (не ракові) не пригнічуються [40, 41].

1.4 Ферменти з противірусними властивостями

У фармацевтичній розробці досить часто використовують препарати проявляють противірусні властивості. У своїх дослідженнях Романовська, Декіна, Севастьянов, Рогожа, займалися розробкою сумішей препарату з іммобілізованого лізоциму (КФ 3.2.1.17, яка складається з 148 амінокислот, молекулярна маса 16 537 Да), а також кількісне визначення та вивчення його властивостей. Для досліду лізоцим був отриманий з *Micrococcus lysodeikticus* 2665 (середня активність ферменту становить 2600 од\мл) на білковому середовищі з додаванням амінокислот. Для визначення його активності брали таку його кількість, що знижує оптичну густину суспензії клітин на 0,001 за 1 хв. Вміст білка у досліді контролювали методом Лоурі–Хартрі. [9]

Ще одним досить цікавим дослідженням із застосуваннями лізоциму при гострих респіраторних захворюваннях верхніх дихальних шляхів, займалися Абатуров, Агафонова, Токарєва з Дніпропетровської медичної академії. Ферментний препарат отриманий із схожого продуцента котрий був представлений раніше (*Micrococcus lysodeikticus* 2665), використовували як добавку до ЛЗ Лізак. Результатом такого терапевтичного поєднання стало стимулювання інтерлекіну-1В. Лізоцим проявляє катіонний механізм дії на чужорідні білки, що в свою чергу спровокував антибактеріальну та противірусну дію [10].

Також розглядаючи наукові публікації не можна пропустити науковий огляд, Карєвіної та Волошиної з Національного університету харчових технологій на тему способи одержання ферментного препарату лізоциму. Вони розглянули способи отримання лізоциму із яєчного білку та крові ссавців, проте слід відзначити також отримання стафілококового лізоциму. Тобто при рості на бульйоні Лурія[1] *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 здатен синтезувати бактеріальний лізоцим з активністю 840 од\мл. Проте використання *Staphylococcus aureus* у промислових масштабах ускладнене через його патогенність.

Слід відмітити також отримання лізоциму із рекомбінантного штаму *B. subtilis* AJ73 (не патогенний продуцент), котрий в 2,5 рази синтезує більше лізоциму. Тобто активність іммобілізованого лізоциму знаходилася на високому рівні, 86-97 % від активності вільного ферменту і становить 1270 - 2100 од/мл [11].

Актуальним нині та перспективним є дослідження ферментів з противірусними властивостями. Вчені з Кореї Лі Хуан, Фузетті та США Лоффлер досліджували властивості ферменту лізоциму (лізозим), одержаного з *Enterococcus lactis* Q1 (середня активність ферменту 3000 од\мл). Результатом досліджень *in vitro* показано, що даний фермент діє проти РНК-вірусів ВІЛ [36].

Підсумовуючи результати досліджень вчених: при попаданні лізоциму в організм людини, підвищується його вміст в крові, що в свою чергу сприяє підвищенню противірусного імунітету [37].

1.5 Ферменти з протизапальними властивостями

Слід звернути увагу на ферменти з протизапальними властивостями. У 1994 році компанія Bitop AG отримала високоактивний фермент амінотрансферазу (АТ) (активність ферменту знаходиться в таємниці, але не в офіційних джерелах становить 600 од\мл) шляхом модифікації генотипу *Halomonas*

[1] Бульйон Лурія - це багате на поживні речовини середовище, що в основному використовується для росту бактерій наступного складу %: 1% триптону, 0,5% дріжджового екстракту і 1% NaCl.

elongata ATCC 33173, який є перспективним продуцентом АТ (комерційна назва - Ектоін), проявляє протизапальні властивості [42].

Тривалі дослідження вчених з Франції Ca´Novas, Vargas були спрямовані на дослідження ферменту АТ, отриманого з штаму *H. elongata* DSM 3043 (1H11), який був виділений із засоленої гірської породи. Виявилося, що отриманий організм відрізняються від інших штамів *H. elongata*. Хоча він схожий на штам *H. elongata* ATCC 33173, проте *H. elongata* DSM 3043 (з активністю у 1,5-2-рази більше із *H. elongata* ATCC 33173) здатен витримувати більш жорсткі умови навколишнього середовища за рахунок більшої товщини клітинної стінки, а саме рости за підвищеного вмісту солі 0,5 М NaCl у порівнянні з *H. elongata* ATCC 33173 (0,05 М NaCl) [43].

1.6 Ферменти з комбінованими властивостями

Однією із найбільш перспективних групою ферментних препаратів є препарати з комбінованимим властивостями. Одним із таких є серрапептидаза (КФ 3.4.24.40, яка складається з 470 амінокислот, молекулярна маса 50 000 Да). Можна звернути увагу на праці Демеденкова, Приставко, Берест, що досліджували ефективність серрапептази при лікуванні хворих на гострий ринусит.

Для дослідження вчені отримували даний фермент був із *Serratia marcescens* E15 (активність ферменту 1000 од\мл). Результатами випробувань *in vitro* було підтвердженно протизапальну, протинабрякову та муколітичну дію серрапептази та швидкий терапевтичний ефект препарату у хворих з гострими риносинуситами. При тому, слід сказати, що механізм дії СП, спрямований на утворення комплексу з a_2- макроглобуліном у співвідношенні 1:1, що призводить до маскування антигенності ферменту без втрати його фармакологічної активності [12].

Слід також відмітити напрацювання вченого, Мацелюх котрий у співавторсті з Нідялковою та Варбанець, досліджували динаміку росту культури *Bacillus subtilis* 2788Els, продуцента еластази. Даний мікроорганізм здатен синтезувати фермент, котрого використовують як добавка до

перев'язувального матеріалу для загоєння ран (з протизапальним та антибактеріальним ефектом). Культивування продуцента проводили на оптимізованому середовищі, яке складалася з дріжджового екстракту, мальтози, желатину та солей. Вченими було встановлено, що максимальний вихід відбувався на 18-ту год культивування, при цьому активність ферменту становила приблизно 23000 од\мл. Таку активність вдалося їм отримати шляхом генетичної модифікації продуцента, а також оптимізації процесу культивування шляхом оптимізації поживного середовища. [13].

Аналіз наукових джерел дозволив виявити інтерес дослідників до ферментів з комбінованими властивостями. Так, вчені з Росії на чолі з Ананіним, досліджували властивості серрапептази (СП), отриманої з штаму *Brevibacterium* sp. U1, виділеного із ґрунту поблизу родовища солі і культивованого на мінеральному середовищі Раймора. У проведених дослідах *in vivo* довели наявність у СП, протизапальних властивостей [44].

Вчені Rouhani, Valizadeh, Molasalehi з Мюнхенського університету Людвіга—Максиміліана (*Німеччина*) та вчений з США: Dariush, досліджували властивості ферменту серрапептази (СП), виділеної з непатогенної кишкової бактерії *Serratia marcescens* E15 (активність ферменту 1000 од\мл), що мешкає в кишковому тракті тутового шовкопряду *Bombyx mori*. СП в дослідах *in vivo* проявляла фібринолітичну, протизапальну дію та здатність запобігати розвитку набряків у щурів [45]. В подальших дослідах було зафіксовано зменшення запального процесу. В свою чергу це дало їм дійти до висновку, що серрапептаза зменшує вираженість болю при запаленні тканей [46].

Ці самі вчені після досліджень отримали результати, які свідчать про те, що фермент окремо або в комбінації з іншими препаратами впливає на перебіг таких захворювань, як: бронхіт, атеросклероз, синдром зап'ястного каналу, ревматоїдний артрит та інші аутоімунні захворювання [47].

Надалі вчені досліджували механізм дії серрапептази на 2-х групах (75 хворих на гострий гнійний риносинуситом у віці від 19 до 46 років, які отримували лікування згідно з протоколами надання допомоги). В другій групі

(35 пацієнтів) крім стандартного лікування була назначена СП по 10 мг, 3 рази на добу після прийому їжі протягом 10 днів. На 7 день у пацієнтів котрі приймали СП, було помічено покращення стану більш швидше порівняно з першою групою [48, 49].

Також вченими зроблено висновок про механізм дії, який пов'язаний із зв'язуванням у співвідношенні 1:1 с α 2-макроглобуліном крові, що маскує її антигенність, але зберігає її ферментативну активність. Серрапептаза повільно переходить в судини до зони запалення і поступово зменшує дилатацію капілярів і контролює їх проникнення [50, 51]. Групою науковців у дослідах *in vivo* доведено, що фермент безпечний та ефективний у зменшенні набряку обличчя після видалення ураженого моляра. Серрапептаза може мати здатність зменшувати біль, а також застосовується для профілактики інфекцій (понад 80% бактеріальних інфекцій спричиняються біоплівками, а серрапептаза класифікується як засіб для знищення біоплівок) [52, 53].

Тривалі дослідження вчених з Німеччини були спрямовані на шляхи модифікації молекул СП з подальшою адгезією на клітинну поверхню. Адгезована молекула прямо і опосередковано стимулює імунну відповідь на запалення під час ушкодження клітин або тканин. Недавні досліди цими вченим призвели до цікавих результатів. Імобілізована СП використовувалася при лікуванні симптомів COVID-19. Це було пояснено тим, що даний фермент проявляє широкий спектр терапевтичних властивостей а саме: протизапальні, протимікробні, атеропротекторні, антитромботичні та фібринолітичні властивості [54].

Отже, в даному підрозділі було розглянуто ферменти з комбінованими властивостями, їх дію, та мікроорганізми, які їх синтезують. Слід зазначити, що фармацевтична ензимологія в нашій країні досить інтенсивно розвивається у напрямках одержання і використання з перспективою для медично-фармацевтичного напрямку.

Узагальнені дані стосовно властивостей та активності ферментів наведено таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Узагальнені дані стосовно властивостей та активності ферментів

Назва ферменту	Властивості та спрямованість дії	Активність ферменту, біологічний агент, особливості дослідження	Література
Комплекс ферментів з базидіального гриба *Schizophyllum commune*	Проявляє комплекс властивостей, а саме проявляє протипухлинну, протизапальну , антибактеріальн, імуномодулюючу та гепатопротекторну дію.	*Schizophyllum commune*	3
Еластотераза	Використовується для офтальмологічних плівок а також для прискореного загоєння ран при опіках II—IV ступенів, трофічних виразках, пролежнях і гнійних ранах	*Bacillus mesentericus* 316 М.	4
Стрептокіназа (СК)	Проявляє фібринолітичні властивості, а саме розщеплення згустків, та слугує добавкою до ЛЗ	*B. subtilis* IFO3335 Активність 2000 од\мл	5-6
Рибонуклеаза	Проявляє протипухлинні властивості	*B. Licheniformis* ATCC 14580 2000 од\мл	7-8
Лізоцим (лізозим)	Проявляє противірусні властивості, а саме проти РНК-вірусів ВІЛ, та добавка до таблеткових сумішей (ЛЗ Лізак)	*Micrococcus lysodeikticus* 2665 2600 од\мл Також продуценти	9-11

		Staphylococcus aureus, *B. Subtilis* AJ73 1270 - 2100 од/мл	
Нанокіназа (Наттокіназа) (Натто).	Проявляє фібринолітичні властивості, а саме покращення кровообігу та зниження артеріального тиску	*Bacillus subtilis var natto in vitro* з середньою активністю 600 од\мл	10, 11,13
Серрапептази (скорочено - СП)	Проявляє комбіновані властивості, а саме: - Фібринолітичні; - Протизапальні	*Serratia marcescens* E15 (активність ферменту 1000 од\мл)	12
Еластаза	Проявляє комбіновані властивості, а саме: Використовується як добавка до перев'язувального матеріалу для загоєння ран (з протизапальним та антибактеріальним ефектом).	*Bacillus subtilis* 2788Els (активність ферменту 23000 од\мл	13
Стрептокіназа (СК)	Проявляє фібринолітичні властивості, а саме розщеплення згустків	*B. subtilis* CIR110 та CIR 120 200 од\мл in vivo *B. subtilis* IFO 3936 та IFO3335 з середньою активністю 200 од/мл	14,15,16
Рибонуклеаза	Проявляє протипухлинні властивості	*Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-448 1000 од\мл	17-22
		Escherichia coli	

Лізоцим (лізозим)	Проявляє противірусні властивості, а саме проти РНК-вірусів ВІЛ	*(модифікована)* 750 од\мл	23, 24
Пегаспаргаза	Проявляє протиракові властивості	*Enterococcus lactis* Q1 середня активність ферменту 3000 од\мл	25,26, 27, 28
Амінотрансфераза (ектоін), (скорочено АТ)	Проявляє протизапальні властивості	*Halomonas elongata* ATCC 33173 600 од\мл *H. elongata* DSM 3043 (1H11) активністю у 1,5-2-рази більше із *H. elongata* ATCC 33173	29, 30
Серрапептази (скорочено - СП)	Проявляє комбіновані властивості, а саме: - Фібринолітичні; - Протизапальні Як особливість даного ферменту є можливість використання при лікуванні симптомів ***COVID-19***	*Serratia marcescens* E15 (активність ферменту 1000 од\мл) *in vivo*	31-41

Таким чином, огляд сучасних літературних джерел дозволив охарактеризувати ферменти такого терапевтичного спрямування: фібринолітичного, протизапального, противірусного, протипухлинного, провести аналіз їх властивостей, спрямованості дії та окреслити коло мікроорганізмів, які їх синтезують. Найперспективнішими на сьогодні є ферментні препарати з комбінованими властивостями, наприклад, серратіопептидаза. Для цього ферменту характерне вдале поєднання фібринолітичних властивостей із іншими: протеолітичними, антифібротичними, протизапальними, антиатеросклеротичними, антиоксидантними ефектами, що значно підвищує універсальність його застосування та дозволяє зменшити терапевтичне дозування. Отже, доцільним є розроблення технологічних підходів до створення лікарських засобів на основі серратіопептидази.

РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ КОМБІНОВАНОЇ ТЕРАПЕВТИЧНОЇ ДІЇ - СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ

2.1. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу

В Україні корона вірусна інфекція (COVID-19) вперше була діагностована 3 березня 2020 року в м. Чернівці. 13 березня був зафіксований перший летальний випадок. Станом на 8 квітня 2022 рік в Україні нараховується 4982249 хворих людей (і досі триває). Також слід відмітити, що стан пандемії тимчасовий, тому потреба для лікування COVID-19 - тимчасова. Натомість серратіопептидаза використовується для лікування й інших хвороб таких як Серцево-судинні захворювання (ССЗ) де кількість хворих становить приблизно 18,6 мільйонів нових виявлених випадків за рік (спираючись на останню доступну статистику 2019 р) [87].

Доцільно розраховувати потребу у цільовому продукті для однієї конкретної області України, наприклад Харківської, в якій налічується 116367 хворих станом на 2020 р. Також слід врахувати кількість хворих на пандемію COVID-19 тобто, 305 661 станом на 2022р. Ще одним важливим фактором для розрахунку є рекламна кампанія, так як даний ЛЗ вважається новим то реклама буде обмеженою, отже, ми можемо заповнити теоретично до 10% ринку по даній області [88, 89].

Дані для розрахунку річної потреби у серратіопептидазі наведено у табл.2.1

табл.2.1

Дані для розрахунку річної потреби у серратіопептидазі

Вид захворювання	Доза серратіопептидази на добу, мг	Тривалість прийому, діб	Кількість препарату на 1 хворого на курс лікування, мг	Загальна теоретична кількість хворих в Україні на рік (10 % від загальної потреби)	Загальна кількість серратіопептидази на всіх хворих, г
COVID-19	60	30	1800 (1,8 г)	116 367 х 0,1 = 11 637	20 946,6 (21,0 кг)
Серцево-судинні захворювання (ССЗ)	30	30-60 (приймає 60)	1800 (1,8 г)	305 661 х 0,1 =30 566	55 018,8 (55,2 кг)
Разом					76,2 кг

Для розрахунку необхідної кількості СП, слід розрахувати кількість хворих які будуть потенційно використовувати. Припустимо, що 90% складають імпортні товари, котрі будуть використовувати при лікування COVID-19 та ССЗ.

Тому, розрахуємо орієнтовну кількість людей котрим можна запропонувати новий ЛЗ:

116 367 × 0,1 = 11 637 (людей) COVID-19

305 661 х 0,1 = 30 566 (людей) ССЗ

Розраховуємо курс лікування одного пацієнту для COVID-19 становить в середньому 30 днів, 3 рази по 20 мг. Розрахунок курсу лікування одного пацієнта для ССЗ становить в середньому 30-60 днів, 3 рази по 10 мг

Розрахуємо кількість ЛЗ для одного пацієнта (повний курс лікування):

3 × 20 × 30 =1800 (мг\місяць) або 1,8 г для COVID-19 та ССЗ

Розрахунок необхідної кількості для задоволення потреб:

(11 637 × 1,8)/1000 = 21,0 (кг) COVID-19

(30 566 × 1,8)/1000= 55,2 (кг) ССЗ

Згідно наведеної інформації в статті [89], в одному 1 л культуральної рідини (КР) міститься 6,5 г ферменту.

Отже, необхідна кількість КР (без врахування втрат при виділенні):

(21+55,2) / 6,5 = 11,72 ($м^3$) 48,54 $м^3$

Розрахунок КР (з урахуванням втрат при виділенні 50 %):

(11,72 × 0,5) + 11,72 = 17,58 ($м^3$) (48,54× 0,5) + 48,54= 72,81 ($м^3$)

2.1.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу, галузей використання, потреби у даному лікарському засобі

На сьогоднішній день в Україні, а також у світі існує високий попит на ЛЗ на основі ферментних препаратів. Ферменти – це група препаратів, які сприяють поліпшенню фізіологічних процесів в організмі. В даний час перспективним є впровадження нових ферментних препаратів мікробного походження, фармакологічна активність яких буде такою ж, як і у відомих препаратів тваринного походження [55].

Непередбачувані пандемії грипу, різноманітні інфекційні та серцево-судинні захворювання вимагають розробки та пошуку нових ферментних препаратів [56]

Нещодавній спалах коронавірусної хвороби 2019 року (COVID-19) привернув широку увагу до потреби у розробці ефективного та безпечного препарату для лікування поточної пандемії та запобігання різним інфекціям, які можуть виникнути в майбутньому [57].

Згідно даних МОЗ, станом на жовтень 2021 року, кількість хворих на COVID-19 зросла у 2,5 рази порівняно з травнем 2021 року. Також можна відмітити що у кожної людини (залежно від вікових особливостей), симптоми можуть бути різними, але після одужання часто спостерігається вплив на серцеву-судинну систему [58].

Пандемія коронавірусної хвороби (COVID-19), спричинена коронавірусом важкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV-2), стала основною загрозою для громадського здоров'я. Враховуючи високий рівень смертності від COVID-19, існує нагальна потреба у пошуку ефективних

препаратів, які можуть боротися з вірусом, зменшувати тяжкість захворювання [59].

Згідно з дослідженнями, кашель (поряд з лихоманкою) є одним з основних симптомів COVID-19, який спостерігається у 76% пацієнтів. [60]. Інші автори називають кашель найчастішим симптомом (40,1%) у пацієнтів з помірно тяжким перебігом COVID-19 [61], у зв'язку з чим складно недооцінити роль муколітичної та бронходилатуючої терапії у зменшенні смертності від коронавірусної інфекції [62].

У пацієнтів, котрі хворіють на COVID-19 та мають підвищення рівня фібриногену та зниження рівня антитромбіну спостерігається ускладнення у вигляді серцево-судинних захворювань (на біохімічному рівні відбувається підвищення D-димеру та продуктів розпаду фібрину/фібриногену) [63,64] . Отже, слід зазначити, що дані продукти розпаду беруть участь у внутрішньому згортанні респіраторного дистрес-синтрому [65].

Фібринолітична терапія СП була запропонована як невід'ємна частина лікування COVID-19 [66]. СП характеризуються високою спорідненістю до субстратів і сильними фібринолітичними властивостями [67]. Тому СП здатний сприяти руйнуванню тромбу та атеросклеротичних бляшок і знижувати ризик інсульту, атеросклерозу та тромбофлебіту [68].

Поєднання фібринолітичних властивостей серратіопептидази з іншими сприятливими ефектами цього ферменту (протеолітичним, антифібротичним, протизапальним, антиатеросклеротичним, антиоксидантним) забезпечує серратіопептидазі переваги у зменшенні тяжкості судинних ускладнень COVID-19 (тромбозу, коагулопатії).

Дози, безпека та побічні ефекти серратіопептидази

Серратіопептидаза зазвичай добре переноситься, а побічні ефекти є рідкісними. СП розповсюджується тканинами та стає біодоступною у плазмі й лімфі після зв'язування з α-2-макроглобуліном. СП не є алергенною і зберігає свою ферментну активність на системному та клітинному рівнях впродовж 1 години. Дози серратіопептидази у більшості клінічних досліджень варіюють від

10 до 60 мг/добу натще. Тривалість застосування зазвичай становить 2-4 тижні (залежно від мети). На рисунку наведено ймовірні механізми впливу СП на продукцію слизу, інфекцію, запалення та імунітет у контексті COVID-19. СП може бути багатообіцяючим засобом у лікуванні COVID-19 у зв'язку з -імуномодулювальними, протизапальними, муколітичними, антифібротичними, антитромботичними, противірусними та фібринолітичними властивостями.

