

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

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

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

« » лютого 2024р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

« » лютого 2024р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології» та
біоінженерія»

(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»
на тему: «Біотехнологія протипаразитарних засобів мікробного
походження»

Виконав: здобувач 2 курсу, групи ЗФБ 2-2М

СТЕПАНЕНКО Іванна Юрївна

(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович

(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент Тетяна ПАРХОМЕНКО

(прізвище та ініціали)

(підпис)

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

Здобувач

(підпис)

Київ - 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(код і назва) (назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СТЕПАНЕНКО Іванни Юрївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологія протипаразитарних засобів мікробного походження

керівник роботи проф., д.т.н. Стабніков В.П.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 914-к

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2024

3. Вихідні дані до роботи Біологічний агент: *Saccharomyces cerevisiae*.
Продукт: артемізинін.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Літературний огляд. Техніко-економічне обґрунтування. Обґрунтування післяферментаційних процесів. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях. Специфікація обладнання. Опис технологічної схеми. Контроль виробництва субстанції для ЛЗ. Обґрунтування вибору технологічної схеми. Опис продукту згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу Технологічна схема: 1 аркуш формату А3. Апаратурна схема: 1 аркуш формату А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Літературний огляд	01.11.2023 - 10.11.2023	
2.	Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для лікарського засобу	09.11.2023-16.11.2023	
3.	Обґрунтування післяферментаційних процесів	17.11.2023-22.11.2023	
4.	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	23.11.2023 – 29.11.2023	
5.	Специфікація обладнання	30.11.2023-07.12.2023	
6.	Опис технологічної схеми	08.12.2023 – 15.12.2023	
7.	Контроль виробництва субстанції для ЛЗ	14.12.2023 – 19.12.2023	
8.	Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання протипаразитарного засобу	20.12.2023 – 25.12.2023	
9.	Опис протигельмінтного засобу згідно АНД	26.12.2023 – 01.01.2024	
10.	Графічна частина	02.01.2024 – 08.01.2024	
11.	Оформлення роботи та списку літератури	09.01.2024 - 20.01.2024	

Здобувач

_____ (підпис)

Іванна СТЕПАНЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Віктор СТАБНІКОВ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем виділення артемізіну після культивування *Saccharomyces cerevisiae*. Потужність виробництва речовини для лікування малярії становить 0,223 кг/рік. Артемізинін - це лікарська речовина, яка використовується в лікуванні малярії. Вона відноситься до класу антималярійних препаратів і головною фармакологічною властивістю артемізиніну є його здатність ефективно боротися з паразитом *Plasmodium*, що викликає малярію.

За даними ВООЗ загальна кількість хворих на малярію у світі за 2021 рік становить 230 млн хворих. Зрозуміло що в африканських та латино-американських регіонах доступ до дешевих ліків низький через низький рівень життя, тому для розрахунку річної потреби розглянемо саме цей регіон, тому звернемо увагу на Латинську Америку. Згідно відкритих даних ВООЗ кількість випадків малярії за 2021 рік близько 1.1 млн випадків.

Враховуючи, що в світі є виробники артемізиніну в тому числі основна частина отримується з рослини *Artemisia annua*, тому ми зможемо забезпечити близько 10% від потреби в артемізинінові для лікування малярії, а це 22 кг.

У роботі викладено обґрунтування післяферментаційних процесів виробництва артемізіну як діючої речовини протипаразитарного препарату – відокремлення біомаси від рідкої фази сепаруванням, екстракція артемізинової кислоти гексаном, концентрування екстракту вакуум-випарюванням, кристалізація шляхом охолодження, доочищення перекристалізацією та вакуум-сушіння кристалів.

Кваліфікаційна робота складається зі вступу, 9 розділів та списку використаної літератури. В роботі використано 96 літературних джерел, кількість сторінок – 124. Робота містить 9 таблиць, 11 рисунків.

Ключові слова: *Saccharomyces cerevisiae*, малярія, артемізинін, дріжджі, виділення, таблетки, блістери, пакування.

ABSTRACT

The qualified robot is dedicated to the disaggregation of technological and hardware schemes for the detection of artemisin after the cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. The intensity of speech production for the treatment of malaria becomes 0.223 kg/r. Artemisinin is a medicinal substance that is used in medicinal malaria. It belongs to the class of antimalarial drugs and the main pharmacological power of artemisinin is that it can effectively fight the Plasmodium parasite that causes malaria.

According to WHO data, the number of malaria patients in the world will reach 230 million in 2021. It is understood that in African and Latin American regions access to cheap goods is low due to the low cost of living, so for the expansion of river consumption we look at this region itself, so we have great respect for Latin America. According to WHO data, the number of malaria outbreaks in 2021 is approximately 1.1 million outbreaks.

Borskoye, in the sviti e Vobroniki Artemizinin in that main part of the part of the growing is the Artemisia Annuua, to that, it is a snake of the near 10% of the consumption in Artemizinovsky for Likyvannya Malelya, and the work is 22 kg.