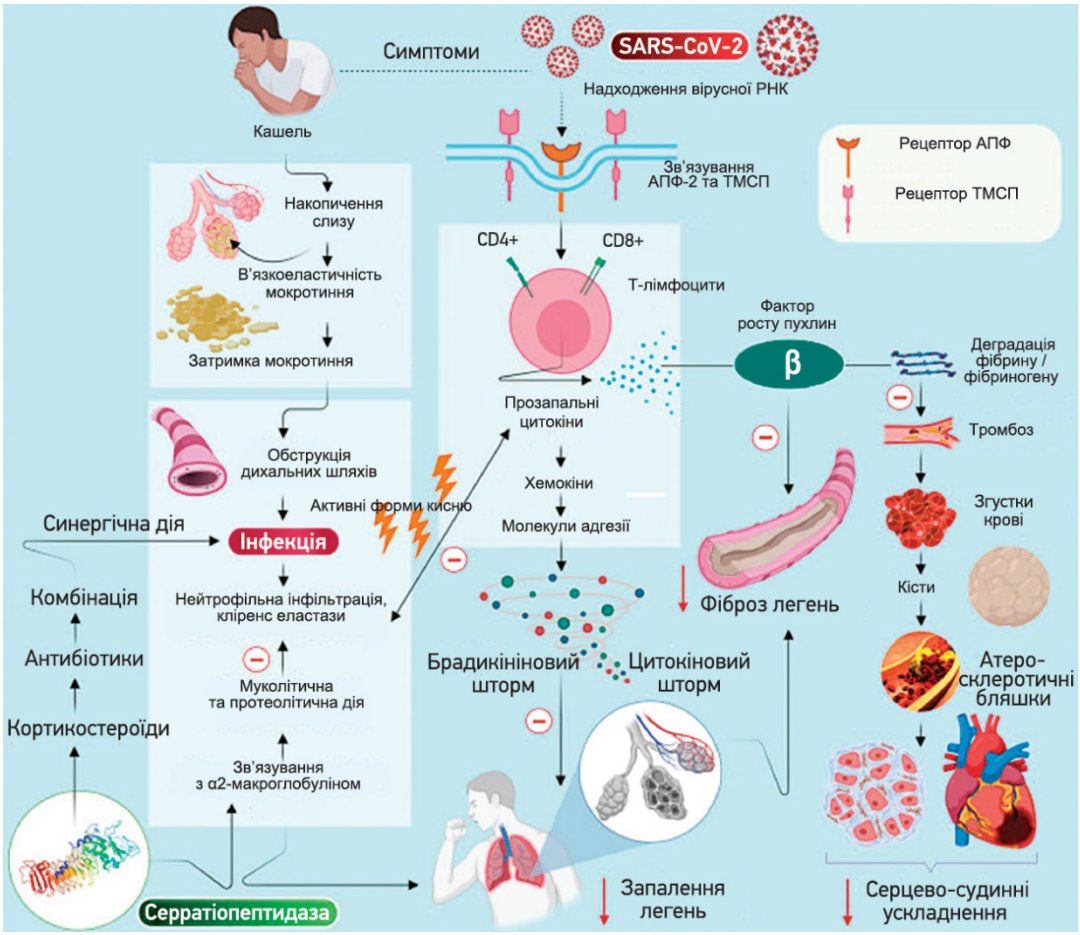


Рис 1. Схема потенційного впливу серратіопептидази на інфекційний процес, імунітет і запалення при COVID-19 [67].

Примітки: АПФ-2 – ангіотензинперетворювальний фермент; ТМСП – трансмембранна серинова протеаза.

2.1.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

Серратіопептидаза (СП) – це діюча основна діюча речовина (АФІ), котра проявляє не лише муколітичні, а й протизапальні, антимікробні, антитромботичні та фібринолітичні властивості. Здатність СП протидіяти запаленню ґрунтується на спроможності цієї речовини зменшувати вміст

запальних цитокінів, а також молекул адгезії, запобігаючи в такий спосіб міграції клітин запалення до місця ураження. Даному ЛЗ притаманні кращі показники безпеки, ніж нестероїдним протизапальним препаратам (НПЗП). Слід також сказати, що СП індукує фібринолітичну протизапальну та проти набрякову активність у ряді тканин, а її протизапальний ефект перевищує інші протеолітичні ферменти [68].

Для досягнення кращого та ефективного використання, варто розглянути доцільність існуючих шляхів введення ЛЗ (**ферментів**), а саме: пероральне введення (через рот), сублінгвальне (під язик), трансбукальне (за щоку) та ректальне (через пряму кишку) [69].

Пероральний прийом лікарських засобів.

Даний метод є найбільш доступним і зустрічається дуже часто.

Переваги:

- Можливість вживання ліків хворим самостійно, без спеціальної підготовки та допомоги;

- Не травматичність введення та відсутність ускладнень, які часто бувають при парентальних методах (особливо введенні в ЦНС);

- Можливість введення великої кількості препаратів.

Але даний метод також має ряд недоліків, який пов'язаний з фізіологією ШКТ:

- Низька біодоступність ШКТ (шлунково-кишковий тракт) метаболізує частину препаратів до того як вони подіють);

- Можливий шкідливий вплив на ШКТ;

- Повільний розвиток терапевтичної дії, оскільки препарату необхідним є час щоб пройти крізь ШКТ і всмоктатися в кров;

- Наявність індивідуальних відмінностей в швидкості і повноті всмоктування, адже в популяції широко розповсюджені поліморфні варіанти генів тих білків, які відповідають за метаболізм ліків;

- Вплив їжі та інших препаратів на всмоктування, наприклад, не можна запивати таблетки соками чи кавою;

- Руйнування в просвіті шлунку і кишечника (інсуліну, окситоцину та ін.) або при проходженні через печінку (гормони);

- Неможливість введення ліків, які викликають сильну подразнювальну дію на кишечник.

Саме тому, якщо ми говоримо про ліки, які будуть вводитись перорально, необхідно враховувати ці мінуси і намагатись їх мінімізувати. Для попередження дратівної дії деяких лікарських речовин на слизову оболонку шлунку використовують таблетки, вкриті спеціальною плівкою, яка стійка до шлункового соку, але в лужному середовищі кишечника розщеплюється. Ця плівка також допомагає зменшити вплив речовин організму на препарат, щоб він не метаболізувався до необхідного часу. Для зменшення впливу їжі на безпечність та ефективність препарату необхідно вказувати переважні години приймання, їжу, яку не можна вживати за кілька годин до приймання ліків. Якщо препарат має сильну негативну дію на людей з певними поліморфними варіантами генів, необхідно виписувати дані ліки лише після консультації у лікаря та генетичного тестування [70, 71].

Сублінгвальне та трансбукальне введення

Вживання ліків під язик або за щоку загалом не відрізняється за перевагами та недоліками, тому розглядати ці два шляхи необхідно разом. Можна сказати, що переваги сублінгвального та трансбукального введення схожі за зручністю та безпекою з пероральним, але також мають ***особливі переваги*:**

- Відносно більш швидкий початок дії в порівнянні з пероральним шляхом введення;

- Внаслідок «обходу» печінки, препарати не піддаються швидкій деструкції, а також впливу травних ферментів і pH шлунково-кишкового тракту;

- Можливість зниження лікувальної дози через високу біологічну доступність таких препаратів і зниження побічних ефектів;

- Можливість використання в надзвичайних ситуаціях, наприклад, при больових, спастичних синдромах, нападах стенокардії та астми;

- Відсутність необхідності в запиванні водою або розжовуванні.

Недоліки:

- Відносно мала площа поверхні під'язикової слизової і, внаслідок цього, невелика кількість препарату, що всмоктався, частіше для цього підходять препарати з невеликим дозуванням активної субстанції;

- Значні втрати препарату через неконтрольоване проковтування слини;

- Сублінгвальному прийманню препаратів перешкоджає вживання їжі та напоїв, розмови;

- Цей шлях приймання *не підходить для ліків пролонгованої дії*;

- Ці способи не може бути використані, коли пацієнт відмовляється від співпраці або знаходиться в несвідомому стані;

- Пацієнт не повинен курити під час приймання таких ліків, тому що куріння викликає звуження кровоносних судин, що в свою чергу знижує всмоктування.

Сублінгвальний метод введення має певні переваги над трансбукальним — сублінгвальна ділянка порожнини рота більш проникна, ніж трансбукальна. Відмінності в проникності пов'язані з відносною товщиною, кровопостачанням і ступенем кератинізації цих мембран.

Загалом, біологічна доступність ліків при сублінгвальному введенні залежить також від *фізико-хімічних властивостей субстанцій*, тому не всі ліки можуть бути придатні для транспорту через слизову оболонку порожнини рота через особливості її будови і фізико-хімічної природи лікарського засобу. *Ліки, які потребують метаболічної активації використовувати таким шляхом не можна* [72, 73].

Ректальне введення

- При ректальному введенні лікарські препарати вводяться, використовуючи слизову прямої кишки для отримання системного ефекту. В більшості випадків, цей метод використовується тоді, коли інші шляхи

введення не доступні. Особливо прийнятний цей шлях, коли утруднено або неможливо введення препаратів пероральна (блювота, нудота, травми голови, спазм або непрохідність стравоходу і ін.), а також для дітей.

- Пряма кишка добре постачається кров'ю і має високу всмоктувальну здатність для багатьох лікарських засобів.

- Цей метод має переваги у зв'язку з тим, що препарати, введенні ректально, оминають ШКТ. Ректальне введення препаратів дозволяє уникнути подразнення слизової шлунка, а лікарська речовина не піддається дії ферментів шлунково-кишкового тракту. Тому у пряму кишку вводять лікарські речовини, які в значній мірі руйнуються в шлунку і печінці при їх пероральному застосуванні. Таким чином, в даний час багато лікарських препаратів можуть бути введені ректальним шляхом замість парентального або перорального введення.

- Але ректальне введення лікарських препаратів може бути небезпечним у хворих зі зниженим імунодефіцитом, у яких найменша травма може привести до розвитку абсцесів. Окрім цього біодоступність при ректальному введенні зазвичай нижче, ніж відповідних доз при пероральному введенні

Загальним підсумком наведеної інформації є наступне: що більш доцільним введенням ЛЗ (ферментів), вводити необхідно перорально. Аргументуванням того є дешевизна виробництв, проста технологія (відтворити та вдосконалена) та доступність необхідного обладнання (компонентів).

Зачасту, СП порошкоподібної форми. Тому необхідно розглядати варіант ЛЗ у вигляді порошків.

Порошки - тверді лікарські форми, що містять сухі суміші тонкодисперсних лікарських і нелікарських речовин, призначені для внутрішнього або зовнішнього застосування. Зачасту це тверда речовина в дрібно подрібненому стані (від 10 нм до 1000 мкм), яку зазвичай отримують дробленням або подрібленням.

На даний момент застосування порошків розширюється в різноманітних галузях, таких як харчові продукти, косметика, хімікати та багатьох інших

фундаментальних галузях, зокрема у фармацевтиці. Більшість активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) вводяться у вигляді твердих лікарських форм, виготовлених шляхом обробки та формування порошків.

Незважаючи на те, що в сучасній медицині порошки як лікарські форми були замінені переважно таблетками та капсулами, вони є одними з найстаріших лікарських форм і мають певні переваги, які призвели до їх подальшого використання як фармацевтичних лікарських форм.

Переваги порошків

1. Існує широкий вибір інгредієнтів, і доза може бути легко досягнута для введення пацієнтом.

2. Порошки мають кращу фізико-хімічну стабільність і більший термін зберігання порівняно з рідкими лікарськими формами. Наприклад, термін придатності порошків для сиропів з антибіотиками становить 2-3 роки, але після розчинення у воді він становить 1-2 тижні.

3. Діти та дорослі, які мають проблеми з ковтанням таблеток або капсул, можуть вважати порошки більш прийнятними.

4. Велику дозу, яку неможливо ввести в інших формах, можна вводити у вигляді порошку. Наприклад, якщо доза лікарського засобу становить від 1 до 5 г, іноді неможливо виготовити таблетки для доставки препарату пацієнту.

5. Швидке розсіювання ліків відбувається в шлунку, коли їх дають у формі порошку, а не у пресованій формі.

6. Швидкість розчинення порошків для перорального застосування, що містять водорозчинні лікарські речовини, як правило, швидше, ніж таблеток або капсул, у яких перед розчиненням потрібне розпад таблетки або оболонки капсули.

7. Порошок можна розвести у воді або іншій рідині та легше проковтнути.

8. Оральні порошки можна змішувати з напоєм або яблучним пюре безпосередньо перед використанням.

9. Виробництво порошкоподібної лікарської форми є економічним, отже, вартість продукту досить економічна порівняно з іншими лікарськими формами.

10. Порошки пропонують велику гнучкість у складанні твердих речовин.

Недоліки порошків

1. Порошки не є лікарською формою вибору для препаратів з неприємним смаком. Це пов'язано з тим, що маскування неприємного смаку може бути проблемою цього типу приготування.

2. Препарати, які швидко псуються під впливом атмосфери або кислого pH, не повинні видаватись у вигляді порошків. Наприклад, солі двовалентного заліза легко окислюються, тому їх не можна вводити у вигляді порошків.

3. Порошки громіздкі, їх незручно носити.

4. Порошки не є придатною лікарською формою для введення ліків, які інактивуються в шлунку, або препаратів, які можуть завдати шкоди шлунку.

5. Дозування сильнодіючих ліків, які потребують низьких доз, у вигляді порошків (наприклад, сипучих порошків) може бути недоцільною. Це пов'язано з тим, що індивідуальні дози зазвичай витягуються з основної маси за допомогою ложки об'ємом 5 мл, яка може змінюватись у наповненні ложки (наприклад, рівна або повна ложка).

6. Порошки погано підходять для дозування гігроскопічних або розчинних препаратів [74, 75].

Для аргументування фасування ЛЗ у вигляді порошку передбачається два варіанти, а саме: таблетки та капсули. Тому необхідно розглянути переваги та недоліки кожного з них.

Таблетки це недорогий, безпечний і ефективний спосіб доставки пероральних ліків. Дані одиниці ліків виготовляються шляхом пресування одного або кількох порошкоподібних інгредієнтів з утворенням твердої твердої таблетки з гладкою оболонкою, яка розщеплюється в травному тракті.

Крім активних інгредієнтів, більшість таблеток містять добавки, які утримують таблетку разом і покращують смак, текстуру або зовнішній вигляд.

Таблетки можуть бути круглими, довгастими або дископодібними. Довгасті таблетки відомі як капсули, які легше проковтнути. Деякі мають лінію, накреслену посередині, що полегшує їх розділення навпіл [76].

Деякі таблетки мають спеціальне покриття, яке запобігає їх розщепленню в шлунку. Це покриття гарантує, що таблетка розчиниться лише після потрапляння в тонкий кишечник.

Інші таблетки випускаються у формі жувальних форм або таблеток для перорального розчинення, які самостійно розщеплюються у слині. Ці типи таблеток можуть бути особливо корисними для людей, які мають проблеми з ковтанням. У будь-якому випадку розчинена таблетка ліки зрештою всмоктується у вашу кров. Розчинені ліки потрапляють у вашу печінку, а потім розподіляються в одній або кількох цільових областях вашого тіла, щоб вони могли виконувати свою роботу.

Під час цього процесу препарат зазнає хімічних змін, відомих як метаболізм.

Переваги:

- міцність та довговічність;
- чіткість дозування;
- в одній таблетці може міститися більш високе дозування;
- деякі таблетки можна жувати;
- їх можна розділити на кілька частин;
- таблетки значно дешевші у виробництві.

Недоліки:

- з моменту попадання таблетки в рот і рухаючись стравоходом, на неї впливає цілий ряд руйнівних факторів. Тому частина поживних елементів може просто не дійти до шлунка;
- найчастіше таблетки мають неприємний смак або післясмак (рідко);

- повільно діють;
- передозування більш вірогідні таблетками [77].

Капсули містять ліки, укладені у зовнішню оболонку. Ця зовнішня оболонка руйнується в травному тракті, і ліки всмоктуються в кров, а потім розподіляються та метаболізуються майже так само, як ліки з таблетки.

Існує два основних типи капсул: з твердою оболонкою та з м'яким гелем.

Капсули з твердою оболонкою

Зовні капсула з твердою оболонкою складається з двох половинок. Одна половина вставляється в іншу, утворюючи закритий корпус. Внутрішню частину заповнюють сухим препаратом у вигляді порошку або гранул.

Інші капсули з твердою оболонкою містять ліки в рідкій формі. Вони відомі як заповнені рідиною тверді капсули (РТК).

Повітронепроникні РТК дають можливість одній пігулці містити більше одного препарату. Тому вони ідеально підходять для формул подвійної дії або пролонгованого вивільнення.

М'які гелеві капсули

М'які гелеподібні капсули мають дещо інший вигляд, ніж капсули з твердою оболонкою. Зазвичай вони ширші й напівпрозорі, а не непрозорі.

Також відомі як рідкі гелі, вони містять ліки, суспендовані в желатині або подібній речовині. Ця речовина легко засвоюється, при цьому активні інгредієнти вивільняються і засвоюються.

Плюси капсул:

- Капсули, як правило, руйнуються швидше, ніж таблетки. Вони можуть запропонувати швидше полегшення симптомів, ніж таблетки.

- Капсули рідше мають неприємний смак або запах.

- Вони часто зроблені так, що їх не так легко розколоти навпіл або розчавити, як таблетки. У результаті капсули з більшою ймовірністю будуть прийняті за призначенням.

- Капсули мають вищу біодоступність, що означає, що більша кількість препарату, ймовірно, потрапить у кров. Це може зробити капсульні формати трохи ефективнішими, ніж таблетки.

Мінуси капсули:

- Капсули, як правило, менш стабільні, ніж таблетки. Вони можуть реагувати на умови навколишнього середовища, зокрема на вологість.

- Капсули закінчуються швидше, ніж таблетки.

- Капсули, які містять рідину, як правило, дорожчі у виробництві, ніж таблетки, і, як наслідок, можуть коштувати дорожче.

- Багато капсул містять желатин, отриманий зі свиней, корів або риби. Це може зробити їх непридатними для вегетаріанців і веганів.

- Капсули не вміщають стільки ліків, скільки таблетки. Вам може знадобитися прийняти більше, щоб отримати ту саму дозу, що й у таблетці.

Висновки та результати:

Таблетки та капсули є двома поширеними типами пероральних ліків. Хоча вони мають схоже призначення, вони також мають деякі ключові відмінності. Таблетки мають довший термін придатності та випускаються в різних формах . Вони також можуть вмістити вищу дозу активного інгредієнта, ніж капсула. Вони, як правило, діють повільніше і в деяких випадках можуть нерівномірно розпадатися у вашому тілі. Капсули діють швидко, і більшість, якщо не весь, препарат всмоктується. Отже, доцільніше використовувати таблетки вкриті додатковим кишковорозчинним покриття (щоб ЛЗ пройшов без втрат активності при введенні).

2.2. Обгрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції для інженерної частини роботи

Протеолітичні ферменти використовуються в лікуванні низки нозокоміальних, вірусних і резистентних інфекцій у зв’язку з хорошими показниками безпеки й переносимості, а також синергічною дією з деякими іншими медикаментами [78].

Переваги ферментних засобів – потужне зв'язування з молекулярною мішенню, висока специфічність та здатність зумовити перетворення молекул-мішеней. Оскільки протеолітичні ферменти можуть контролювати надходження вірусів до макроорганізму, їхню реплікацію і проникнення до клітин, вони можуть застосовуватися в лікуванні COVID-19. Так, СП запропоновано як терапевтичний засіб при COVID-19 [79].

Серратіопептидаза має не лише муколітичні, а й протизапальні, антимікробні, антитромботичні та фібринолітичні властивості; вона протягом тривалого часу успішно застосовується в клініці. Ці властивості обґрунтовують доцільність її застосування при COVID-19 з метою зменшення тяжкості хвороби, запобігання її прогресуванню та мінімізації ризику ускладнень і смерті [80].

Здатність СП протидіяти запаленню ґрунтується на спроможності цієї речовини зменшувати вміст запальних цитокінів, а також молекул адгезії, запобігаючи в такий спосіб міграції клітин запалення до місця ураження. Відомо, що СП притаманні кращі показники безпеки, ніж нестероїдним протизапальним препаратам (НПЗП). Слід також сказати, що СП індукує фібринолітичну протизапальну та проти набрякову активність у ряді тканин, а її протизапальний ефект перевищує інші протеолітичні ферменти [81].

Нині типовими продуцентами СП є такі продуценти, *Bacillus* [84, 85], *Serratia* [82, 83].

Узагальнені дані щодо синтезу СП бактеріями наведені

Таблиця 2.1

Порівняльна характеристика продуцентів серратіопептидази

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація продукту, одиниць/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
Serratia marcescens AD-W2	Соєвий шрот Казеїн $NH_4H_2PO_4$ Соєва олія NaCl KCl $MgSO_4$ ZnSO4 Глюкоза	20,0 15,0 7,5 5,0 0,5 0,1 0,1 0,1 20,0	72	57 256	Культивування в колбі Ерленмейера об'ємом 500 мл у ротаційному шейкері при 200 об/хв , 30 °С.	Devtulya C.C., Jasmine K. K. , Diksha K.V.. Mehedi H.S., Mohd J. D. and Asha C. P. Purifcation and characterization of thermoactive serratiopeptidase from Serratia marcescens AD-W2. doi: 10.1186/s13568-021-01223-7.
Serratia marcescens (sp.) KG-2-1	(#) Мальтоза Пептон Дріжджовий екстракт K2HPO4 KH2PO4, MgSO4×7H2O	 15 20 20 1 1 0,2	24	258	Максимальна продуктивність була отримана в культуральному середовищі при температура інкубації 33 °С при pH 7,0, при 150 об/хв	Taneja, K., Bajaj, B. K., Kumar, S., & Dilbaghi, N. (2017). Production, purification and characterization of fibrinolytic enzyme from Serratia sp. KG-2-1 using optimized media. 3 Biotech, 7(3). doi:10.1007/s13205-017-0808-4

Bacillus amyloliquefaciens KJ10	Декстроза Пептон Дріжджовий екстракт MgSO4×7H2O K2HPO4 KH2PO4	10 5 10 # 0,2 1 1	72	3940 #(4 ст)	Максимальна продуктивність була отримана в культуральному середовищі при температура інкубації 34 °C при pH 8,0	Rajaselvam, J., Benit, N., Alotaibi, S. S., Rathi, M. A., Srigopalram, S., Biji, G. D., & Vijayaraghavan, P. (2021). In vitro fibrinolytic activity of an enzyme purified from Bacillus amyloliquefaciens strain KJ10 isolated from soybean paste. Saudi Journal of Biological Sciences. doi:10.1016/j.sjbs.2021.04.061
Bacillus subtilis I-2	Меляса Пептон Дріжджовий екстракт +# K2HPO4 Na2HPO4 MgCl2 Na2CO3	5 5 5 4 1 0,1 6	12	900	Максимальна продуктивність була отримана в культуральному середовищі при температура інкубації 37 °C при pH 8,0 (#) при 180 об/хв	Bajaj, B. K., Singh, S., Khullar, M., Singh, K., & Bhardwaj, S. (2014). Optimization of fibrinolytic protease production from Bacillus subtilis I-2 using agro-residues. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57(5), 653–662. doi:10.1590/s1516-8913201402132

Примітка – (#) – Оптимізовані складові при культивуванні мікроорганізмів.

При виборі біологічного агенту необхідно враховувати активність синтезованого ферменту, склад і вартість поживного середовища, а також тривалість культивування. Проаналізувавши дані, наведені в табл. 3.1, можна зробити висновок, що найбільш високі показники активності ферменту має штам *Serratia marcescens* AD-W2 (57 256 од/мл), у той час як в *Serratia marcescens* (*sp.)* KG-2-1 та *Bacillus amyloliquefaciens* KJ10 258 од/мл та 3940 од/мл відповідно. Штам *Bacillus subtilis* I-2 має нижчу активність ферменту (900 од/мл) ніж *Bacillus amyloliquefaciens* KJ10.

Тривалість культивування штамів *Serratia marcescens* AD-W2– становить 72 години; *Serratia sp.* KG-2-1культивують впродовж 24 годин, *Bacillus amyloliquefaciens* KJ10 і *Bacillus subtilis* I-2 потрібно культивувати протягом 72 та 12 годин відповідно [64] 86.

Наступним етапом при виборі біологічного агенту є порівняння вартості поживних середовищ (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів серратіопептидази

Продуцент	**Компонент поживного середовища, г/л**	**Ціна компонента, грн/кг**	**Вартість компонента (грн) на 1 л середовища**	**Джерело інформації (1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11 12,13,)***
1	***2***	***3***	***4***	***5***
Serratia marcescens AD-W2	Соєвий шрот-20	20	0,4	1
	Казеїн-15	281	4,215	2
	$NH_4H_2PO_4$-7,5	55	0,4125	3
	Соєва олія-5	19,8	0,099	4
	NaCl-0,5	4,1	0,0021	5
	KCl-0,1	40	0,004	6
	MgSO4-0,1	93	0,0093	7
	ZnSO4-0,1	80	0,008	8
	Глюкоза-20	23	0,46	9
	Вартість 1 л середовища – 5,61грн			
Serratia marcescens (sp.) KG-2-1	Мальтоза-15	228	3,42	10
	Пептон-20	990	19,8	11
	Дріжджовий екстракт-20	14	0,28	12
	K2HPO4-1	144	0,144	13

Продовження табл.2.2.

1	*2*	*3*	*4*	*5*
	KH2PO4-1	49	0,049	14
	MgSO4×7H2O-0,2	12	0,0024	15
	Вартість 1 л середовища –23,7 грн			
Bacillus amyloliquefaciens KJ10	Декстроза-10	23	0,23	9
	Пептон –5	990	4,95	11
	Дріжджовий екстракт-10	14	0,14	12
	MgSO4×7H2O-0,2	12	0,0024	15
	K2HPO4-1	144	0,144	13
	KH2PO4-1	49	0,049	14
	Вартість 1 л середовища – 5,52 грн			
Bacillus subtilis I-2	Меляса -5	18	0,09	16
	Пептон-5	990	4,95	11
	Дріжджовий екстракт-5	14	0,07	12
	K2HPO4 -4	144	0,576	13
	Na2HPO4 -1	250	0,25	17
	MgCl2 -0,1	21	0,0021	18
	Na2CO3-6	25	0,15	19
	Вартість 1 л середовища – 6,1 грн			

Примітка. * - Ціни наведено станом на листопад 2021 р.

1. https://prom.ua/ua/p1359077301-shrot-soevyj.html?
2. https://flagma.ua/uk/kislotny-tehnicheskiy-kazein-o9191694.html
3. https://prom.ua/p1076981618-diammonijfosfat-pisch-meshki.html?&primelead=MC44
4. https://family-farm.com.ua/bakaleya/maslo-soevoe-1-kg-13
5. https://kaapri.com.ua/p1100353722-sol-pischevaya-krupnogo.html
6. https://prom.ua/Kalij-hloristyj-kcl.html
7. https://ukrchemgroup.com/p783600334-sulfat-magniyamagnij-sernokislyj.html
8. https://kiev.prom.ua/ua/p1375340336-sulfat-tsinka-1kg.html?&primelead=MS43Mg
9. https://flagma.ua/glyukoza-o9380164.html
10. https://kirovogradskaya-obl.prom.ua/ua/p1491851255-maltoza-500-bee.html?
11. https://ub.ua/market/view/522849/all/pepton-fermentativniy/
12. https://flagma.ua/uk/ekstrakt-drizhdzhiv-drozhzhevoy-ekstrakt-o11604150.html
13. https://kirovogradskaya-obl.prom.ua/p151820671-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?
14. https://kirovogradskaya-obl.prom.ua/p1059869951-monofosfat-kaliya.html?
15. https://kirovogradskaya-obl.prom.ua/p40341252-magnij-sernokislyj-mnogovodnyj.html?&primelead=MS4xNw
16. https://flagma.ua/uk/melyasa-malyas-patoka-buryakova-o3412141.html
17. https://vlemiko.com.ua/p1237461796-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html
18. https://kirovogradskaya-obl.prom.ua/ua/p1130248250-magnij-hloristyj-bishofit.html?&primelead=MS4xNw
19. https://kirovogradskaya-obl.prom.ua/p261814127-natrij-uglekislyjkarbonat-natriya.html

Інформація, наведена у **табл. 2.2,** показує, що поживне середовище для культивування штаму *Bacillus amyloliquefaciens* KJ10 є найдешевшим, а для вирощування *Serratia marcescens* (*sp.)* KG-2-1 – найдорожчим.

Аби остаточно обрати біологічний агент, розрахуємо умовну вартість однієї одиниці активності цільового продукту (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Умовна вартість за одиницю активності СП, синтезованого на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища грн	Активність ферменту (од/мл)	Умовна вартість за одиницю активності (грн/од)	Тривалість культивування, год	Продуктивність синтезу ферменту (од/год)
Serratia marcescens AD-W2	5,61	57 256	0,000098	72	795,2
Serratia marcescens (sp.) KG-2-1	23,7	258	0,092	24	1,61
Bacillus amyloliquefaciens KJ10	5,52	3940	0,0014	72	6,61
Bacillus subtilis I-2	6,1	900	0,0068	12	75

Умовна вартість за одиницю активності СП, *Serratia marcescens* (*sp.)* KG-2-1 є найвищою та складає 0,092 грн/од , а *Serratia marcescens* AD-W2– найнижчою – 0,000098 грн/од.

Отже, проаналізувавши дані з усіх трьох таблиць, можна зробити висновок, що найоптимальнішим буде культивування штаму *Serratia marcescens* AD-W2, зважаючи на найвищу активність ферменту даного штаму 57 256 од/мл та дешеве поживне середовище.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ

3.1.Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях отримання субстанції

В залежності від мети застосування до ферментів з комплекснеми властивостями (фібринолітичними, протизапальними та протинабряковими) до препаратів пред'являються певні вимоги не лише відносно складу ферментів і оптимальних умов їх дії, але і відносно ступеня очищення, вживаних наповнювачів, вартості і ряду інших параметрів.

Дуже важливим моментом є оцінка безпеки даних ферментних препаратів, і в першу чергу це стосується мікробних ферментних препаратів, які вимагають ретельного хімічного, мікробіологічного і токсикологічного контролю.

Нині у світі виробляється велика кількість ферментних препаратів за різними технологіями, котрі задовільняють різні галузі промисловості, що використовуються на різних стадіях технологічного процесу. Різні фірми випускають ферментні препарати під різними комерційними (торговими) назвами. Проте робота з пошуку нових продуцентів, створенню нових препаратів пролонгованої дії, очищенню ферментних препаратів, підвищенню їх стабільності.

Таблиця 3.1

Підбір технологічного обладнання для після ферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
	ТП 1. Центрифугування культуральної рідини					
	ТП 1. Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідни після ферментаційного процесу (екзофермент)	1000 л	Загальний відсоток відходів на етапі ТП 1 складає 5% 1000×0,05=50 кг (біомаси)	950 л (супернатант)	Центрифуга DHC270 з автоматичним вивантаженням осаду, робочий об'єм 500 л, продуктивність до 1500 л/год, швидкість обертання до 10200 об/хв. https://liaoyanglongda.en.made-in-china.com/product/WXsEchyoELUP/China-DHC-China-Solid-Liquid-Separator-Continuous-Flow-Industrial-Disc-Stack-Centrifuge-Machine-with-Low-Price.html
	ТП 2. Відділення домішок та концентрування					
	ТП 2. Відділення домішок та концентрування	Розчин після центрифугування (висолювання)	950 л	Загальний відсоток втрат на етапі ТП2 складає 0%	950 л	Збірник об'ємом 1000 л з можливістю перемішування та підтримкі температури. Швидкість перемішування 10-680 об/хв. Габарити: висота-2000 мм, діаметр-1000 мм Виробник – " TOPTION" (Китай)

						https://russian.alibaba.com/product-detail/%D0%91%D0%B8%D0%BE-%D1%84%D0%B0%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D0%B5%D0%B2%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%B9-%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C-50L-100L-150L-1100008901225.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.44e752e0hxD8Ie
	ТП 3. Ультрафільтрація					
	ТП 3. Ультрафільтрація	Супернатант	950 л	Загальний відсоток котрий переходить на наступний етап ТП3 складає 15% 950 х 0,15 =142,5 кг Залишок (відходи виробництва) 950-142,5=807,5 л	142,5 л	Ультрафільтраційна установка MMS продуктивністю до 3 500 л/год, Нержавіюча сталь 316L. Модулі з порожнистим волокном (30 кДа), Площа мембрани 1,7 – 2,2 $м^2$ https://www.mmsx.com/site/assets/files/1330/sw25_pilot_system_brochure_eng.pdf

Продовження табл. 3.1

	ТП 4. Іоннообмінна хроматографія					
	ТП 4. Іоннообмінна хроматографія	Зконцентрований розчин СП	142,5 л	Загальний відсоток котрий переходить на наступний етап ТП4 складає 15% 70 х 0,15 =10,5 л	10,5 л	Хроматограф промисловий HPC060 продуктивністю 60 л/год та номінальним тиском 100 бар, Типове сполучення колонок 6-15 см внутр https://fluidmgmt.ak-bio.com/products/hplc-systems/
	ТП 5. Сушіння					
	ТП 5. Сушіння	Рідка СП	10,5 л	Загальний відсоток котрий переходить на наступний етап ТП5 складає 8% 10,5 х 0,08 =10,5 л	0,840 кг	Вакуумна розпилювальна сушарка TP-S100 Продуктивність 10 кг/год, мінімальна температура вхідного повітря 50°C https://www.alibaba.com/product-detail/High-Quality-Lab-Vacuum-Spray-Dryer_60615046376.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_image.74264d22iMMYIn
	ТП 6. Стандартизація					
	ТП 6. Стандартизація	СП та цукристі	11 кг	Загальний	11 кг	Перемішуючий пристрій типу п’яна бочка.

		речовини (цукроза, декстроза) (для стандартизації)		відсоток втрат на етапі ТП6 складає 2% (0,840 х 0,02)+ 10,2 =11 кг		РВ -10/20. Робочий об'єм до 16 л. https://prom.ua/ua/p1067271644-mikser-pyanaya-bochka.html?product_click_token=eyJ0eXAiOiJKV1QiLCJhbGciOiJIUzI1NiJ9.eyJwcm9kdWN0SWQiOjEwNjcyNzE2NDQsImNhdGVnb3J5SWQiOjE2MTUwNSwiY29tcGFueUlkIjoyNzAxNzc3LCJzb3VyY2UiOiJwcm9tOnN1YXJjaDp0YWc6c2VycCIsImlhdCI6MTY1Mjg4MTcyNi41Njk1NTQ4LCJwYWdlSWQiOiIwMjk1Y2RiMy1lM2U1LTRhMGYtOTRmOS03ZGIyZWM4NDI0ODEiLCJwb3ciOiJ2MiIsImljcCI6dHJ1ZX0.sJd7kh7bCDI6YKbkgV6jiO90o70XdZDNMQW4Hr_LOCQ&from_spa=true
	ПМВ 7. Пакування, маркування, відвантаження					
	ТП 7. Пакування, маркування, відвантаження	Пакування, маркування, відвантаження	11 кг	Загальний відсоток втрат на етапі ТП7 складає 0%	11 кг (220 уп по 50 г)	Пакувальна машина XY-6K. Продуктивність до 50 кг/ год https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/top-10-equipment-rating/powders-in-packaging/vacuum-feeder-for-feeding-powder-xy-6k/ Маркувальна машина VKPAK продуктивність до 20 уп/хв https://hebrew.vkpacks.com/automatic-double-sides-top-bottom-sticker-labeling-machine.html

3.2. Специфікація обладнання

Таблиця 4.3

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика	Примітка
1	*2*	*3*	*4*	*5*
З-1 З-6	Збірник	2	Збірник об'ємом 1000 л з можливістю перемішування та підтримкі температури. Швидкість перемішування 10-680 об/хв. Габарити: висота-2000 мм, діаметр-1000 мм Виробник – " TOPTION" (Китай)	1
З-9		1	Збірник об'ємом 250 л з можливістю перемішування та підтримкі температури. Швидкість перемішування 10-680 об/хв. Габарити: висота-1550 мм, діаметр-600 мм Виробник – " TOPTION" (Китай)	2
Н-2 Н-4 Н-7 Н-10 Н-12	Насос відцентровий	5	**Насос відцентровий з магнітною муфтою DM 10. Продуктивність до 1-13 м3/год, температурні параметри середовища, що перекачується від +3 до +95 ºС. Виробник: «DEBEM», Італія15**	3
НЦ-3	Надцентрифуга	1	Центрифуга DHC270 з автоматичним вивантаженням осаду, робочий об'єм 500 л, продуктивність до 1500 л/год, швидкість обертання до 10200 об/хв. Виробник – "HJ" (Китай)	4
Д-5 Д-15	Ваговий дозатор	2	Ваговий дозатор для сипких та рідких продуктів Ручний та автоматичний режими роботи Максимальна вага зважування –10-200 кг **Виробник –** "АгроТех" **(Україна)**	5
УУ-8	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка MMS продуктивністю до 3 500 л/год, Нержавіюча сталь 316L. Модулі з порожнистим волокном (30 кДа), Площа мембрани 1,7 – 2,2 $м^2$ Розміри (Д х Ш х В), мм: 1400 х 1000 х 1800 Виробник – "MMS AG Membrane Systems" (Швейцарія)	6

ХК-11	Хроматографічна колона	1	Хроматограф промисловий HPC060 продуктивністю 60 л/год та номінальним тиском 100 бар, Типове сполучення колонок 6-15 см внутр Виробник – “Asahi Kasei Bioprocess” (США)	7
РС-13	Розпилювальна сушарка	1	Вакуумна розпилювальна сушарка TP-S100 Продуктивність 10 кг/год, мінімальна температура вхідного повітря 50°С Виробник – “ TOPTION” (Китай)	8
ПБ-15	П’яна бочка	1	**Перемішуючий пристрій типу п’яна бочка. РВ -10/20. Робочий об’єм до 16 л.**	9
ПМ-16	Пакувальна машина	1	Пакувальна машина XY-6K. Продуктивність до 50 уп/хв	10
МА-17	Маркувальна машина	1	Маркувальна машина VKPAK продуктивність до 20-50 уп/хв	11

Примітка:

1,2. https://russian.alibaba.com/product-detail/%D0%91%D0%B8%D0%BE-%D1%84%D0%B0%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D0%B5%D0%B2%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%BE%D0%B9-%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C-50L-100L-150L-1100008901225.html?spm=a2700.galleryofferlist.normal_offer.d_title.44e752e0hxD8Ie

3. https://www.debem.ru/catalog/nasosy-magnitnoj-muftoj/dm10/

4. https://liaoyanglongda.en.made-in-china.com/product/WXsEchyoELUP/China-DHC-China-Solid-Liquid-Separator-Continuous-Flow-Industrial-Disc-Stack-Centrifuge-Machine-with-Low-Price.html

5. https://packhouse.com.ua/ua/g16414817-dozatory-sypuchih-zhidkih

6. https://www.mmsx.com/site/assets/files/1330/sw25_pilot_system_brochure_eng.pdf

7. https://fluidmgmt.ak-bio.com/products/hplc-systems/

8.https://www.alibaba.com/product-detail/High-Quality-Lab-Vacuum-Spray-Dryer_60615046376.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_image.74264d22iMMYIn

9.https://prom.ua/ua/p1067271644-mikser-pyanaya-bochka.html?product_click_token=eyJ0eXAiOiJKV1QiLCJhbGciOiJIUzI1NiJ9.eyJwcm9kdWN0SWQiOjEwNjcyNzE2NDQsImNhdGVnb3J5SWQiOjE2MTUwNSwiY29tcGFueUlkIjoyNzAxNzc3LCJzb3VyY2UiOiJwcm9tOnNlYXJjaDp0YWc6c2VycCIsImlhdCI6MTY1Mjg4MTcyNi41Njk1NTQ4LCJwYWdlSWQiOiIwMjk1Y2RiMy1lM2U1LTRhMGYtOTRmOS03ZGIyZWM4NDI0ODEiLCJwb3ciOiJ2MiIsImljcCI6dHJ1ZX0.sJd7kh7bCDI6YKbkgV6jiO90o70XdZDNMQW4Hr_LOCQ&from_spa=true

10. https://www.minipress.ru/pharma/ukrainian/top-10-equipment-rating/powders-in-packaging/vacuum-feeder-for-feeding-powder-xy-6k/

11.https://hebrew.vkpacks.com/automatic-double-sides-top-bottom-sticker-labeling-machine.html

3.3. Опис технологічного процесу отримання субстанції серратіопептидази

ТП 1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина об'ємом 1000 л зі збірника (З-1) подається насосом (Н-2) до надцентрифуги (НЦ-3). Час центрифугування становить 30 хв при постійному охолодженні (для уникнення перегрівання ферментного розчину), кількість обертів становить 2000 об/хв. Після чого отримають відділену біомасу (50 кг) та супернатант (950 л).

ТП 2. Відділення домішок та концентрування

Отриманий попередньо розчин (950л) від (НЦ-3) подається насосом (Н-4) до збірника (З-6). Після чого через об'ємно ваговий дозатор (Д-5) додають 100 л 50 % розчину сульфату амонію (білки випадають в осад). При постійному перемішуванні 20-30 об/хв .

ТП 3. Ультрафільтрація

Після осаджування реакційної суміші об'ємом (950 л) подають через насосом (Н-7) на ультрафільтраційну уставноку (УУ-8). продуктивністю 1 $м^{3/}$год , діаметр пор 120 мкм, фільтр працює під атмосферним тиском (600 мм. рт. ст). Час фільтрування становить 30 хв. Після фільтрації зконцентрований розчин (142,5 л) вивантажують у переносну ємність (З-9) та спрямовують на іонообмінну колонку

ТП 4. Іоннообмінна хроматографія

Після ультрафільтрації розчин перекачують насосом (Н-10) до іонообмінної заповненої хроматографічної колонки (ХК-11), де відбувається очищення СП від домішок. Процес відбувається в два етапи: перший етап це взаємодія іонообмінної смоли з розчином який очищають, в кінці цього етапу СП залишається на іонообмінній смолі, а елюат в вигляді домішок зливають; другий етап це змивання СП з іонообмінної смоли 5% розчином NaOH. Отриманий елюат об'ємом 10,5 л зливають у герметичну ємність на 20 л та направляють на стадію сушіння.

ТП 5. Сушіння

Після іонообмінної хроматографія з (ХК-11) об'ємом 10,5 л направляється до вакумної розпилювальної сушарки (РС-13) за допомогою відцентрового насоса (Н-12). Повітря через фільтр і нагрівач надходить в повітряний розподільник у верхній частині сушарки, нагрітий до 50-60 °С., спірально і рівномірно подається в сушарку. Вихідна рідина в резервуарі надходить до відцентрового розпилювача у верхній частині сушарки, де розпорошується на маленькі пароподібні краплі, які при короткому контакті (не перевищує 50°С) з гарячим повітрям температурою до 60°С в прямоточному потоці швидко випаровуються і висушуються в готовий продукт за 2-5 хв.

Готовий продукт, масою 0,840 кг та вологістю 10-15%, вивантажується з нижньої частини сушильної колонки і циклонного сепаратора, відпрацьований газ при цьому виводиться витяжним вентилятором.

ТП 6. Стандартизація

Після закінчення сушіння, отриманий порошок направляється на стадартизацію до перемішуючого пристрою типу п'яна бочка (ПБ-15), туди ж додають цукристі речовини (цукроза, декстроза) через об'ємно ваговий дозатор (Д-14) для наповнення та стандартизацію кінцевого продукту (порошкоподібний цукор) (1:10).

ПМВ 7. Пакування і маркування субстанції

Після стандартизації порошок СП подають до пакувальної машини (ПМ-16) XY-6K Машина даного типу може фасувати та пакувати сипучі речовини у дози (порції) 50 г. Маркування буде проводитися машиною VKPAK (МА-17) та збиратися у картонні коробки по 4-ри штуки. Надалі картонні коробки передають на склад до карантинної зони .

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження твердих відходів

Після очищення та виділення СП залишаються тверді відходи, що представляють собою уламки клітин бактерій. Після чого необхідна обов'язкова термічна інактивація, бо *Serratia marcescens* – патогенний мікроорганізм. Тоді найбільш доцільним буде збирання та сушіння уламків клітин і використання їх в якості кормової добавки адже клітинні стінки можуть містити залишки СП, вітаміни та інші корисні речовини.

ЗВ 8.2. Знешкодження рідких відходів

Для знешкодження рідких відходів можна використати механічні методи такі як фільтрація через різні типи фільтраційних матеріалів або відстоюванням у спеціальних резервуарах. Найкращим буде комбінування цих методів для більш якісної очистки.