The robot involved priming the post-fermentation processes of the production of artemisin as a potent antiparasitic drug - strengthening the biomass from rare phase separation, extraction of artemisinic acid with hexane , concentration of the extract by vacuum evaporation, crystallization by cooling, further purification by recrystallization and vacuum drying of the crystals.

The qualification of the work consists of the entry, 9 sections and a list of relevant literature. The work contains 96 literary pieces, the number of pages – 124. The work includes 9 tables, 11 figures.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, malaria, artemisinin, yeast, vision, tablets, blisters, packaging.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	10
1.1. Історія відкриття, фізичні та хімічні властивості артемізиніну	10
1.2. Застосування та практичне використання артемізиніну	13
1.3. Особливості біосинтезу та підвищення виходу артемізиніну.....	18
1.3.1. Способи біосинтезу артемізиніну.....	18
1.3.2. Особливості підвищення продуктивності одержання артемізиніну та його попередників	22
1.4. Особливості біотехнологічного одержання протипаразитарних речовин.....	27
1.4.1. Шляхи одержання штамів-продуцентів артемізиніну та його попередників.....	27
1.4.2. Методи культивування штамів-продуцентів артемізиніну та його попередників.....	30
1.5. Способи виділення та очищення артемізиніну та похідних	34
РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....	40
2.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ на основі обраної субстанції, галузей використання, потреби у ЛЗ.....	40
2.2. Обґрунтування вибору форми випуску протипаразитарного препарату.....	42
2.2.1. Обґрунтування форми випуску препарату.....	42
2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки протипаразитарного препарату.....	47
2.3. Обґрунтування вибору біологічного агента для отримання субстанції.....	50
2.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.....	56
РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ.....	59
3.1. Відокремлення біомаси від рідкої фази	59
3.2. Виділення артемізинової кислоти.....	62
3.2.1. Екстракція артемізинової кислоти	62
3.2.2. Концентрування екстракту.....	64
3.3. Очищення артемізинової кислоти.....	67
3.3.1. Кристалізація.....	67

3.3.2. Сушіння	70
РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ	73
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	76
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	78
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ.....	83
7.1. Кількісне визначення артемізинінової кислоти в субстанції	83
7.2. Визначення вологості у готовому продукті	84
7.3. Мікробіологічна чистота субстанції	85
РОЗДІЛ 8. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ПРОТИПАРАЗИТАРНОГО ЗАСОБУ.....	90
8.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік	90
8.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень	90
8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	97
8.4. Обґрунтування вибору підготовки води	100
8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	102
РОЗДІЛ 9. ОПИС ПРОТИПАРАЗИТАРНОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД.....	105
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	115

ВСТУП

У сучасній історії людства практично немає захворювання, яке б такою мірою впливало на всі сфери життя цілих регіонів земної кулі, як малярія. Це одне з найпоширеніших і найнебезпечніших паразитарних захворювань у світі, яке продовжує загрожувати 40% населення земної кулі та реєструється на всіх континентах, крім Антарктиди. Найбільший тягар тропічної малярії лежить на країнах Екваторіальної Африки, Південно-Східної Азії, але хвороба вражає і жителів інших регіонів світу, включаючи азійську частину Європейського регіону ВООЗ [1].

Щорічно кількість випадків зараження малярією становить до 500 млн. Згідно з ВООЗ, ця цифра щороку зростає на 16%. Загальна кількість смертей досягає від 1,5 до 3,0 млн на рік. Високий рівень летальності пов'язаний із формуванням стійкості плазмодіїв до препаратів, що входять до арсеналу засобів лікування та профілактики, а також з підвищенням стійкості переносника до інсектицидів [2].

В даний час ВООЗ, враховуючи прогноз подальшого поширення малярії, намітила чіткий план заходів щодо зниження рівня захворюваності на цю інфекцію. Питання про ліквідацію малярії, проголошене в 60-ті роки минулого століття, вже не актуальне, ця мета поки що недосяжна. Але з огляду на можливість остаточної розробки вакцини та її застосування з метою профілактики малярії повна ліквідація захворювання представляється реальним, але складним процесом.

Все перераховане вище визначає актуальність проблеми малярії та пошук ефективних засобів боротьби з даним захворюванням.

Протималярійні лікарські засоби – це лікарські засоби з категорії протипаразитарних препаратів призначенні для лікування малярії, що викликають наступні малярійні плазмодії: *Plasmodium vivax*, *P. malariae*,

					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Степаненко І.Ю.					7	2
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

P. falciparum та *P. Ovale* [3]. Перспективним напрямом розробки ЛЗ для лікування малярії є використання досягнень науки в області хімії та біотехнології, одним з таких є використання генно-модифікованих організмів для синтезу попередників речовин, що застосовуються для лікування малярії.

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Історія відкриття, фізичні та хімічні властивості артемізиніну

Артемізинін (рис 1.1.) та його напівсинтетичні похідні – це група препаратів, які використовуються для лікування малярії, спричиненої схильним до резистентості до хлорохіну *Plasmodium falciparum* [4].