3.4. Контроль виробництва субстанції серратіопептидази

3.4.1. Ідентифікація очищеної серраціопептидази методом гель-електрофарез

Для ідентифікації СП використовують електрофорез білків у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE).

Механізм розділення: Електрофоретична рухливість біополімерів у гелі залежить від низки параметрів. Швидкість міграції пропорційна заряду молекули, і вільної рідини молекули з однаковим питомим зарядом мігрують з рівною швидкістю. У разі поділу в середовищі, що має жорстку просторову матрицю, відбувається сегрегація за рахунок тертя гель. Сила тертя залежить від просторової зміни молекули, зокрема її розміру. Таким чином, у разі електрофоретичного поділу нативних білків спостерігатиметься складна картина їхнього розподілу залежно від наведених вище факторів [90].

Принцип методу SDS-PAGE: метод електрофоретичного поділу білків у поліакриламідному гелі залежно від молекулярної маси. Для цього перед нанесенням на гель зразки кип'ятили в присутності додецилсульфату натрію (SDS) та 2-меркаптоетанол. Під впливом 2-меркаптоетанол відбувається відновлення дисульфідних зв'язків, що запобігає випетлювання денатурованих поліпептидів і підвищення їх рухливості. SDS є сильним

детергентом, його молекула складається з дванадцятичленного аліфатичного нерозгалуженого ланцюга та ковалентно пов'язаного з ним сульфату, що має в розчині негативний заряд [90].

Реактиви

1. **Розчин АБ для приготування гелю** (50 мл). Акриламід - 30%-ний розчин, приготовлений на 0,4%-ному розчині метиленбісакриламіду. Розчин зберігають у темній склянці у холодильнику.
2. **Буфер для приготування концентруючого гелю** (25 мл). Трис-HCl буфер, 0,625 М, що містить 0,4%-ний SDS, pH 6,8.
3. **Буфер для приготування розділяючого гелю**(50 мл). Трис-HCl буфер 1,5 М, що містить 0,4% Додецилсульфат натрію (SDS), pH=8,8.
4. **Персульфат амонію (ПСА).**10% (1 мл). Готується на день приготування гелю.
5. **ТЕМЕД**(100 мкл)**.**
6. **Розчин для виготовлення агарозного гелю.** 2%-ний розчин сагарози у електродному буфері.
7. **Електродний буфер** (500 мл). 0,025 мг трис-0,192М гліцину, що містить 0,1%-ний SDS, pH=8,3.
8. **Буфер для виготовлення проб.** Наливаємо в градуйовану колбу на 100 мл приблизно 60 мл води, в ній розчиняють 0,756 г трис котрий заздалегід відважений на аналітичних вагах та 1 г SDS, 10 мл гліцерину, 1 мг бромфенолового синього, після чого додають концентрованої HCl до pH=6,8. Перед використанням в отриманий розчин додають 5 мл β-меркаптоетанолу (у витяжній шафі). З допомогою мірної колби об'єм розчину доводять дистильовоною водою до 100 мл.
9. 12,5%-ний розчин трихлороцитової кислоти .
10. Кумассі R-250 або G-250

11. **Розчин білків-маркерів із відомою молекулярною масою.** Концентрація кожного з маркерів у суміші — 102 мкг/30 мкл. Розчин готують на буфері для виготовлення проб.

Обладнання

1. Камера для вертикального електрофорезу VE-10 у комплекті з джерелом постійного струму.
2. Комплект обладнання для формування гелю.
3. Водяна баня.
4. Центрифуга (10000g) – для білків із гомогенату тканин.
5. pH-метр.
6. Холодильна камера.
7. Хімічні колби, склянки, пластикові пробірки на 5 та 50 мл, автоматичні піпетки-дозатори регульованого об'єму одноразові шприци на 20 мл.
8. Хроматографічний або фільтрувальний папір – 0,5 аркуша.

Хід роботи

Готують та денатурують проби, для цього беруть пробу СП (1 г) насипають в хімічний стакан та додають персосульфат амонію 1 мл. Тоді додають SDS (мл). Після чого отриману суспензію центрифугують при 10 000 об/хв 15 хв (надалі працюють з надосадовою рідиною). Тоді відбирають пробу та змішують з буфером для приготування проб у співвідношенні 1: 2 або 1: 3 (за обсягом). Потім підготовлені проби та розчини білків-маркерів занурюють у киплячу воду та нагрівають 2 хв при 95 — 100 C^o.

Для подальшої роботи збирають камеру VE-10, готують і заливають гелі котрий був заздалегідь приготовлений.

У кожну кишеню гелю вносять по 30 мкл білкового розчину – проби або мітчиків. Тоді проводять електрофорез при наступній силі струму: доки зразки входять у гель – 50 мА на

блок, далі – за 80 мА. Готові електрофореграми фарбують кумасі з подальшим утворенням яскраво-синього кольору 6.1.

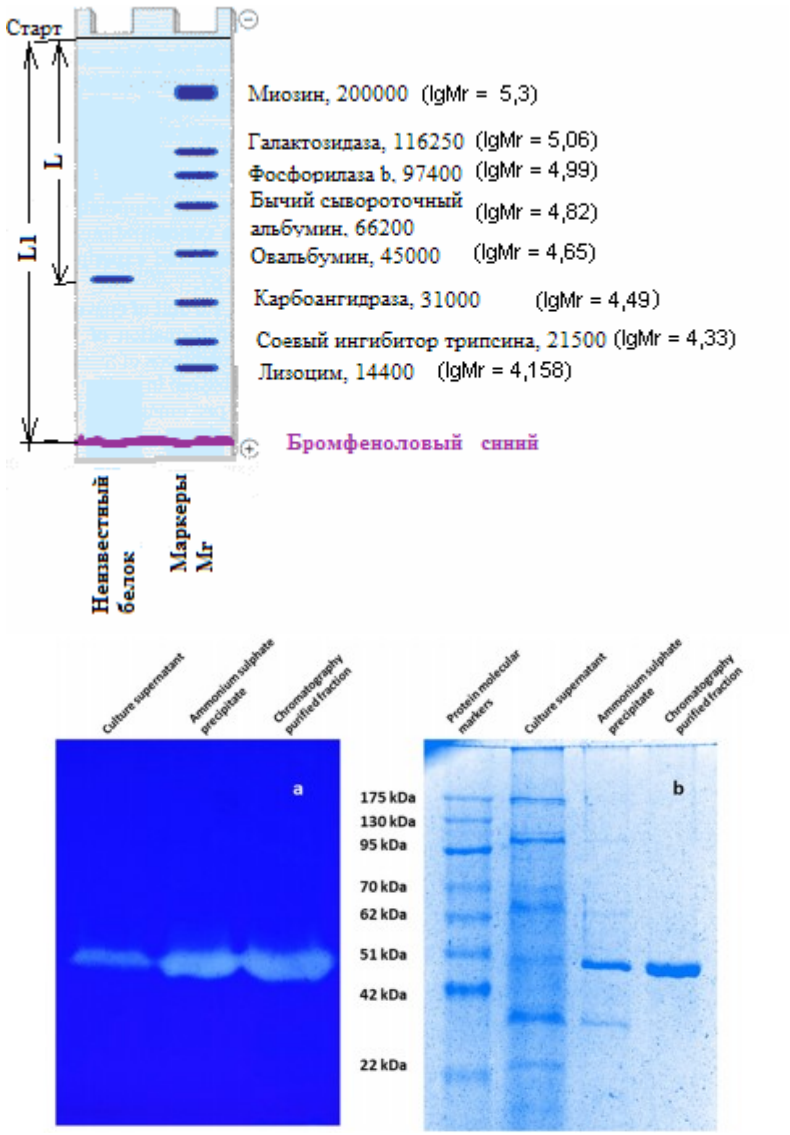


Рис. 3.1 **Електрофореграма, виявлена з використанням кумасі яскраво-синього**

Використовуючи проявлену електрофореграму розраховують відносну рухливість кожного з білків-маркерів заформулою:

Rf= L/L1,де L - відстань, пройдена від лінії старту білком (мм); L1- Відстань, пройдена від лінії старту бромфеноловим синім (мм). Потім будують графік за точками, у яких абсцис - це значення Rf, кордината – логарифм молекулярної маси певного білка маркера.

Розраховують величину Rf-досліджуваного білка. Використовуючи отриманий калібрувальний графік, знаходять спочатку логарифм молекулярної маси, а потім молекулярну масу білків, що знаходяться в пробі. (Похибка методу становить ±10%) [90].

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ ТАБЛЕТОВАНОЇ ФОРМИ СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ

4.1. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу

4.1.1. Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу та кількості серій на рік.

1 таблетка містить 10 мг серратіопептидази; Ураховуючи, що на кінцевому етапі субстанції (діючої речовини) буде отримано 11 кг слід розрахувати кількість серій виробництва ЛЗ [91].

Розрахуємо скільки можна виготовити таблеток:

В 1 таблетці міститься 10 мг (0,01 г) СП, тому:

(11 / 0,01) х 1000 = **1,1 млн таблеток**

Для таблетування таблеток двоопуклої форми масою 0,25 г використовуємо таблетперс IMA Prexima 300, із валідованою продуктивністю 94 таб/хв.

Для подальших розрахунків слід враховувати послідовність операцій підготовки обладнання перед технологічним процесом для коректного виходу на робочі параметри, котре займає 4,5 год

Припускаємо що виробництво СП буде прроводитися один раз на місяць, 5/12 (5 днів/ 12 годин) = **60 год на місяць**

Також слід врахувати 4,5 год, та 1,5 год на плановий ремонт обладннання:

60 – 4,5 – 1,5 = **54 год** – Реальний час таблетування

Розрахуємо скільки таблеток отримаємо за один робочий цикл:

54 х 60 х 94 = **304 560 таб./тиждень**

Розрахунок кількості серій:

1,1 млн / 304,56 тис = **3,62 (4) серії**

Затрати часу на отримання даної кількості таблеток становить:

60 х 3,62 = **217,2 год (220) для таблетування 1,1 млн таблеток**

4.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря).

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

Оскільки потрібно отримати стерильні гідрогелеві пов’язки для опіків, виробництво буде проводитись в приміщенні класу чистоти A/B/C.

Таблиця 4.1

Класифікація чистих зон за максимально допустимою кількістю часток у повітрі

Клас чистоти	**Максимально допустима кількість часток в 1 м^3 повітря, мкм**			
	Оснащений стан		**Функціональний стан**	
	0,5 мкм	**5 мкм**	**0,5 мкм**	**5 мкм**
A	3500	0	3500	*0*
B	3500	0	350 000	2000
C	350 000	2000	3 500 000	20 000

Продукцію необхідно виробляти в чистих зонах, доступ у які персоналу і/або надходження обладнання, сировини і матеріалів має здійснюватись через повітряні шлюзи. Чисті зони слід обслуговувати таким чином, щоб вони відповідали стандарту чистоти; в них необхідно постачати повітря, що пройшло крізь фільтри відповідної ефективності [92].

4.3. Підготовка персоналу

Санітарна підготовка виробництва забезпечує якість виробництва та його асептичні умови, безпеку праці та охорону здоров'я персоналу. Ця стадія виконується за вимогами нормативних документів, в яких описуються правила виробництва та контроль якості технологічного процесу.

У приміщеннях класу чистоти А/В варто носити стерильний брючний костюм або комбінезон, головний убір, бахіли, маску, гумові або пластикові рукавички. По можливості, варто використовувати одноразовий або спеціалізований технологічний одяг і взуття з мінімальним ворсовиділенням і пилеємністю. Нижня частина штанів повинна бути захована усередину бахил, а рукава — у рукавички.

До працюючим у чистих зонах, необхідно пред'являти високі вимоги у по відношенню до особистої гігієни і чистоти. У чистих приміщеннях не можна носити ручні годинник, ювелірні вироби, косметику.

Весь персонал (включаючи зайнятий прибиранням і технічним обслуговуванням), що працює в чистих зонах, повинний проходити систематичне навчання по предметах, що відносяться до правильного виробництва стерильних продуктів, включаючи гігієну й основи мікробіології [93].

Навчання персоналу. При влаштуванні на роботу та щорічно персонал, який безпосередньо зайнятий у виробництві, повинен пройти обов'язковий медичний огляд, або додатковий медичний огляд в разі необхідності. Пройти систематичне навчання щодо виробничого процесу, санітарно-гігієнічних вимог та дотримуватися їх.

Персонал, який працює на біотехнологічному виробництві, проходить навчання для кваліфікованого виконання своїх обов'язків. Інструктаж проводиться один раз на рік. Під час навчання детально обговорюється умови забезпечення якості продукції, підготовка та проведення технологічного процесу.

Санітарно-гігієнічна підготовкаперсоналу. Перед початком роботи і після її закінчення працівники миють руки з милом після чого обробляють їх дезінфікуючим засобом [94, 95].

4.4. Підготовка дезінфікуючих засобів

Обирати мийні та дезінфікувальні засоби потрібно ті, які зареєстровані в Україні й дозволені до використання на підприємствах фармацевтичної промисловості. При використанні мийно-дезінфекційних засобів поєднують стадії миття та дезінфекції об'єктів в одній операції. Потрібно чергувати дезінфекційні та антисептичні засоби кожні 1-3 місяці з метою запобігання розвитку та розповсюдженню стійких варіантів мікроорганізмів [95].

Оброблюваний об'єкт – промислова машинка для ополіскування, пакувальна машина, комунікації, інвентар та інше технологічне обладнання миють засобами 1 раз на тиждень.

«Біомой» – багатокомпонентний, поліфункціональний, біоактивний миючий засіб з дезінфікуючим ефектом. Робочі розчини безбарвні, не ушкоджують оброблювані вироби, і мають виражені емульгуючі й миючими властивостями, добре змиваються, не залишаючи нальоту на оброблюваних поверхнях. Біомой, належить до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007). Робочий розчин Біомою використовують протягом доби після виготовлення за умов зберігання його кольору. Допускається зберігати невикористаний робочий розчин протягом 14 діб за умов зберігання у тарі зі щільно закритою кришкою.

Робочі розчини Біомою готують у промаркованій тарі, що виготовлена із будь-яких матеріалів, шляхом розчинення у воді. Концентрація робочого розчину – 0,3% [96].

Склад: алкілбензолсульфонат натрію (сульфонол) 5,0-8,0; лужна протеаза 1,0- 1,1 (діючі речовини); натрію карбонат; диспергатор; наповнювач.

Оброблюваний об'єкт – стіни, підлога, вікна, двері, інвентар, тара. Підлогу та стіни миють пролонгованими засобами 1 раз на тиждень.

Дезінфекцію підлоги та стін будемо здійснювати зрошенням, оскільки дезінфекції підлягає велика площа. Необхідно дезінфікувати стіни та підлогу в приміщенні, яке містить промислову машинку для ополіскування, пневматичний листовий прес, ручний різальний прес, **сушильну шафу, стіл з металічними лотками для просочення антисептиком та пакувальну машину для гідрогелевих пов'язок.**

«Біолонг» – призначення для проведення поточної, профілактичної та остаточної дезінфекції на всіх об'єктах, які підлягають санітарному огляду. Належить до мало небезпечних речовин при нанесенні на шкіру (4 клас небезпеки відповідно до ГОСТу 12.1.007). Рідину можна використовувати кілька разів (не довше 5 днів, якщо рідина не змінила вигляд). Робочі розчини готують шляхом розчинення у воді. Концентрація робочого розчину – 1,0%.

Склад: бензалконію хлорид - від 8 до 14%; н-октадецил диметил пропіл амонію хлорид - від 1 до 4%, ізопропіловий спирт - 11-20% [97].

«Dez-1» – це концентрований миючий засіб з дезінфікуючим ефектом широкого спектра дії, містить активний хлор. Застосовується для видалення білкових забруднень, неприємних запахів, добре знежирює поверхні і бореться з грибком і цвіллю. Перед використання засіб необхідно збовтати. Щоденне прибирання (миття підлоги і стін) - 5 мл миючого засобу на відро води 7-8 літрів (не вимагає змивання). Генеральне прибирання (миття підлоги і стін) - від 15 до 50 мл миючого засобу на відро води 7-8 літрів (після промити чистою водою). Для боротьби з грибком і цвіллю - від 25 до 50 мл миючого засобу на 1 літр води.

Склад: вода демінералізована, гіпохлорит натрію, гідроксид натрію, 5-15% неіногенні ПАР, глюконат натрію [98].

7.5. Підготовка вентиляційного повітря

Одним з факторів, що враховується в чистому приміщенні ЧП є те, що очищуються великі об'єми повітря – кратність циркуляції що подається, відповідно до технології процесів, вироблюваних в цих приміщеннях. Це досягається застосуванням декількох ступенів очищення, причому вирішальне значення має фінішний ступінь, в якому повинні використовуватися фільтри здатні уловлювати практично всі частинки діаметром більше 0,1 мкм.

У чистих приміщеннях класу А-С використовуються однонапрямлені потоки повітря. Місця припливу і витяжки ламінарного потоку повинні, по можливості, розташовуватися один навпроти одного. Процес, що йде в горизонтальній площині варто розташовувати в зоні вертикального потоку [99].

Принципові положення, які відносяться виключно до чистих приміщень. Підвісні стелі формують простір для технологічних приміщень (технічні поверхи) де розташовані інженерні комунікації (підведення води, стерильного вентиляційного повітря, кисню, інертного захисного газу та інше). Підвісні стелі мають бути герметизовані з метою запобігання контамінації з простору над ними. Всередині чистої зони (приміщенні) припускається наявність одної відкритої комунікації – газової магістралі.

Атмосферне повітря представляє собою полідисперсний аерозоль з середнім вмістом контамінуючих речовин 5÷100 мг/м^3 (10^6 ÷10^8 часток/м^3). Для технологічних розрахунків приймають початкову концентрацію забруднень на рівні 2000 часток/м^3 з мінімальним розміром 0,3 мкм [100].

Суттєвим елементом проектування системи підготовки повітря є вибір фільтрів. Фільтр – найважливіший компонент системи очистки повітря для чистих приміщень, оскільки з його допомогою остаточно встановлюється необхідний ступінь чистоти приміщення. Триступінчасте очищення повітря

за допомогою фільтрів грубого, тонкого очищення на першому й другому ступені, відповідно, і мікрофільтрів або фільтрів абсолютно тонкого очищення на третьому ступені дозволяє досягти необхідного результату.

- Група G - фільтри грубого очищення – фільтри попередньої очистки(course dust filters);
- Група F - фільтри тонкої очистки (fine dust filters);
- Група H - фільтри (High Efficiency Particular Airfilters) HEPA;

У чистих кімнатах класів А/Б/С, як правило, використовується однонаправлений потік повітря. Це досягається установкою фільтрів HEPA/ULPA по всій площі стелі і фальшпідлоги (підлога з перфорацією). Повітря рухається вертикально від стелі до підлоги, видаляється через перфорацію у витяжну камеру під підлогою. Потім рециркуляційне повітря по периферійним рециркуляційним повітроводам знову подається в приміщення . [101].

Суттєвим елементом проектування системи підготовки повітря є вибір фільтрів. Фільтр – найважливіший компонент системи очистки повітря для чистих приміщень, оскільки з його допомогою остаточно встановлюється необхідний ступінь чистоти приміщення. Триступінчасте очищення повітря за допомогою фільтрів грубого, тонкого очищення на першому й другому ступені, відповідно, і мікрофільтрів або фільтрів абсолютно тонкого очищення на третьому ступені дозволяє досягти необхідного результату. Установка перед кожною фільтрувальною групою фільтрів більше низького щабля очищення у вигляді попереднього блоку очистки подовжує загальний термін служби основних фільтрів.

У відповідності з європейськими стандартами EN 779, EN 1822 та ДСТУ EN 1822-1-2001 фільтрувальні елементи класифікуються на групи і класи залежно від якості фільтрування (ефективності або проникності).

Застосування HEPA фільтрів вимагає створення і підтримки суворих умов режиму експлуатації: температури, вогкості, швидкості повітряного

потоку і тиску. Для виконання цих вимог доводиться вмонтовувати спеціальні системи підготовки повітря:

- системи підігріву і охолоджування повітря;
- системи зволоження і осушення повітря;
- системи контролю тиску і швидкості повітряного потоку [102].

4.6. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.

З метою захисту ТФ слід підбирати первинну упаковку за такими показниками як :

- особлисотями виготовлення;
- призначення ЛЗ ;
- фізико-хімічні характеристики;

Тому, відповідно о принципів виготовлення та типів використовуваних матеріалів, блістерні упаковки прийнято ділити на два типи: алюміній/пластик Alu-PVC, виконується методом термоформування; алюміній/алюміній Alu-Alu, холодне формування.

Обидві методики мають певні переваги та недоліки:

Переваги термоформованої блістерної упаковки:

- дозволяє докладно оглядати продукт через прозорий матеріал;
- внаслідок чого доступний подвійний контроль якості, за допомогою камери та візуальний;
- основний матеріал полотна ПВХ недорогий та зручний для термоформування;

порожнини з щільним охопленням продукту допускають використання універсальних пристроїв подачі, досить дешевих і простих в експлуатації [103].

До недоліків належать слабкі захисні властивості, низький бар'єр для проникнення вологи та кисню.

Переваги блістерів холодного формування можна перерахувати коротко. Алюміній надійно захищає від води, світла, кисню. Бар'єр

практично 100% значно збільшує термін зберігання та використання продукту.

Перелік недоліків дещо довший:

- невисока, порівняно з термоформуванням, швидкість виробництва; непрозора упаковка ускладнює контроль якості;
- підвищення вартості пропорційно до збільшення розмірів блістерної карти;
- матеріал досить дорогий;
- потрібен спеціальний пристрій подачі у зв'язку з тим, що кишеня більша за розміри продукту;
- остання обставина збільшує складність експлуатації та вартість обладнання.

Скористатися перевагами і мінімізувати недоліки дозволяє третій тип блістерної упаковки Alu-PVC-Alu, алюміній/ПВХ/алюміній.

У блістерну машину додають станцію формування тропічного алюмінію та станцію запайки. Виріб заповнюється в термоформувальній кишені або камері, що дозволяє використовувати універсальний пристрій подачі з простою експлуатацією та низькою вартістю.

Завдяки прозорості пластику, камера легко виявляє дефектні екземпляри. Алюміній холодного штампування і тропічний мають аналогічні властивості, що забезпечує надійний бар'єр для світла, кисню, води.

Основні характеристики блістерно-пакувальної машини для Alu-PVC-Alu:

- велика площа формування та ротаційне ущільнення сприяють високій швидкості;
- формувальна станція тропічного алюмінію забезпечує хорошу продуктивність;
- цьому ж сприяє велика площа запайки;

- станція перфорації перехресного типу заощаджує матеріал, обрізки до 1 мм [104].

4.7. Вибір технологічних стадії отримання води очищеної

Для вибору обладнання та установок для підготовки води фармакопейної якості потрібен вибір способу очистки. Сучасна практика виробництва орієнтована на застосування двох основних способів водопідготовки у відповідності з якими воду очищену отримують методом дистиляції або мембранного розділення демінералізованої води в дистиляційних апаратах різних конструкцій або в баромембранних апаратах.

«Вода очищена – це вода для приготування лікарських засобів, крім тих, які мають бути стерильними й апірогенними, якщо немає інших зазначень і дозволів компетентного уповноваженого органу».

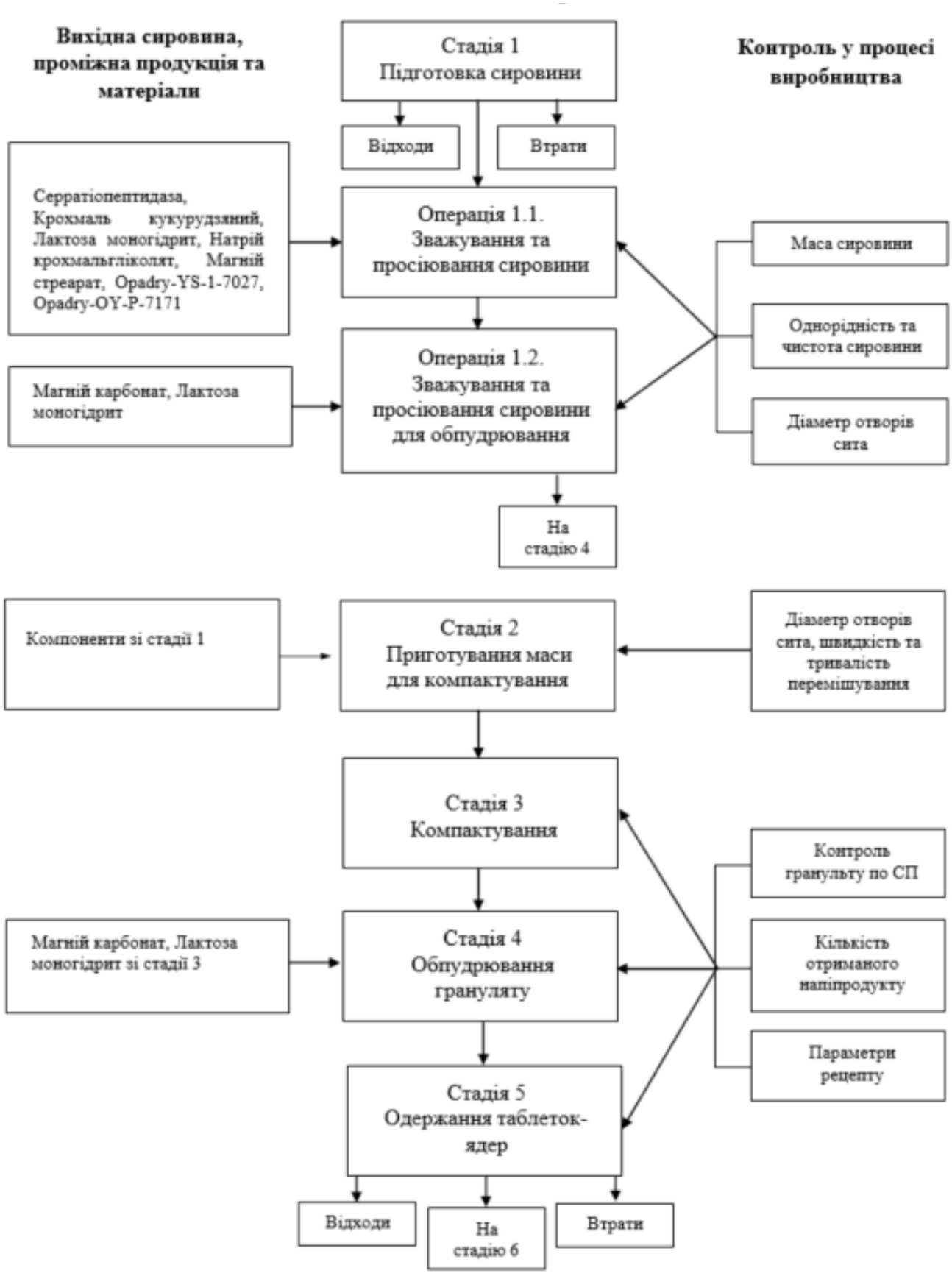
«Воду очищену одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном або будь-яким іншим підхожим способом.

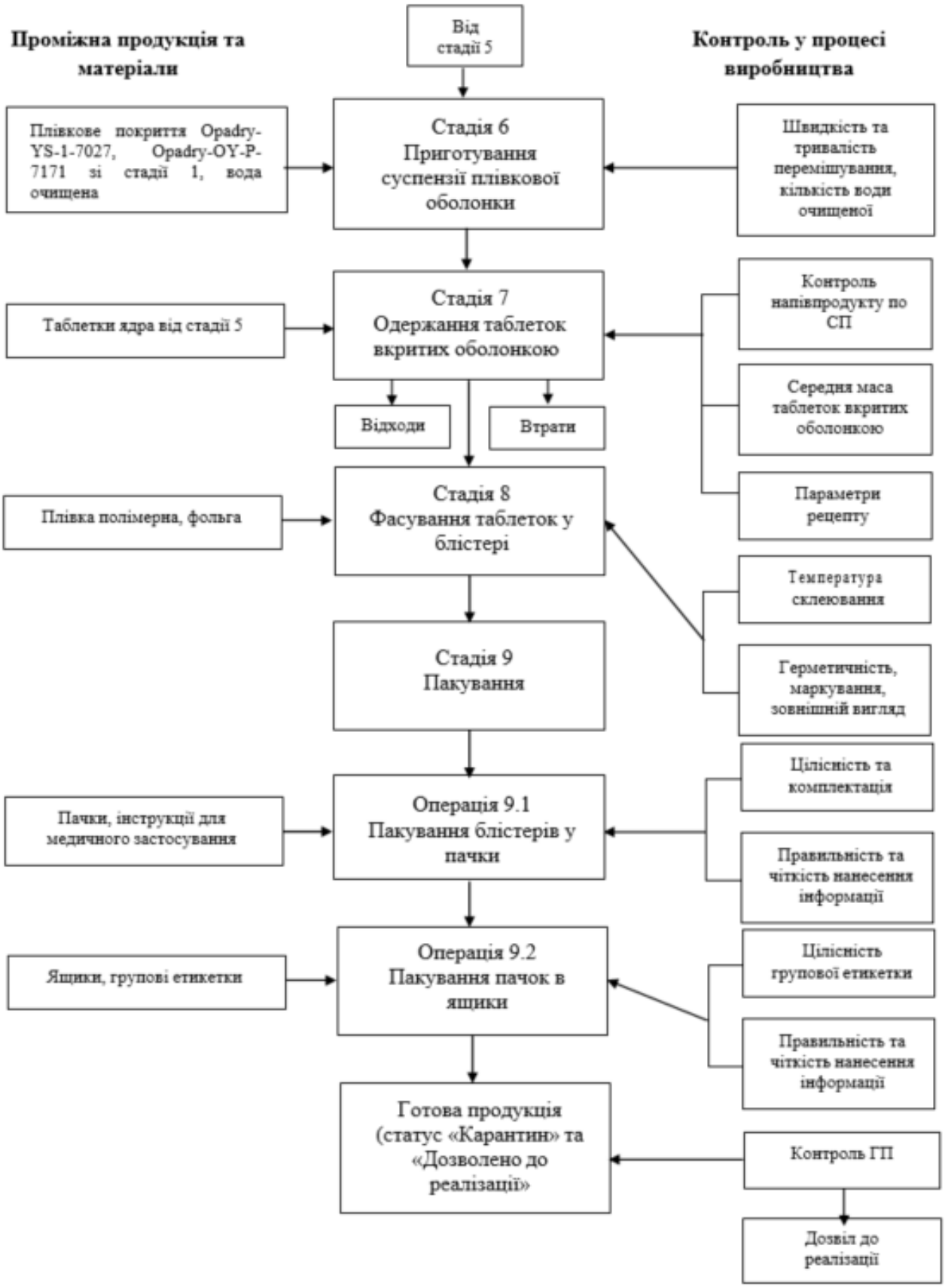
Під час виробництва і подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють підхожу попереджувальну межу і підхожу межу, що вимагає вживання заходів. У нормальних умовах підхожою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 100 життєздатних аеробних мікроорганізмів (2.6.12) в 1 мл.

4.8. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Так як планується виробляти ЛЗ на існуючій дільниці ФК “ФарКос” корпус № 5, 3 поверх. Отже планується використання існуючого обладнання із зазначеною абревіатурою. Технологічний процес отримання ТЛФ (таблеток) включає наступні стадії:

Послідовність технологічних операції


Вихідна сировина, проміжна продукція та матеріали
Стадія 1 Підготовка сировини
Контроль у процесі виробництва
Відходи
Втрати
Серратіопептидаза, Крохмаль кукурудзяний, Лактоза моногідрит, Натрій крохмальгліколят, Магній стреарат, Opadry-YS-1-7027, Opadry-OY-P-7171
Операція 1.1. Зважування та просіювання сировини
Маса сировини
Однорідність та чистота сировини
Магній карбонат, Лактоза моногідрит
Операція 1.2. Зважування та просіювання сировини для обпудрювання
Діаметр отворів сита
На стадію 4
Компоненти зі стадії 1
Стадія 2 Приготування маси для компактування
Діаметр отворів сита, швидкість та тривалість перемішування
Стадія 3 Компактування
Контроль гранульту по СП
Магній карбонат, Лактоза моногідрит зі стадії 3
Стадія 4 Обпудрювання грануляту
Кількість отриманого напівпродукту
Параметри рецепту
Стадія 5 Одержання таблеток-ядер
Відходи
На стадію 6
Втрати


Проміжна продукція та матеріали
Від стадії 5
Контроль у процесі виробництва
Плівкове покриття Opadry-YS-1-7027, Opadry-OY-P-7171 зі стадії 1, вода очищена
Стадія 6 Приготування суспензії плівкової оболонки
Швидкість та тривалість перемішування, кількість води очищеної
Таблетки ядра від стадії 5
Стадія 7 Одержання таблеток вкритих оболонкою
Контроль напівпродукту по СП
Середня маса таблеток вкритих оболонкою
Параметри рецепту
Відходи
Втрати
Плівка полімерна, фольга
Стадія 8 Фасування таблеток у блістері
Температура склеювання
Герметичність, маркування, зовнішній вигляд
Стадія 9 Пакування
Пачки, інструкції для медичного застосування
Операція 9.1 Пакування блістерів у пачки
Цілісність та комплектація
Правильність та чіткість нанесення інформації
Ящики, групові етикетки
Операція 9.2 Пакування пачок в ящики
Цілісність групової етикетки
Правильність та чіткість нанесення інформації
Готова продукція (статус «Карантин» та «Дозволено до реалізації»)
Контроль ГП
Дозвіл до реалізації

Технологічна карта виробництва ТЛФ складається з таких етапів:

Стадія 1 – підготовка сировини: операція

1.1 – зважування та просіювання сировини й операція.

1.2– зважування та просіювання сировини для обпудрювання, де контрольні точки: маса сировини, діаметр отворів сита, однорідність та чистота сировини;

Стадія 2 – приготування маси для компактування, де контрольні точки: діаметр отворів сита, швидкість та тривалість перемішування;

Стадія 3 – компактування, де контрольні точки: параметри рецепту, кількість та контроль по специфікацій отриманого грануляту;

Стадія 4 – обпудрювання грануляту, де контрольні точки: параметри рецепту, кількість отриманої таблетмаси;

Стадія 5 – одержання таблеток-ядер, де контрольні точки: внутрішньо операційний контроль (геометричні розміри, стиранність, розпад, середня вага, міцність), параметри рецепту таблетування);

Стадія 6 – приготування суспензії плівкової оболонки, де контрольні точки: швидкість та тривалість перемішування, кількість води очищеної та отриманої суспензії;

Стадія 7 – одержання таблеток вкритих оболонкою, де контрольні точки: параметри рецепту, середня вага, контроль напівпродукту по специфікації;

Стадія 8 - фасування таблеток у блістери, де контрольні точки: герметичність, маркування, зовнішній вигляд, температура склеювання;

Стадія 9 – пакування:

операція 9.1 – пакування блістерів у пачки й операція 9.2 – пакування пачок в ящики, де контрольніточки: цільність, комплектація, точність нанесеної інформації.

4.9. Матбаланс на серію таблетованої форми серратіопептидази

Для розрахунку матбалансу на серію необхідно враховувати кількість компонентів з котрих сладається таблетка. Таблетка СП (серратіопептидази) має наступний склад загальною масою 1 таблетки 0,25 г (табл):

Виробнича рецептура

Компоненти ЛЗ		Кількість (%)	Кількість (мг)	Призначення компонентів
Таблетмаса	Серратіопептидаза	4	10	діюча речовина
	Крохмаль кукурудзяний	70	175	наповнювач, розрихлювач
	Лактоза моногідрит	5	12,5	коригент смаку та запаху, обпудрювання
	Магній карбонат	4	10	зв'язувач компонентів
	Натрій крохмальгліколят	5	12,5	зв'язувач маси
	Магній стреарат	4	10	антифрикційний
Покриття таблеток	Opadry-YS-1-7027	3	7,5	покриття
	Opadry-OY-P-7171	5	12,5	покриття

З попередніх розрахунків кінцевої кількості субстанції, на сладській зоні беде зберігатися 11 кг СП (діюча речовина у теблетці).

Тобто для доцільності розрахунків необхідно проводити розрахунки від кількості отриманої діючої речовини в пропорціному співвідношенні (таб 4.1).

Компонент	Кількість (%)	Концентрація на 0,25 г таблетки (мг)	Кількість (г)
Серратіопептидаза	4	10	**11 000**
Крохмаль кукурудзяний	70	175	**192 500**
Лактоза моногідрит	5	12,5	**13 750**
Магній карбонат	4	10	**11 000**
Натрій крохмальгліколят	5	12,5	**13 750**
Магній стреарат	4	10	**11 000**
Opadry-YS-1-7027	3	7,5	**8 250**
Opadry-OY-P-7171	5	12,5	**13 750**
Загальна кількість	275 000 (275 кг)		

Розрахунок кількості отриманих таблеток:

275 000 / 0,25 = 1,1 млн таблеток.

Розрахунок річної потужності виробництва на таблетпресі IMA Prexima 300 із валідною швидкість таблетування 94 таб/хв по 0, 25 г кожна.

Тобто загальний час таблетування становить:

1 100000 / 94 = 11 702,13 хв

11 702,13 /60 = 195 год

Згідно попередніх розрахунків, кількіть серій таблетування становить 4 серії на рік для задоволення попити споживача (з подальшою перспективою для нарощення маштабів виробництва). Об'єм однієї серії становить:

1 100000 / 4 = 275 000 табл/ рік

Надійшло		**Використано**	
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	**Кількість,кг**	**Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів**	**Кількість, кг**
1	**2**	**3**	**4**
Зважування сировини, кг			
Серратіопептидаза	2,76	Серратіопептидаза	2,75
Крохмаль кукурудзяний	48,3	Крохмаль кукурудзяний	48,125
Лактоза моногідрит	3,44	Лактоза моногідрит	3,438
Магній карбонат	2,76	Магній карбонат	2,75
Натрій крохмальгліколят	3,44	Натрій крохмальгліколят	3,438
Магній стреарат	2,76	Магній стреарат	2,76

Opadry-YS-1-7027	2,1	Opadry-YS-1-7027	2,06
Opadry-OY-P-7171	3,44	Opadry-OY-P-7171	3,438
Всього:	69	**Втрати: (0,35%)**	0,241
		Всього:	68,759
Просіювання, кг			
Крохмаль кукурудзяний	48,125	Крохмаль кукурудзяний	48,1
Лактоза моногідрит	3,438	Лактоза моногідрит	3,43
Магній карбонат	2,75	Магній карбонат	2,74
Натрій крохмальгліколят	3,438	Натрій крохмальгліколят	3,43
Магній стреарат	2,76	Магній стреарат	2,75
Всього:	60,511	**Втрати: (0,1%)**	0,066
		Всього:	60,445
Стадія таблетування			
Маса для таблетування	63,195 (без покриття оболонкою)	Таблетки	62,5
Всього:	63,195	**Втрати: (1 %)**	0,695
		Всього:	62,5

Стадія покривання таблеток оболонкою			
Таблетки	62,5	Таблетки	62,4
Opadry-YS-1-7027	2,1	Opadry-YS-1-7027	2,06
Opadry-OY-P-7171	3,44	Opadry-OY-P-7171	3,438
Всього:	68,04	**Втрати: (0,2%)**	0,1422
		Всього:	67,898
Фасовка таблеток			
Таблетки	67,898	Таблетки	67,8
Матеріали: Контейнери	27 500 уп.	Матеріали: Контейнери	27 450
Всього:	27 500 уп.	**Втрати: (0,2%)**	50
		Всього:	27 450
Загальні втрати по виробництву препарату СП становить 1,85 %			

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ТАБЛЕТОВАНОЇ ФОРМИ СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ

ДР 1. Отримання води для класифікованих приміщень

ДР 1.1. Одержання води знесоленої

ДР 1.1.1 Очищення води на піщаному фільтрі

На вході тиск води питної вимірюється манометром. Вода питна проходить через сітчастий фільтр для очищення від механічних домішок, проходить лічильник для води і ще через один сітчастий фільтр для очищення від механічних домішок. Після механічної очистки вода зливається в ємність для зберігання води питної (на випадок аварійних ситуацій, що можуть трапитись в міському водоканалі) або насосом подається на гідроакумулятор . Тиск підтримується редуктором тиску і контролюється манометрами.

Вода проходить через фільтр-пісок (Ф-6) для видалення з води механічних часточок, піску, зависей, колоїдних речовин. Після фільтр-піску (Ф-6) відбирають пробу води для аналізу якості [13].

ДР 1.1.2. Очищення води на вугільному фільтрі

Після піщаного фільтру вода надходить на вугільний фільтр (Ф-7). Активоване вугілля, яке є основною складовою вугільного фільтру, завдяки високій адсорбційній здатності ефективно поглинає залишковий хлор, розчинені гази, органічні сполуки, завдяки чому поліпшуються органолептичні показники води (усувається сторонній присмак, запах, кольоровість). Для оцінки якості води відбирають проби.

ДР 1.1.3. Пом'якшення води

Після того як вода пройшла через вугільний фільтр, вода надходить на фільтр-катіоніт (Ф-8 та Ф-9) . Вода проходить через фільтр - катіоніт для зниження твердості води, а також певних кількостей заліза, марганцю, солей важких металів, органічних сполук [13].

ДР 1.2. Отримання води очищеної

ДР 1.2.1. Надходження води на фільтр тонкої очистки

Вода з первинної водопідготовки подається на фільтр тонкої очистки (Ф-11). Для запобігання утворення карбонатно-сульфатних і силікатних відкладень на мембранах фільтра в процесі концентрування додають розчин антискалянту.

ДР 1.2.2. Надходження води на установку зворотного осмосу

Пройшовши попередню очистку, вода подається на установку зворотного осмосу (ЗОУ-13) , де за рахунок насосу (Н-12) нагнітається тиск до 1-1,2 МПа. Під високим тиском вода продавлюється крізь пори мембран, які пропускають крізь себе лише молекули води, молекули інших сполук осідають на поверхні мембран, звідки змиваються в каналізацію. Тиск води перед подачею на мембрани і після її проходження через мембрани контролюється манометрами. Кількість води, що скидається в каналізацію регулюється вентилем.

ДР 1.2.3. Зберігання води очищеної

Отримана вода очищена зберігається в збірнику (ЗБ-14). Збірник та система трубопроводів утворюють циркуляційну петлю, по якій безперервно, за рахунок насосу (Н-15), рухається вода очищена, проходячи через стерилізуючі фільтри. Тиск контролюється манометром.

ДР 2. Підготовка повітря

ДР 2.1. Підготовка повітря для класифікованих приміщень

ДР 2.1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря відбувається за допомогою повітрозабірної (ПЗ-17) труби на висоті 20 метрів та під надлишковим тиском 0,01-0,03.

ДР 2.1.2. Перший ступінь очищення повітря

Фільтр грубого очищення є фільтрами першого ступеня очищеня повітря. Під час попередньої очистки частково вилучається пил, краплі вологи і деяка частина мікрооргвназмів. Коефіцієнт проскоку твердої фази примірно 5-10 мкм не більше Кп=10%. Повітря нагнітається вентилятором (В-19) приточно-витяжної установки і подає повітря на електрокалорифер (К-20), де відбувається нагрівання повітря. Тоді повітря надходить на установку в режимі охолодження - теплообмінник в приточном каналі (К-20) є випарником і охолоджує припливне повітря, а теплообмінник-конденсатор охолоджується. У свою чергу, при роботі в режимі нагріву припливний зовнішнє повітря нагрівається від теплообмінника, який в даному режимі роботи виконує функцію конденсатора. Тоді повітря надходить на паро зволожувач (П-22).

ДР 2.1.3. Другий ступінь очищення повітря

З паро зволожувача (П-22) повітря надходить на фільтр тонкої очистки (Ф-23) . Повітряний потік проходить через фільтр тонкого очищення повітря з великою активно фільтруючою поверхнею. Цим елементом уловлюються частинки розміром до 0,1 мікрона. Фільтри тонкого очищення (Ф-23) застосовуються в якості фільтрів другого ступеня очищення (доочищення). Фільтр тонкого очищення використовують для видалення 99,97 % всіх часток розміром від 0,1 - 0,3 мікрона (швидкість фільтрації – 15 – 35 м/с) . Оскільки фільтр дуже щільний, для того, щоб пропустити повітряні потоки, система повинна мати велику площу поверхні .

ДР 2.1.4. Третій ступінь очищення повітря

Фільтри HEPA є основним фільтруючим елементом. Принцип роботи HEPA фільтри досить простий: повітря вентилятором проходить через фільтр і тим самим звільняється від частинок пилу. HEPA-фільтри утворені системою волокон складної форми. Зазвичай

використовуються склопластикові волокна з діаметром від 0,5 до 2 мкм. Основні фактори, що впливають на роботу - діаметр волокна і товщина фільтра. Повітряний простір між волокнами HEPA фільтра значно більше 0,3 мкм.Відповідно для встановлення фільтра типу HEPA у класі чистоти Д встановлюють фільтри HEPA (H-25).

ТП 3. Підготовка сировини

ТП 3.1. Зважування та просіювання сировини

Перед початком процесу розрахувати кількості сировини на серію препарату. На вагах КП-В-1 та КП-В-2 в боксі біологічної безпеки зважити в окремі поліетиленові пакети *серратіопептидаза ,магній стеарат, лактоза моногідрит I порція*, ідентифікувати карткою «Підготовлена сировина». Два поліетиленових пакетизавантажити у бочку та передати на стадію 2 (до ТП 3) «Приготування маси для компактування». На вагах КП-В-2 зважити в окремий поліетиленовий пакет*крохмаль кукурудзяний*, *натрій крохмальгліколят, лактоза моногідрит II порція*, ідентифікувати карткою «Підготовлена сировина» та передати на стадію 2 (до ТП 3) «Приготування маси для компактування». На вагах КП-В-2 зважити плівкове покриття *Opadry-YS-1-7027, Opadry-OY-P-7171* та передати на стадію 6 (до ТП 7) «Приготування суспензії плівкової оболонки». Після кожного зважування сировини на вагах КП-В-1 та КП-В-2 роздрукувати чеки, на чеках вказати назву сировини, назву препарата, номер серії.

ТП 3.2. Зважування та просіювання сировини для обпудрювання

Також на вагах зважити на вагах КП-В-3 та просіяти через ручне сито ГФ-4, де діаметр пор сита 0,5 мм, в окремий поліетиленовий пакет *магній карбонат, лактоза моногідрит III порція*, ідентифікувати карткою «Підготовлена сировина» та передати на стадію 4 (до ТП 4) «Обпудрювання грануляту».

ТП 4. Приготування маси для компактування

В круглий контейнер (З-5) завантажити сировину зі стадії 1 (від ТП 2.1) ***1 порція***. Перемішати сировину в контейнері на тритураційному змішувачі (ГФ-6) до параметрів рецепту. В інший круглий контейнер завантажити ***ІІ порцію*** зі стадії 1 (від ТП 2.1). Сировину з першого круглого контейнера (З-5) перевантажити за допомогою тритураційного змішувача (ГФ-6) в другий контейнер (З-7) з *ІІ порцією*.

Сировину у контейнері перемішати на тритураційному змішувачі (ГФ-6) відповідно до параметрів рецепту. Одержану суміш з контейнера через нижній спуск за допомогою тритураційного змішувача перевантажити в бочку (З-8).

Зважити отриману масу для компактування на вагах КП-В-9 та передати на стадію 3 (до ТП 4) «Компактування».

ТП 5. Компактування

У роликовий компактор ГФ-9 завантажити підготовлену масу у бункер машини послідовно з бочки З-8. Провести компактування згідно рецепту, одержаний гранулят завантажити в контейнер З-10. Відібрати пробу грануляту та провести контроль згідно зі специфікації. Після отримання позитивного результату аналізу передати гранулят на стадію 4 (до ТП 5) «Опудрювання грануляту». Перед обпудрюванням грануляту провести ***(ІІІ порція)*** та зважити необхідну кількість.

ТП 6. Обпудрювання грануляту

В контейнер З-10 з масою завантажити з поліетиленового пакету (зі стадії 1. «Підготовка сировини») ***(ІІІ порція).*** Приєднати контейнер з масою до контейнерного змішувача ГФ-11 та перемішати за допомогою контейнерного змішувача відповідно до параметрів рецепту. Відібрати пробу таблетмаси та провести контроль згідно зі специфікації. Зважити кількість отриманої таблетмаси в контейнері на вагах. Після отримання позитивного результату аналізу таблетмасу передати на стадію 5 (до ТП 6).

«Одержання таблеток-ядер».

ТП 7. Одержання таблеток-ядер

Одержану масу таблетувати на таблетковому пресі ГФ-12 відповідно до встановлених параметрів технологічного процесу. В процесі таблетування періодично контролювати пареметри таблеток. Контроль по специфікації проводити на початку таблетування та після закінчення таблетування всієї серії. Одержані таблетки в ємкостях зважити на вагах. Після одержання позитивного результату аналізу по специфікації таблетки передати на стадію 7 (до ТП 8) «Одержання таблеток, вкритих плівковою оболонкою».

ТП 8. Приготування суспензії плівкової оболонки

Завантажити воду очищену в ємність З-15 та зважити на вагах. При перемішуванні міксером ГФ-16 завантажити в ємність з поліетиленового пакета плівкове покриття *Opadry-YS-1-7027, Opadry-OY-P-7171*. Перемішати до отримання однорідної суспензії. Отриману суспензію плівкової оболонки зважити в ємності на вагах та передати на стадію 7 (до ТП 8) «Одержання таблеток, вкритих плівковою оболонкою».

ТП 9. Одержання таблеток, вкритих плівковою оболонкою

Подати ємкість з суспензією плівкової оболонки до установки ГФ-17. Відкрити робочу камеру машини та при обертаючому барабані завантажити таблетки-ядра. Розпочати процес нанесення плівкової оболонки по параметрам рецепту. Відібрати пробу таблеток, вкритих оболонкою, для проведення контролю по специфікації. Вивантажити вкриті оболонкою таблетки в контейнери пересувні, зважити вагах. Після отримання позитивного результату аналізу нерозфасовані таблетки в ємностях або в контейнерах пересувних передати на стадію 9 (до ТП 9) «Фасування таблеток у блістери».

ТП 10. Фасування таблеток у блістери

Таблетки фасувати у блістери на термоформовочній блістерній машині ГФ-18. Перед початком фасування встановити номер серії та термін придатності препарату на маркувальному вузлі машини відповідно до

вказівок майстра, перевірити наявність дозволу на фасування, відповідність пакувальних матеріалів; контролювати температуру формування та склеювання. На початку фасування відбирати блістери на контроль герметичності. В процесі фасування контролювати заповнення чарунок таблетками, маркування та зовнішній вигляд блістерів. Блістери з таблетками по конвеєру подаються на стадію 10 (до ТП 10.1) «Пакування».

ПМВ 11. Пакування, маркування та відвантаження готової продукці

ПМВ 11.1. Пакування блістерів у пачки

Одночасно з фасуванням блістери з таблетками пакувати з інструкціями для медичного застосування в пачки на картонажній машині ГФ-18. Перед початком процесу контролювати номер серії та термін придатності, маркування пачки, відповідність реєстраційного номеру інструкції для медичного застосування, зчитування фармакоду. В процесі пакування контролювати цілісність пачки, кількість блістерів, наявність інструкції для медичного застосування, правильність та чіткість нанесення номеру серії та терміну придатності. Пачки з блістерами по конвеєру подаються на операцію 10.2 (до ТП 10.2) «Пакування пачок в ящики».

ПМВ 11.2. Пакування пачок в ящики

Перед початком роботи встановити номер серії та термін придатності препарату на маркувальному штампі. Пакування пачок в ящики проводити на машині групового пакування ГФ-19. В процесі пакування контролювати цілісність групової етикетки та ящика, правильність та чіткість нанесення номеру серії і терміну придатності препарату, комплектність пакування, кількість отриманих ящиків з готовою продукцією.

5.1. Специфікація обладнання отримання таблетованої форми серратіопептидази

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика	Примітка
1	*2*	*3*	*4*	*5*
КП-В-1 КП-В-2 КП-В-3 КП-В-9	Ваги	4	Ваги електронні, напільні/аналітичні НГЗ (кг) 1 / 60, Нм ГЗ (кг) – 0,2/0,001 . Ціна поділки, г: 20. Границі допустимої похибки, г: ±0,1. Клас точності – 4. Габаритні розміри платформи, мм: 400х566. Живлення 220 В, 50 Гц. Виробник: «Ваги AXIS Україна»	
ГФ-4	Ручне сито	1	Сита з ручні з різною пористістю. Діаметр отворів сітки: 0,5, 0,4, 1,0, 1,6, 3,0 Розміри: 370х590 мм Виробник Україна, Запоріжжя, ТОВ «Промислова спілка «Фармпром»	
З-5 З-7 З-8 З-10 З-11 З-15	Контейнер	6	Контейнер з кришкою. Діапазон об'ємів – 40-200 л Виробник Україна, Запоріжжя, ТОВ «Промислова спілка «Фармпром»	
ГФ-9	Роликовий компактор	1	Роликовий компактор-гранулятор WP-150 Продуктивність за годину до 150 кг/год Максимальна сила стискання: 20 кН/см Потужність: 8 кВт Вага : 1700 кг Виробник: «AXIS Україна»	
ГФ-12	Таблетпрес	1	IMA Prexima 300 двобічний автоматичний таблетпрес роторного типу, неперервної дії. Призначений для пресування таблеткової маси в таблетки. Виробнича потужність 122800 шт/год Двигун: електропотужність 6 кВт, оберти 940-1800 об/хв,	

			Електричне живлення 380 В, частота току 50 Гц Виробник : I.M.A. INDUSTRIA MACCHINE AUTOMATICHE S.P.A	
ЗОУ-13	Установка зворотнього осмосу	1	УЗО RO. 0.25 (продуктивністю 200-250 л/год) Потужність установки 220В/ 0,75 кВт Кількість мембран 3/ 40х40 Виробник Україна, Одеса, ТОВ «УкрАкваТех»	
ГФ-16	Перемішуючий міксер	1	V-подібний, повний об′єм ємності 650 л, матеріал внутрішніх поверхонь ємностей AISI 316L, потужність приводу електричного двигуна 3 кВт, мотор-редуктор A503 UH45 58.8S3 B3 M 3LB4 230/400-50 IP54CLF W FD, передатне число редуктора 1:96, частота обертання ємності 16 об/хв/ Виробник Україна, Запоріжжя, ТОВ «Помислова спілка «Фармпром»	
ГФ-17	Коутер	1	Машина призначена для покриття таблеток заданої форми та розмірів плівковим покриттям. Виробнича потужність 40 кг/цикл Діапазон швидкості обертів завантажувального барабану 2 ÷20 об/хв Електрична потужність основного двигуна 1,1кВт, частота току 50Гц Потужність електромотора витяжки 2,2 кВт, потужність електоромотора повітронагрівача 1,1 кВт потужність потоку повітронагрівача 1283 $м^3$/год, потужність потоку витяжки 3517 $м^3$/год, електрична напруга 380В, кількість фаз - 3 фази. Виробник : Zhejiang Jiangnan Parmaceutical Machinery, Co. Ltd., China	
ГФ-18	Блістерна машина	1	DPP-250, Частота вирубки: 6-50 тактів/хв. Загальна потужність: 6,0 кВт., 380 В. Стиснене повітря – 0,4 – 0,6 MPa, >0,36 $м^3$/хв. Габаритні розміри, мм: 3000х730х1600 Виробник: Zhejiang Jiangnan Parmaceutical Machinery, Co. Ltd., China	
ГФ-19	Машина для групової упаковки	1	DCF-240, Автоматична машина призначена для фасування у групову упаковку Виробнича потужність 40-60 пак./хв Електроживлення 220В, частота току 50Гц Потужність двигуна 625 Вт Виробник : Zhejiang Jiangnan Parmaceutical Machinery, Co. Ltd., China	
Ф-6	Фільтр-пісок	1	Фільтр-пісок з пропускним об’ємом 50 л/хв Зернистість матеріалу: 0,42 – 2 мм Коефіцієнт неоднорідності: 1,72 Щільність прилягання матеріалу: 0,8-2 г/$см^3$	1

			Виробник – “ Birm ” (Україна)	
Ф-7	Вугільний фільтр	1	Вугільний фільтр ORGANIC FS-10-TC з продуктивністю до 600 л/год Зернистість матеріалу: 0,4 Тип живлення: 220 В/ 50Гц Щільність прилягання матеріалу: 0,4 г/см^3 Виробник – “ МЗК ” (Україна)	2
Ф-8 Ф-9 Ф-11	Фільтр-катіоніт/ Фільтр тонкої очистки	3	Фільтр-катіоніт Фіпа І-0,7 з вбудованим фільтром тонкої осичтки та продуктивністю до 700 л/год Зернистість матеріалу: 0,1 Тип живлення: 220 В/ 50Гц Щільність прилягання матеріалу: 0,25 г/см^3 Виробник – “ Organic ” (Україна)	3
З-14	Збірник	1	Збірник об’ємом 2000 л Габарити: висота-3550 мм, діаметр-2600 мм Виробник – “ TOPTION” (Китай)	4
Н-7 Н-10 Н-12 Н-15	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий з магнітною муфтою DM 10. Продуктивність до 1-13 м3/год, температурні параметри середовища, що перекачується від +3 до +95 ºС. Виробник: «DEBEM», Італія15	5
В-19	Вентилятор	1	Вентилятор подачі повітря, NWS-100 800W 1800 м3/год, Потужність вентилятора, 800 Вт Струмінь повітря, м3/год 1800 м3/год Частота обертання двигуна: 2200-4400 об/хв Напруга: 220 В ~ 50 Гц	
К-20	Електрокалорифер	1	Електрокалорифер МС-2, Продуктивність нагрівання повітря до 2000 м^3/год складається з алюмінієвих пластин, до яких приєднуються мідні трубки діаметром 9,52 мм, вага теплообмінника 15 кг	
ПЗ-17	Повітрезабірник	1	Обладнаний металевою решіткою для видалення механічних часток	
К-21	Теплообмінник	1	Теплообмінник Shuft WHR 700x400-2 він складається з алюмінієвих пластин, до яких приєднуються мідні трубки діаметром 9,52 мм, витрати повітря 1500-4500 м^3	

			/ год, витрати води 1,33-3,31 $м^3$ / год, вага теплообмінника 10,8 кг	
П-22	Зволожувач	1	Теплообмінник-зволожувач Friulair AFR 21 (Італія)) продуктивністю 2100 л/хв., Робочий тиск 15 бар, Габаритні розміри (мм) - 850х300х815х595х430	
Ф-23	Фільтр тонкої очистки	1	Фільтр ФВК клас F9, фільтруючий матеріал поліестер, Е = 99,0 % (розмір пор 1-3 мкм) Корпус – оцинковна сталь, Початковий опір повітря – 70 Па, Кінцевий опір повітря – 450 Па, Розміри фільтра (мм) – 287х490	
Н-25	Фільтр HEPA	1	Фільтр ФВК клас F6, фільтруючий матеріал мельблоун (поліестер + спанбонд), Е = 99,99 % (розмір пор 0,05-0,2 мкм) Корпус – оцинковна сталь, Початковий опір повітря – 10 Па, Кінцевий опір повітря – 100Па, Розміри фільтра (мм) – 287х490	

Список джерел на виробників

1. https://aquawater.com.ua/p744993881-filtruyuschij-material-birm.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiAh9qdBhAOEiwAvxIok1_Kdh7-h_ip0Gz7I2_CGKB6vzIGodLAsOdh4AyBfyQOoMgcdOXF1xoCSmoQAvD_BwE

2. https://filter.ua/ua/shop/bytovaya_voda/magistralnye/ot_khlora_i_organiki/organic_fs-10-tc_sistema_sorbcionnoy_ochistki_aktivirovannyy_ugol.html

3. https://prom.ua/ua/p1319921028-filtr-ionitnyj-pervoj.html?&primelead=MS44NzU

РОЗДІЛ 6. ПРОЕКТ АНД НА ВИПУСК СЕРРАТІОПЕПТИДАЗИ У ФОРМІ ТАБЛЕТОК

Рис. 11.1 Серратіопептидаза ЛЗ

Таблетка покриті оболонкою кишковорозчинною, по 10 мг, 30 шт.

Склад на одну таблетку.

Діючі речовини: Серратіпептидаза (*serratiopeptidase*) 10 мг

Допоміжні речовини: лактози моногідрат, крохмаль кукурудзяний, магнію карбонат легкий, натрію крохмальгліколят (тип А), магнію стеарат, покриття Opadry-YS-1-7027 (передоболонка на основі пластифікатора (поліетиленгліколю)), покриття Opadry-OY-P-7171 (покриття на основі ребепразолу)

Фармакологічні властивості

Фармакодинаміка. Серратіопептидаза є протеолітичним ферментом, який виділено із непатогенної кишкової бактерії *Serratia marcescens AD-W2*. Їй властива фібринолітична, протизапальна та проти набрякова активність. Крім зменшення запального процесу, серратіопептидаза послаблює біль внаслідок блокування вивільнення больових амінів із запалених тканин.

Серратіопептидаза зв’язується у співвідношенні 1:1 з альфа-2-макроглобуліном крові, який маскує її антигенність, але зберігає її ферментативну активність. Потім поступово у місці запалення вона переходить в ексудат і відповідно її рівень у крові зменшується.

Серратіопептидаза безпосередньо зменшує дилатацію (розширення) капілярів і контролює їх проникність завдяки гідролізу брадикініну, гістаміну та серотоніну. Також серратіопептидаза блокує інгібітори плазміну, сприяючи таким чином фібринолітичній активності плазміну. Завдяки зменшенню набряку і покращенню мікро циркуляції серратіопептидаза сприяє виділенню мокротиння.

Ферментативна активність препарату в 10 разів вища, ніж у α-хімотрипсину. Він дуже ефективно гідролізу є медіатори запалення полі пептидної природи (брадикінін) фібрин, але не має значного впливу на білки живого організму, такі як альбумін та α- та γ-глобулін. Препарат не розщеплює фібриноген, тому не має значного впливу на процеси згортання крові.

Препарат добре проникає в місця запалення, лізує некротизовані тканини та продукти їх розпаду, зменшує гіперемію та прискорює проникнення й активність антибіотиків. Препарат зменшує в’язкість слини та виділень із носа, цим самим полегшуючи їх видалення.

Фармакокінетика. Препарат проходить через шлунок у незміненому вигляді та абсорбується в кишечнику. Максимальна концентрація в плазмі досягається через 1 годину. Серратіопептидаза в незначній кількості виявляється в сечі [84].

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Назва показника	Допустимі межі	Методи контролю
1. Опис	Таблетки, білого або білувато-жовтого кольору, плоскоциліндричної форми, без риски..	За п.1 АНД, візуально
2. Ідентифікація	Для ідентифікації СП використовують електрофорез білків у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE).	За п.2 АНД
3. Середня маса	Від 0,570 до 0,630 г	За п.3, ДФУ 2.9.5
4. Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу	Лікарський засіб витримує випробування, якщо не більше двох індивідуальних мас відхиляються від середньої маси на величину, яка не перевищує ± 5.0 %. При цьому жодна індивідуальна маса не має відхилятися від середньої маси на величину ± 10 %	За п.4, ДФУ 2.9.5
5. Стиранність	Не більше 3.0 %	За п.5 ДФУ 2.9.7
6. Втрата в масі при висушуванні	Не більше 0.5 %	За п.6 ДФУ 2.2.32

Продовження специфікації

7. Стійкість до роздавлювання	Не менше 50 Н	За п.7 ДФУ 2.9.8
8. Однорідність вмісту	Препарат має витримувати вимоги зазначені в ДФУ 2.9.40	За п. 9 ДФУ 2.9.6
9. Мікробіологічна чистота	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у г. Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1г, *Pseudomonas aureginosa* в 1г, *Staphylococcus aureus* в 1г препарату.	За п.10, ДФУ, 2.6.12, N; 5.1.4, N

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Таблетки білого або білувато-жовтого кольору, плоскоциліндричної форми, без риски. Діаметр таблетки (10±0,3)мм, висота (4,5±0,5)мм, маса таблетки (0,60±0,03)г.

2. Ідентифікація.

2.1. Ідентифікація серратіопептидази у таблетці методом гель-електрофорез

Для ідентифікації СП використовують електрофорез білків у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE).

Механізм розділення: Електрофоретична рухливість біополімерів у гелі залежить від низки параметрів. Швидкість міграції пропорційна заряду молекули, і вільної рідини молекули з однаковим питомим зарядом мігрують з рівною швидкістю. У разі поділу в середовищі, що має жорстку просторову матрицю, відбувається сегрегація за рахунок тертя гель. Сила тертя залежить від просторової зміни молекули, зокрема її розміру. Таким чином, у разі

електрофоретичного поділу нативних білків спостерігатиметься складна картина їхнього розподілу залежно від наведених вище факторів [12] [106].

Принцип методу SDS-PAGE: метод електрофоретичного поділу білків у поліакриламідному гелі залежно від молекулярної маси. Для цього перед нанесенням на гель зразки кип'ятили в присутності додецилсульфату натрію (SDS) та 2-меркаптоетанол. Під впливом 2-меркаптоетанол відбувається відновлення дисульфідних зв'язків, що запобігає випетлювання денатурованих поліпептидів і підвищення їх рухливості. SDS є сильним детергентом, його молекула складається з дванадцятичленного аліфатичного нерозгалуженого ланцюга та ковалентно пов'язаного з ним сульфату, що має в розчині негативний заряд.

Реактиви

1. **Розчин АБ для приготування гелю** (50 мл). Акриламід - 30%-ний розчин, приготовлений на 0,4%-ному розчині метиленбісакриламіду. Розчин зберігають у темній склянці у холодильнику.
2. **Буфер для приготування концентруючого гелю** (25 мл). Трис-HCl буфер, 0,625 М, що містить 0,4%-ний SDS, pH 6,8.
3. **Буфер для приготування розділяючого гелю**(50 мл). Трис-HCl буфер 1,5 М, що містить 0,4% Додецилсульфат натрію (SDS), pH=8,8.
4. **Персульфат амонію (ПСА).**10% (1 мл). Готується на день приготування гелю.
5. **ТЕМЕД**(100 мкл)**.**
6. **Розчин для виготовлення агарозного гелю.** 2%-ний розчин сагарози у електродному буфері.
7. **Електродний буфер** (500 мл). 0,025 мг трис-0,192М гліцину, що містить 0,1%-ний SDS, pH=8,3.
8. **Буфер для виготовлення проб.** Наливаємо в градуйовану колбу на 100 мл приблизно 60 мл води, в ній розчиняють 0,756 г трис котрий заздалегідь відважений на аналітичних вагах та 1 г SDS, 10 мл гліцерину,

1 мг бромфенолового синього, після чого додають концентрованої HCl до pH=6,8. Перед використанням в отриманий розчин додають 5 мл β-меркаптоетанолу (у витяжній шафі). З допомогою мірної колби об'єм розчину доводять дистильовоною водою до 100 мл.

9. 12,5%-ний розчин трихлороцитової кислоти .

10. Кумассі R-250 або G-250

11. Розчин білків-маркерів із відомою молекулярною масою. Концентрація кожного з маркерів у суміші — 102 мкг/30 мкл. Розчин готують на буфері для виготовлення проб.

Обладнання

- Камера для вертикального електрофорезу VE-10 у комплекті з джерелом постійного струму.

- Комплект обладнання для формування гелю.

- Водяна баня.

- Центрифуга (10000g) – для білків із гомогенату тканин.

- pH-метр.

- Холодильна камера.

- Хімічні колби, склянки, пластикові пробірки на 5 та 50 мл, автоматичні піпетки-дозатори регульованого об'єму одноразові шприци на 20 мл.

- Хроматографічний або фільтрувальний папір – 0,5 аркуша [85].

Хід роботи

Готують та денатурують проби, для цього беруть таблетку (середня вага 0,25 г) розтирають та насипають в хімічний стакан та додають персосульфат амонію 1 мл. Тоді додають SDS (мл). Після чого отриману суспензію центрифугують при 10 000 об/хв 15 хв (надалі працюють з надосадовою рідиною). Тоді відбирають пробу та змішують з буфером для приготування проб у

співвідношенні 1: 2 або 1: 3 (за обсягом). Потім підготовлені проби та розчини білків-маркерів занурюють у киплячу воду та нагрівають 2 хв при 95 — 100 C^o.

Для подальшої роботи збирають камеру VE-10, готують і заливають гелі котрий був заздалегідь приготовлений.

У кожну кишеню гелю вносять по 30 мкл білкового розчину – проби або мітчиків. Тоді проводять електрофорез при наступній силі струму: доки зразки входять у гель – 50 мА на блок, далі – за 80 мА.

Готові електрофореграми фарбують кумасі з подальшим утворенням яскраво-синього кольору

Використовуючи проявлену електрофореграму, розраховують відносну рухливість кожного з білків-маркерів заформулою:

$$Rf= L/L1,$$

де L - відстань, пройдена від лінії старту білком (мм);

L1- Відстань, пройдена від лінії старту бромфеноловим синім (мм). Потім будують графік за точками, у яких абсцис - це значення Rf,

кордината – логарифм молекулярної маси певного білка маркера.

Розраховують величину Rf-досліджуваного білка. Використовуючи отриманий калібрувальний графік, знаходять спочатку логарифм молекулярної маси, а потім молекулярну масу білків, що знаходяться в пробі. (Похибка методу становить ±10%) [84]..

3. Середня маса. Середню масу таблеток визначають зважуванням 20 таблеток з точністю до 0,001г. Масу окремих таблеток визначають зважуючи окремо кожну таблетку з точністю до 0,001г. Відхилення

окремої таблетки допускається в межах ± 5% від середньої маси таблеток. Середня маса таблетки від 0,570 до 0,630 г.

4. **Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу**.

Допустимі відхилення в індивідуальній масі таблеток

20 одиниць дозованого лікарького засобу відбирають за статистично обгрунтованою схемою, зважують кожну окремо і розраховують середню масу. Лікарський засіб витримав випрбування, якщо не більше двох індивідуальних мас відхиляються від середньої маси на величину, яка перевищує значення, зазначене у *табл.2.10*. При цьому жодна індивідуальна маса не має відхилятися від середньої маси на величину, що у 2 рази перевищує значення, зазначене в *Табл. 2.11* [104].

Таблиця 2.11.

Лікарська форма	Середня маса	Припустиме відхилення, %
Таблетки (без оболонки і покриті плівковою оболонкою)	80 мг і менше	10
	Більше 80мг, але менше 250 мг	7,5
	250мг і більше	5

5. **Стиранність**. 10 знепилених таблеток зважують з точністю до 0,001г та поміщають в барабан апарату на 5 хв з швидкістю 20 об/хв (100 оборотів барабану). Потім таблетки знепилюють та зважують. Міцність визначають за формулою у відсотках.

$M=100-((m_0-m_1)/m_0*100)$

Міцність повинна бути не менше 97% [54, 105].

6. **Втрата в масі при висушуванні.** У зважений, попередньо висушений бюкс поміщають наважку і проводять висушування. Речовину сушать до постійної маси або протягом часу зазначеного в окремій статті. Висушування проводять у сушильній шафі [104] .

7. **Стійкість до роздавлювання.** Випробування дозволяє визначити стійкість таблеток до розавлювання за певних умов шляхом вимірювання

сили, необхідної для руйнування таблеток.

Обладнання. Прилад являє собою два розташовані один проти одного затискачі, один із яких може переміщуватися в напрямку до другого. Площини поверхонь затискачів перпендикулярні напрямку прямування. Здавлюючі поверхні затискачів мають бути плоскими і перевищувати за розміром зону контакту з таблеткою.

Методика. Таблетку поміщають між затискачами, беручи до уваги й форму, а також розділювальну лінію і напис, якщо вони є. Для всіх вимірів таблетка має бути орієнтованою однаково стосовно напрямку сили, що прикладається. Виміри проводять для 10 таблеток. Перед кожним виміром ретельно видаляють усі фрагменти попередньої таблетки.

Подання результатів. Необхідно зазначати середнє, мінімальне і максимальне значення виміряної сили в ньютонах.

8. Однорідність вмісту діючої речовини в таблетках.

Вміст діючої речовини у кожній таблетці повинен бути 650 ОД. У 10 одиниць, визначених за Розрахунково-ваговим методом або Методом прямого визначення, кількість діючої речовини знаходиться в межах 85.0 - 115.0 % від зазначеного в розділі "Склад", а відносне стандартне відхилення не перевищує 6.0 %. Якщо хоча б в одній одиниці дозованого лікарського засобу вміст діючої речовини виходить за межі 85.0 - 115.0 %, але при цьому в усіх одиницях знаходиться в межах 75.0 - 125.0 % від зазначеного у розділі "Склад", або якщо відносне стандартне відхилення перевищує 6.0 %, або порушені одночасно обидві умови, слід піддати аналізу додаткові 20 одиниць дозованого лікарського засобу. Вимоги ОВДР вважаються виконаними, якщо не більш як в одній одиниці з 30 вміст діючої речовини виходить за межі 85.0 -1 15.0 % і при цьому в усіх одиницях знаходиться у межах 75.0 - 125.0 %, а відносне стандартне відхилення для 30 одиниць не перевищує 7.8 % [104,106].

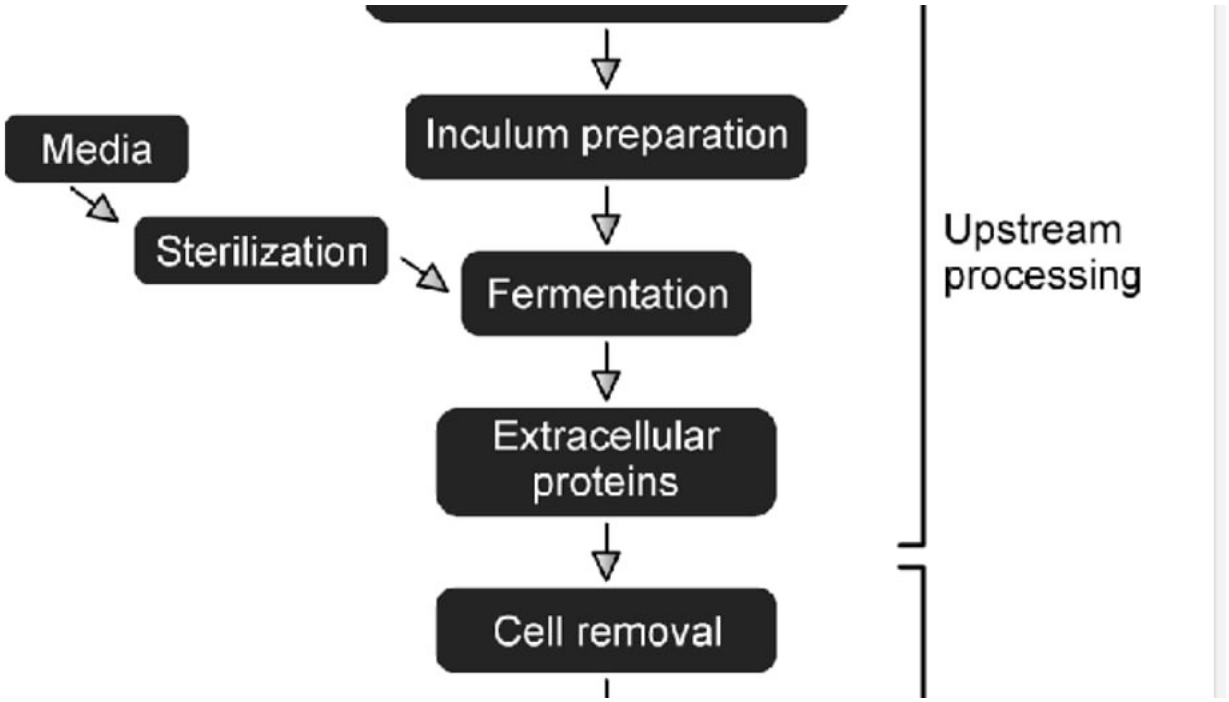
9. Мікробіологічна чистота.

У чашки Петрі діаметром 9 см вносять від 15 до 20 мл розплавленого щільного поживного середовища для вирощування бактерій(грибів), із температурою близько 45°С дають загуснути. При використанні більших чашок використовують більший об'єм живильного середовища. Підсушують чашки, наприклад у ламінарному струмені стерильного повітря або у термостаті. Точно відміряний об'єм зразка (не менше 0,1 мл), розподіляють по поверхні живильного середовища. Для кожного розведення використовують не менше двох чашок Петрі з кожним живильним середовищем. Посів інкубують при температурі від 30°С до 35°С (від 20°С до 25°С для грибів) протягом 5 діб, якщо вірогідні результати випробувань не будуть одержані за короткий час. Відбирають чашки відповідні одному розведенню, для якого кількість колоній на чашці Петрі не перевищує 300 (100 колоній для грибів). Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній і визначають число колоніє утворюючих одиниць у грамі або мілілітрі.

Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у г або мл. Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1г, *Pseudomonas aureginosa* в 1г, *Staphylococcus aureus* в 1г препарату [107] .

Додатки

Додаток 1



Додаток 2

2.5.1 Concentration of serratiopeptidase enzyme

Serratiopeptidase is extra-cellular product. Mycelium is separated by three methods

[3] High speed centrifugation, fermentation broth was centrifuged at 5000 rpm and supernatant was decanted.

[4] Ceramic microfiltration.

[5] Hollow fiber micro filtration system.It gives better filtration rate. The filtrate was concentrated by subjecting it to ultrafiltration system having 5 k dalton cut of membrane.

Concentrated broth was analyzed by Enzymatic assay.

Додаток 3

Продуценти серапептидази – фермент комплексної дії

Валентин Подолянчук, Вікторія Красінько
Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. В останні кілька десятиліть ферменти різної дії стрімко почали використовувати у терапевтичних цілях: лікуванні онкологічних захворювань, патологій серцево-судинної системи, для подолання дефіциту ферментів в організмі та як альтернативні протизапальні препарати. Наразі ведуться активні дослідження саме із ферментом серапепептидазою, яка проявляє комплесну дію при COVID-19 таку як: протизапальна, фібринолітична та муколітична. Основними продуцентоми з яким ведуться активні дослідження: Serratia marcescens AD-W2, Bacillus amyloliquefaciens KJ10, Bacillus subtilis I-2 [1-3].

Матеріали і методи. Культивування мікроорганізму здійснюють нарізних поживних середовищах. Також проаналізовано подальші перспективи використання мікроорганізму [1].

Результати. При аналізі продуцентів порівнювалася активність цільового продукту відносно собівартості собі затрат при отриманні. найбільш високі показники активності ферменту має штам Serratia marcescens AD-W2 (57 256 од/мл), у той час як в Serratia marcescens (sp.) KG-2-1 та Bacillus amyloliquefaciens KJ10 258 од/мл та 3940 од/мл відповідно. Штам Bacillus subtilis I-2 має нижчу активність ферменту (900 од/мл) ніж Bacillus amyloliquefaciens KJ10.

Тривалість культивування штамів Serratia marcescens AD-W2– становить 72 години; Serratia sp. KG-2-1культивують впродовж 24 годин, Bacillus amyloliquefaciens KJ10 і Bacillus subtilis I-2 потрібно культивувати протягом 72 та 12 годин відповідно [3]. Узагальнююча порівняльна характеристика наведена в табл.

Таблиця. **Порівняння методів отримання полілактату**

Быологічний агент	Умовна вартість за одиницю активності (грн/од)	Продуктивність синтезу ферменту (од/год)
Serratia marcescens	0,000098	795,2

AD-W2		
Bacillus amyloliquefaciens KJ10	0,0014	6,61
Bacillus subtilis I-2	0,0068	75

Висновок. Проаналізовано, що доцільність культивування штаму Serratia marcescens AD-W2, більш рентабельно за рахунок найвищої активність ферменту 57 256 од/мл та дешевому поживному середовище.

Література

1 Devtulya C.C., Jasmine K. K. , Diksha K.V.. Mehedi H.S., Mohd J. D. and Asha C. P. Purifcation and characterization of thermoactive serratiopeptidase from Serratia marcescens AD-W2. doi: 10.1186/s13568-021-01223-7.

2. Taneja, K., Bajaj, B. K., Kumar, S., & Dilbaghi, N. (2017). Production, purification and characterization of fibrinolytic enzyme from Serratia sp. KG-2-1 using optimized media. 3 Biotech, 7(3). doi:10.1007/s13205-017-0808-4

3. Rajaselvam, J., Benit, N., Alotaibi, S. S., Rathi, M. A., Srigopalram, S., Biji, G. D., & Vijayaraghavan, P. (2021). In vitro fibrinolytic activity of an enzyme purified from Bacillus amyloliquefaciens strain KJ10 isolated from soybean paste. Saudi Journal of Biological Sciences doi:10.1016/j.sjbs.2021.04.061

Список використаних джерел

1. Безрукавий Д.В., Владімірова Л.П., Ларінцева Н.В., Огурцов О.М. одержання ферментних препаратів лікарського призначення біотехнологічним шляхом. ISSN 2222-2944

http://www.kpi.kharkov.ua/archive/microcad/2019/%D0%A1%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F_11_%D1%871/%D0%A2%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D1%81%D1%8B%20%D1%81%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B0%20%D1%87%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%8C%202_2019_%D0%9A.%D0%9C-207.pdf

2. Дехтяренко Н.В. виробництво ферментних препаратів в Україні. УДК 663.15. Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2013р. http://prombiotech.kpi.ua/materials/Dekhtiarenko/NVKPI_2013.pdf

3. Бухало А.С., Дуган О.М., Максимюк М.Р., Ліновицька В.М., Ферментативна активність вищого базидіального гриба *Schizophyllum Commune.* 2012 р http://prombiotech.kpi.ua/materials/Lynovitska/NAU_2012.pdf

4. Проекти // Технопарк “Хемо-Поль”. 2009 - 2013 р. http://chemopol.com.ua

5. Абрагамович О.О., Файник А.Ф., Павлик С.С., Перепелиця М.В., Сороківський М.С., Нечай О.В., Файни О.А. Переносимість та ефективність лікування небіловололом хворих на гострий інфаркт міокарда. Київ- 2019р. https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2016_164_akn_gksbezst.pdf
6. Вовк Т.Б., Кравченко Н.К., Остапченко Л.І., Вплив Ig G сироватки крові хворих на системний червоний вовчак на потенційну активність антитроьбіну III та плазміногена. УКД 577.112;612.115 https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/med-chem/article/download/1893/1806/7254
7. Шляховенко В.О., Самойленко О.А., Вербиненко А.В., Стаховський Е.О. Активність рибонуклеаз як можливий діагностичний і прогностичний маркер раку переміхурової залози. Онкологія – 2021р, № 4 Т23. DOI: 10.32471/oncology.2663-7928.t-23-3-2021-g.9665 https://www.oncology.kiev.ua/wp-content/uploads/2021/10/1591.pdf?upload=
8. Сильников. В.НКонструируем рибонуклеазы. Ножницы-ферменты. Харкив- 2008. Том 19, №1. https://scfh.ru/papers/konstruiruem-ribonukleazy-nozhnitsy-fermenty//
9. Романовська І.І., Декина С.С., Севастьянов О.В., Рогожа Л.О. Таблеточные смеси, содержащие иммобилизованный лизоцим и кверцетин: получение, свойства. УДК 577.15 (088.8). ISSN 2410-681X. Медицинская и клиническая химия. Одеса - 2017. Т. 19. №2 DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2017.v0.i2.7966
10. Абатуров О.Є., Агафонова О.О, Токарєва Н.М., Застосування препарату лізоциму й декваліній хлориду в лікуванні гострих респіраторних захворювань верхніх дихальних шляхів у дітей. 2018;13(6):576-584. doi: 10.22141/2224-0551.13.5.2018.143163
11. Карєвіна В.В., Волошина І.М., Способи одержання ферментного препарату лізоциму. УКД 663.15+577.15. НУХТ -2012р. http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/10476/1/Text8.pdf

12. Український медичний часопис. Энзимотерапия Воспалительных Заболеваний. Серрапептаза. Ревматологійний журнал №1. 2009 р.(друковане видання) http://z-l.com.ua/ua/article/90&summary

13. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанець Л.Д. особливості росту і біосинтезу особливості росту і біосинтезу еластази мутантним варіантом еластази мутантним варіантом Bacillus SP. 27+88ELS. УДК 577.152.34:577.151., біотехнологія,Т.4,№3,2011р. http://biotechnology.kiev.ua/storage/2011/%233_2011/Matseluk%233_2011.pdf

14. Amadasi A, Bertoldi M, Contestabile R, et al. Pyridoxal 5' - phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. Curr Med Chem 2007;14(12):1291–1324. https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004406

15. Rossi JJ, Sarver N. RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. Trends Biotechnol 1990;8(7):179–183. https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jvi.67.4.1840-1847.1993

16. Malshe PC. Orally administered serratiopeptidase: can itwork? J Assoc Physicians India 1998;46(5):492. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S181808761630160X

17. American Diabetes A (2010) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 33(Suppl 1):S62–S69 https://doi.org/10.2337/dc10-S062

18. Carter PJ, Lazar GA (2018) Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit'. Nat Rev Drug Discov 17(3):197–223. doi: 10.1038/nrd.2017.227. https://www.mdpi.com/2073-4468/10/2/13/htm

19. Helms V (2008) Principles of computational cell biology: from protein complexes to cellular networks. Wiley, Weinheim, pp 39–59 https://www.twirpx.com/file/2905125/ ISBN 978-3-527-33358-5.

20. Kallemeijn WW, Scheij S, Hoogendoorn S et al (2017) Investigations on therapeutic glucocerebrosidases through paired detection with fluorescent

activitybased probes. PLoS One 12(2):e0170268 https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170268

21. Agrawal V, Bal M (2012) Strategies for rapid production of therapeutic proteins in mammalian cells. Bioprocess Int 10(4):32–48. http://www.bioprocessintl.com/multimedia/archive/00177/BPI_A_121004AR09_O_177993a.pdf

22. Allied_Market_Research (2018) Specialty enzymes market is expected to reach $947.5 million, globally, by 2020. Accessed 17 Aug 2018 https://www.alliedmarketresearch.com/pressrelease/specialty-enzymes.html

23. O'Brien, S. H. Contraception-Related Venous Thromboembolism in Adolescents / S. H. O'Brien // Semin Thromb Hemost. – 2014. – Vol. 40 (1).– P. 66–71. DOI: 10.1055/s-0033-1363469

24. S L Wong, R Ye, and S Nathoo. Engineering and production of streptokinase in a Bacillus subtilis expression-secretion system. PMCID: PMC201342, PMID: 8135514. 1994 Feb; 60(2): 517–523. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201342/

25. Hitosugi M, Hamada K, Misaka K. Effects of Bacillus subtilis var. natto products on symptoms caused by blood flow disturbance in female patients with lifestyle diseases. 20 January 2015 Volume 2015:8 Pages 41—46 doi.org/10.2147/IJGM.S76588 https://www.dovepress.com/effects-of-bacillus-subtilis-var-natto-products-on-symptoms-caused-by--peer-reviewed-fulltext-article-IJGM

26. Burova L.A, Gavrilova E. B. Pigarevsky P.A, Totolian A.A. Role of streptokinase in experimental poststreptococcal glomerulonephritis. FSBSI "Institute of Experimental Medicine", Saint-Petersburg, Russia. doi.org/10.15789/2220-7619-ARO-1594

27. Satoh S., Takakura K., Yamasaki T., Orii Y., Hatta T., Takizawa N., Kiyohara H. Isolation and characterization of an extracellular serine protease with strong fi brinolytic activity from Bacillus subtilis CIR110 and its immobilization onto

cellulose beads // Bulletin of the Okayama University of Science. A. Natural Science. – 1997. – 21, N 33. – P. 105–115. doi: 10.1007/s10295-005-0260-z.

28. Rouhani M., Valizadeh V, Molasalehi S, Norouzian D. Production and Expression Optimization of Heterologous Serratiopeptidase. May; 49(5): 931–939. PMID: 32953681 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7475616/

29. D.L. Newton, L.H. Stockwin, S.M. Rybak, Anti-CD22 Onconase: preparation and characterization, Methods Mol. Biol. 525 (2009) 425–443. doi: 10.1007/978-1-59745-554-1_22

30. E.M. Glinka, E.F. Edelweiss, A.M. Sapozhnikov, S.M. Deyev, A new vector for controllable expression of an anti-HER2/neu mini-antibody-barnase fusion protein in HEK 293T cells, Gene 366 (2006) 97–103. doi: 10.1016/j.gene.2005.06.042.

31. Houser-Scott, F., Xiao, S., Millikin, C. E., Zengel, J. M., Lindahl, L., & Engelke, D. R. (2002). Interactions among the protein and RNA subunits of Saccharomyces cerevisiae nuclear RNase P. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(5), 2684–2689. doi:10.1073/pnas.052586299 https://www.pnas.org/content/99/5/2684

32. Аликин Ю.С., Подгорный В.Ф., Лебедев Л. Р., Азаев М. Ш. Способ получения двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсрнк) из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae.№ 216.013.684F.2014* https://edrid.ru/rid/216.013.684f.html

33. Аликин Ю.С., Подгорный В.Ф., Лебедев Л. Р., Азаев М. Ш. Способ получения двуспиральной рибонуклеиновой кислоты (дсрнк) из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae.№ 216.013.F322.2014* https://edrid.ru/rid/216.012.f322.html

34. Ti Cai, Jason Aulds, Tina Gill, Michael Cerio and Mark E. Schmitt. Genetics. The Saccharomyces cerevisiae RNase Mitochondrial RNA Processing Is Critical for Cell Cycle Progression at the End of Mitosis. July 1, 2002 vol. 161 no. 3 1029-1042 https://www.genetics.org/content/genetics/161/3/1029.full.pdf

35. Лі Хуан С., Хуан П.Л., Сан Ю., Кунг Х.Ф., Блайт Д.Л., Чен Х.К. (1999) Proc. Natl. акад. наук. США 96, 2678–2681.
36. Фузетті, Ф., Меллер, Х.В., Х'юстон, Д., Розбум, Х.Дж., Дейкстра, Б.В., Бут, RG, Aerts, JM, and Aalten, DM (2002) J. Biol. хім. 227, 2537.
37. Sun Yat-sen University, Cladribine in combination with GAP in patients with refractory / recurrent acute lymphoblastic leukemia. https://ichgcp.net/ru/clinical-trials-registry/NCT03318419
38. Zalewska-Szewczyk B, Gach A, Wyka K, Bodalski J, Młynarski W. The cross-reactivity of anti-asparaginase antibodies against different L-asparaginase preparations. Clin Exp Med. 2009;9(2):113–116. doi:10.1007/s10238-008-0026-9
39. Woo MH, Hak LJ, Storm MC, et al. Hypersensitivity or development of antibodies to asparaginase does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 2000;18(7):1525–1532. doi:10.1200/jco.2000.18.7.1525
40. Müller H-J, Beier R, Löning L, et al. Pharmacokinetics of native Escherichia coli asparaginase (Asparaginase medac) and hypersensitivity reactions in ALL-BFM 95 reinduction treatment. Br J Haematol. 2001;114(4):794–799. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.03009.x\
41. Irwin PA. Medical utility of extremophiles. In: Extremophiles: from biology to biotechnology. Ed. by Durvasula R, DV Subba Rao. Boca Raton: CRC Press, 2018; p. 315-40. https://www.routledge.com/Extremophiles-From-Biology-to-Biotechnology/Durvasula-Rao/p/book/9780367572327
42. Ca´novas D, Vargas C.,1 laszlo n. Csonka,2 Ventosa A., Osmoprotectants in Halomonas elongata: High-Affinity Betaine Transport System and Choline-Betaine Pathway. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Dec. 1996, p. 7221–7226 https://core.ac.uk/download/pdf/51400959.pdf
43. Л. Н. Ананьина. Генетика. Филогенетическое положение галотолерантного штамма *Brevibacterium sp*. U1, выделенного из засоленной почвы, в системе рода Brevibacterium doi: 10.17072/1994-9952-

2019-4-459-463.https://www.readcube.com/articles/10.17072%2F1994-9952-2019-4-459-463

44. Maryam Rouhani, Vahideh Valizadeh, Sara Molasalehi, and Dariush Norouzian.Iran J. Public Health. Production and Expression Optimization of Heterologous Serratiopeptidase PMCID: PMC7475616. PMID: 32953681. 2020 May; 49(5): 931–939.s https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7475616/

45. Rouhani, Valizadeh, Molasalehi. Production and Expression Optimization of Heterologous Serratiopeptidase. ran J Public Health, Vol. 49, No.5, May2020, pp.931-939 https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/15488/6915

46. Ishihara Y, Kitamura S, Takaku F. Experimental studies ondistribution of cefotiam, a new betalactam antibiotic, in the lung and trachea of rabbits. II. Combined effects withserratiopeptidase. Jpn J Antibiot 1983;36(10):2665–2670.DOI:10.1055/s-0039-1699041

47. Al-Khateeb T.H., Nusair Y. (2008) Effect of the proteolytic enzyme serrapeptase on swelling, pain and trismus after surgical extraction of mandibular third molars. Int. J. Oral Maxillofac. Surg., 37(3): 264–268. doi: 10.1016/j.ijom.2007.11.011

48. Gupta, P. V., Nirwane, A. M., Belubbi, T., & Nagarsenker, M. S. (2017). Pulmonary delivery of synergistic combination of fluoroquinolone antibiotic complemented with proteolytic enzyme: A novel antimicrobial and antibiofilm strategy. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 13(7), 2371–2384. doi:10.1016/j.nano.2017.06.011

49. Jadhav, S. B., Shah, N., Rathi, A., Rathi, V., & Rathi, A. (2020). Serratiopeptidase: Insights into the therapeutic applications. Biotechnology Reports, 28, e00544. doi:10.1016/j.btre.2020.e00544

50. K. Murugesan, K. Sreekumar, B. Sabapathy, Comparison of the roles of Serration peptidase and dexamethasone in the control of inflammation and trismus following impacted third molar surgery, Indian J. Dent. Res. 23 (2012) 709–713. doi: 10.4103/0970-9290.111243.

51. Health Benefits of Serrapeptase. In this article. https://www.webmd.com/diet/health-benefits-serrapeptase#1
52. Зайко Н.Н. Ензимотерапія запальних захворювань. 2016. https://ua.waykun.com/articles/enzimoterapija-zapalnih-zahvorjuvan.php
53. Panagariya A, Sharma AK. A preliminary trial of serratiopeptidase in patients with carpal tunnel syndrome. J Assoc Physicians India 1999;47(12):1170–1172. PMID: 11225219 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11225219/
54. Han, H., Ma, Q., Li, C., Liu, R., Zhao, L., Wang, W., et al. (2020). Profiling Serum Cytokines in COVID-19 Patients Reveals IL-6 and IL-10 Are Disease Severity Predictors. Emerg. Microbes Infect. 9 (1), 1123–1130. doi:10.1080/22221751. 2020.1770129
55. Безрукавий Д.В., Владімірова Л.П., Ларінцева Н.В., Огурцов О.М. одержання ферментних препаратів лікарського призначення біотехнологічним шляхом. ISSN 2222-2944 http://www.kpi.kharkov.ua/archive/microcad/2019/%D0%A1%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F_11_%D1%871/%D0%A2%D0%B5%D0%B7%D0%B8%D1%81%D1%8B%20%D1%81%D0%B1%D0%BE%D1%80%D0%BD%D0%B8%D0%BA%D0%B0%20%D1%87%D0%B0%D1%81%D1%82%D1%8C%202_2019_%D0%9A.%D0%9C-207.pdf
56. Дехтяренко Н.В. виробництво ферментних препаратів в Україні. УДК 663.15. Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2013р. http://prombiotech.kpi.ua/materials/Dekhtiarenko/NVKPI_2013.pdf
57. Бухало А.С., Дуган О.М., Максимюк М.Р., Ліновицька В.М., Ферментативна активність вищого базидіального гриба *Schizophyllum Commune.* 2012 р http://prombiotech.kpi.ua/materials/Lynovitska/NAU_2012.pdf
58. Проекти // Технопарк “Хемо-Поль”. 2009 - 2013 р.http://chemopol.com.ua

59. Altay O., Mohammadi E., Lam S., Turkez H., Boren J., Nielsen J., et al. (2020). Current Status of COVID-19 Therapies and Drug Repositioning Applications. iScience 23 (7). doi: 101303. 10.1016/j.isci.2020.101303
60. Han, H., Ma, Q., Li, C., Liu, R., Zhao, L., Wang, W., et al. (2020). Profiling Serum Cytokines in COVID-19 Patients Reveals IL-6 and IL-10 Are Disease Severity Predictors. Emerg. Microbes Infect. 9 (1), 1123–1130. doi:10.1080/22221751. 2020.1770129
61. Ishihara Y, Kitamura S, Takaku F. Experimental studies ondistribution of cefotiam, a new betalactam antibiotic, in the lung and trachea of rabbits. II. Combined effects withserratiopeptidase. Jpn J Antibiot 1983;36(10):2665–2670. DOI:10.1055/s-0039-1699041
62. Український медичний часопис. Энзимотерапия Воспалительных Заболеваний. Серрапептаза. Ревматологійний журнал №1. 2009 р.(друковане видання). http://z-l.com.ua/ua/article/90&summary
63. Rossi JJ, Sarver N. RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. Trends Biotechnol 1990;8(7):179–183. https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jvi.67.4.1840-1847.1993
64. Rouhani, Valizadeh, Molasalehi. Production and Expression Optimization of Heterologous Serratiopeptidase. ran J Public Health, Vol. 49, No.5, May2020, pp.931-939 https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/15488/6915
65. Connors J. M., Levy J. H. (2020). COVID-19 and its Implications for Thrombosis and Anticoagulation. Blood 135 (23), doi: 2033–2040. 10.1182/blood.2020006000
66. Subathra D. C., Shah A, Suraj K N, Jemimah N. S., Mohanasrinivasan V, Vaishnavi B., Studies on Growth Kinetics of Serratia marcescens VITSD2 and Optimization of Fermentation Conditions for Serratiopeptidase Production. Volume 13 , Issue 2 , 2014.10.2174/1871523013666140627120717
67. K. Murugesan, K. Sreekumar, B. Sabapathy, Comparison of the roles of Serration peptidase and dexamethasone in the control of inflammation and

trismus following impacted third molar surgery, Indian J. Dent. Res. 23 (2012) 709–713.
doi: 10.4103/0970-9290.111243.

68. E.M. Glinka, E.F. Edelweiss, A.M. Sapozhnikov, S.M. Deyev, A new vector for controllable expression of an anti-HER2/neu mini-antibody-barnase fusion protein in HEK 293T cells, Gene 366 (2006) 97–103. doi: 10.1016/j.gene.2005.06.042.

69. Taneja, K., Bajaj, B. K., Kumar, S., & Dilbaghi, N. (2017). Production, purification and characterization of fibrinolytic enzyme from Serratia sp. KG-2-1 using optimized media. 3 Biotech, 7(3). doi:10.1007/s13205-017-0808-4

70. Цент здоровя МОЗ України. Серцево-судинні захворювання — головна причина смерті українців. висновки з дослідження глобального тягаря хвороб у 2019 році. https://phc.org.ua/news/sercevo-sudinni-zakhvoryuvannya-golovna-prichina-smerti-ukrainciv-visnovki-z-doslidzhennya

71. КНП ХОР Обласний центр громадського здоров'я. http://khocz.com.ua/29-veresnja-2021-roku-vsesvitnij-den-sercja/

72. І. А. Кравченко. Способи введення лікарських засобів в організм. Астропринт.- 2009.- 178 с. Електронний ресурс. ISBN 978-966-190-128-4 https://www.researchgate.net/publication/280698205_SPOSOBY_VVEDENIA_LEKARSTVENNYH_PREPARATOV_V_ORGANIZM

73. Шевченко О. М., Погребняк О. В. Фізико – хімічні та технологічні аспекти розробки сублінгвальних таблеток. Сучасні проблеми науки та освіти. - 2015. - № 2 (частина 2) Електронний ресурс.https://www.researchgate.net/profile/Fatima-Serebryanaya/publication/337603031_MORPHOMETRIC_SIGNS_HEDYSARUM_DAGHESTANICUM_RUPR_EX_BOISS_I_HEDYSARUM_CAUCASICUM_MBIEB_GROWING_IN_THE_NORTH_CAUCASUS_P_87-94/links/5ddfc6d3299bf10bc32da571/MORPHOMETRIC-SIGNS-HEDYSARUM-DAGHESTANICUM-RUPR-EX-BOISS-I-HEDYSARUM-

CAUCASICUM-MBIEB-GROWING-IN-THE-NORTH-CAUCASUS-P-87-94.pdf

74. Dash, A., Singh, S. and Tolman, J. (2014). Pharmaceutics – Basic Principles and Application to Pharmacy Practice. USA: Academic Press. Electronic resource. https://www.pharmapproach.com/advantages-and-disadvantages-of-powders/

75. Dash, A., Singh, S., & Tolman, J. (2014). Pharmaceuticals - basic principles and application in pharmacy practice. USA: Academic Press. Electronic resource.https://pdc.wisc.edu/pharmaceuticalsciences/?utm_source=google&utm_medium=search&utm_campaign=pdc_pharma&utm_content=pharma_add_responsive&gclid=Cj0KCQjw166aBhDEARIsAMEyZh5ZI05HEBOFIOpBS1691hXC5RZ36Ej_sACep2rLWyaDT_kkTlPzTWYaAg9QEALw_wcB

76. Ghosh, T. and Justy, B. (2005). Theory and practice of modern pharmaceuticals. USA: CRC Press LLC. Electronic resource. https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/9780203644478/theory-practice-contemporary-pharmaceutics-tapash-ghosh-bhaskara-jasti

77. Altay O., Mohammadi E., Lam S., Turkez H., Boren J., Nielsen J., et al. (2020). Current Status of COVID-19 Therapies and Drug Repositioning Applications. iScience 23 (7). doi: 101303. 10.1016/j.isci.2020.101303

78. Chang D., Lin M., Wei L., Xie L., Zhu G., Dela Cruz C. S., et al. (2020). Epidemiologic and Clinical Characteristics of Novel Coronavirus Infections Involving 13 Patients outside Wuhan, China. Jama 323 (11). doi: 1092–1093. 10.1001/jama.2020.1623

79. Connors J. M., Levy J. H. (2020). COVID-19 and its Implications for Thrombosis and Anticoagulation. Blood 135 (23), doi: 2033–2040. 10.1182/blood.2020006000

80. Cummings M. J., Baldwin M. R., Abrams D., Jacobson S. D., Meyer B. J., Balough E. M., et al. (2020). Epidemiology, Clinical Course, and Outcomes of Critically Ill Adults with COVID-19 in New York City: a Prospective Cohort

Study. The Lancet 395 (10239), doi: 1763–1770. 10.1016/S0140-6736(20)31189-2

81. Новіков В.П., Сидоров Ю.І., Швед О.В. Тенденції розвитку комерційної біотехнології // Вісник НАН України. – 2008. – Т. 4, № 2. – С. 25–39. Електронний ресурс. http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?I21DBN=LINK&P21DBN=UJRN&Z21ID=&S21REF=10&S21CNR=20&S21STN=1&S21FMT=ASP_meta&C21COM=S&2_S21P03=FILA=&2_S21STR=vnanu_2008_2_3
82. Taneja, K., Bajaj, B. K., Kumar, S., & Dilbaghi, N. (2017). Production, purification and characterization of fibrinolytic enzyme from Serratia sp. KG-2-1 using optimized media. 3 Biotech, 7(3). doi:10.1007/s13205-017-0808-4
83. Devtulya C.C., Jasmine K. K. , Diksha K.V.. Mehedi H.S., Mohd J. D. and Asha C. P. Purifcation and characterization of thermoactive serratiopeptidase from Serratia marcescens AD-W2. doi: 10.1186/s13568-021-01223-7.
84. Rajaselvam, J., Benit, N., Alotaibi, S. S., Rathi, M. A., Srigopalram, S., Biji, G. D., & Vijayaraghavan, P. (2021). In vitro fibrinolytic activity of an enzyme purified from Bacillus amyloliquefaciens strain KJ10 isolated from soybean paste. Saudi Journal of Biological Sciences. doi:10.1016/j.sjbs.2021.04.061
85. Bajaj, B. K., Singh, S., Khullar, M., Singh, K., & Bhardwaj, S. (2014). Optimization of fibrinolytic protease production from Bacillus subtilis I-2 using agro-residues. Brazilian Archives of Biology and Technology, 57(5), 653–662. doi:10.1590/s1516-8913201402132
86. Subathra D. C., Shah A, Suraj K N, Jemimah N. S., Mohanasrinivasan V, Vaishnavi B., Studies on Growth Kinetics of Serratia marcescens VITSD2 and Optimization of Fermentation Conditions for Serratiopeptidase Production. Volume 13 , Issue 2 , 2014. 10.2174/1871523013666140627120717
87. Цент здоровя МОЗ України. Серцево-судинні захворювання — головна причина смерті українців. висновки з дослідження глобального тягаря хвороб у 2019 році. https://phc.org.ua/news/sercevo-sudinni-zakhvoryuvannya-golovna-prichina-smerti-ukrainciv-visnovki-z-doslidzhennya

88. КНП ХОР Обласний центр громадського здоров'я. http://khocz.com.ua/29-veresnja-2021-roku-vsesvitnij-den-sercja/
89. ZAXID.NET. https://zaxid.net/vaktsinatsiya_vid_covid_19_ukrayina_statistika_shheplen_na_sogodni_n1515040
90. Стручкова И.В.; Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. Основная образовательная программа 020400.62. Електронний ресурс. http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Struchkova_Kalyasova.pdf
91. Мережа аптек. Сератта, табл. 10 мг. https://sanitas.ua/product/2654
92. Класифікація виробничих приміщень. Фармацевтична енциклопедія, 2022. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen
93. Вимоги до персоналу, що працює у чистих приміщеннях виробництва стерильних лікарських засобів, 2020. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://studfile.net/preview/12528977/page:32/
94. 146. Професійна підготовка, перепідготовка та підвищення кваліфікації працівників. Види професійного навчання кадрів, 2020. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://ips.ligazakon.net/document/DG080606
95. 147. Конспект лекцій з дисципліни «Асептика біотехнологічних виробництв» освітньопрофесійної програми другого (магістерського) рівня вищої освіти зі 179 спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укл.: Головей О.П., Гуляєв В.М. – Кам'янське, ДДТУ, 2017 р., 140 с
96. 148. Біомой методичні вказівки (інструкція по застосуванню), 2021. Електронний ресурс [Режим доступу]:

https://dezmed.com.ua/instruktsiia/item/biomoj-metodicheskie-rekomendatsii-instruktsiya-po-primeneniyu/

97. Дезінфікуючий засіб Biolong с моющими свойствами 1 л, 2022. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://epicentrk.ua/ua/shop/dezinfitsiruyuschee-sredstvo-biolong-s-moyuschimi-svoystvami-1-l.html?gclid=Cj0KCQjwzZj2BRDVARIsABs3l9KP4U6G-HBIcDUUklZicsLUcxj5IpZcB8uPYCxoFf2TlbsLVHipD60aAuGQEALw_wcB

98. Миючий засіб DEZ-1, 2022. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://primaterra.ua/ua/p1079212558-moyuschee-sredstvo-dlya.html?gclid=Cj0KCQjwzZj2BRDVARIsABs3l9JtC2ZcNf2fAtHfchReVbSPx834KlWCVT5VHezfqahpFCvrj7WfdDUaAhdREALw_wcB

99. Варіанти організації потоків вентиляційного повітря, що використовуються для приміщень різних класів чистоти, 2020. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://studfile.net/preview/12528977/page:34/#77

100. 152. Підготовка стерильного вентиляційного повітря для чистих приміщень, 2018. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://studfile.net/preview/7443252/page:51/

101. 153. Схеми очистки повітря у виробництві лікарських засобів, 2018. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://studfile.net/preview/7443252/page:54/

102. 154. Типи фільтрів, 2018. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://studfile.net/preview/7443252/page:53/

103. Pharmaceutical Aluminum Foil, 2022. Електронний ресурс [Режим доступу]: https://gyjaluminium.com/product/pharmaceutical-aluminum-foil/?gclid=CjwKCAiAyfybBhBKEiwAgtB7fgNPLmDrv1bLD1cfhDq766dWHsse1IW5RuxbTkc36CrJVhKJgmdBohoCZDEQAvD_BwE

Алси Фартех. Блистерная упаковка Alu-PVC-Alu. Електронний ресурс [Режим доступу]: **https://alsi-ft.ru/press-center/news/blisternaya-upakovka-alu-pvc-alu/**

104. Maryam Rouhani, Vahideh Valizadeh, Sara Molasalehi, and Dariush Norouzian.Iran J. Public Health. Production and Expression Optimization of Heterologous Serratiopeptidase PMCID: PMC7475616. PMID: 32953681. 2020 May; 49(5): 931–939.s https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7475616/

105. Connors J. M., Levy J. H. (2020). COVID-19 and its Implications for Thrombosis and Anticoagulation. Blood 135 (23), doi: 2033–2040. 10.1182/blood.2020006000

106. Rossi JJ, Sarver N. RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. Trends Biotechnol 1990;8(7):179–183. https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jvi.67.4.1840-1847.1993

107. Rouhani, Valizadeh, Molasalehi. Production and Expression Optimization of Heterologous Serratiopeptidase. ran J Public Health, Vol. 49, No.5, May2020, pp.931-939 https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/15488/6915