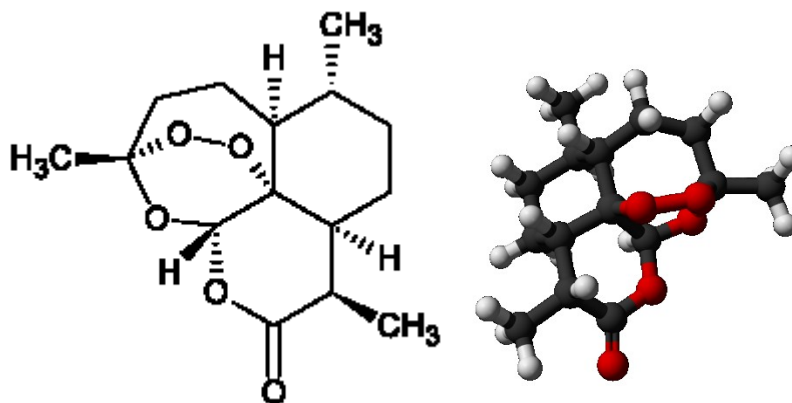


Рис. 1.1. Формула артемізиніну

Артемізинін був відкритий в Китаї у 1972 році науковцями на чолі з Ту Йо Йоу, в ході Національної дослідницької програми скринінгу рослин під назвою «Проект 523» для виявлення нових протималярійних речовин для зменшення темпів поширення малярії. Понад 60 інститутів і 500 дослідників приєдналися до цього проекту. Місцеві рослини, які використовуються в традиційних ліках, були обрані як джерела потенційних ліків [5].

Артемізинін отримують з рослини *Artemisia annua*, полину солодкого, трави, яка використовується в традиційній китайській медицині, перша згадка про дану рослину датується близько 2000 років тому [6].

Спочатку екстракт із *A. annua* виявляв багатообіцяючу протималярійну дію на мишачій моделі інфекції, хоча результати не були відтворюваними. Проте спроби отримання артемізиніну не припинялися. Дослідники дотримувалися думки, що активні компоненти *A. annua* могли бути інактивовані під час процесу екстракції при нагріванні. Потім був

					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Літературний огляд	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Степаненко І.Ю.					9	30
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.			Кафедра БТМ			

запропонований метод низькотемпературної екстракції рослини під керівництвом Ге Хуна. Неочищені ефірні екстракти за допомогою цього методу екстракції дали обнадійливі результати у мишей, інфікованих *Plasmodium berghei*, і, нарешті, 4 жовтня 1972 року був отриманий нетоксичний нейтральний екстракт зі 100% ефективністю проти паразитемії у мишей, інфікованих *Plasmodium berghei*, і у мавп, інфікованих *Plasmodium cynomolgi*. Саме за допомогою цього методу екстракції в 1972 році було виділено артемізинін [7].

З точки зору хімії артемізинін - це сесквітерпеновий лактон, що містить незвичайний пероксидний місток. Цей пероксидний місток вважається відповідальним за механізм дії препарату. Відомо дуже небагато інших природних сполук із таким пероксидним містком [4, 7].

Найбільш відомі похідні артемізиніна, що володіють ще більшою активністю, ніж вихідний артемізинін. Його похідні, які були створені шляхом модифікації його структури, виявляють різноманітні фармакологічні властивості. Оскільки фізичні властивості самого артемізиніну, такі як низька біодоступність, обмежують його ефективність, були розроблені напівсинтетичні похідні артемізиніну. Похідні дигідроартемізиніну виготовляються з 1976 року. Артесунат, артетер і артеметер були вперше синтезовані в 1986 році. Ось кілька найбільш відомих похідних артемізиніну:

- Артеметер: це синтетичний похідний артемізиніну, який широко використовується в лікуванні малярії. Він має високу ефективність проти *Plasmodium falciparum*, головного викликача смертельної малярії [8].
- Артесунат – це інший синтетичний похідний артемізиніну, його широко застосовують у комбінованих антималярійних препаратах.
- Дигідроартемізинін - це активний метаболіт артемізиніну, який утворюється в організмі при обробці артемізиніну. Він має сильну антималярійну активність.

- Артесунат-амодіаквін (artesunate-amodiaquine) – це комбінований антималярійний препарат, який поєднує в собі артесунат і амодіаквін. Він широко використовується для лікування малярії, особливо у регіонах з високим рівнем резистентності малярійного паразиту до інших препаратів [9].
- Артесунат-сульфоксид (artesunate-sulfadoxine) – Цей комбінований препарат поєднує в собі артесунат і сульфадоксин. Використовується для лікування малярії і є ефективним проти *Plasmodium falciparum*.
- Артемотіл (artemotil) – це новий похідний артемізиніну, який показує потенціал як антималярійний препарат. Він проходить клінічні випробування і може стати альтернативою існуючим препаратам для лікування малярії [9].
- Артесунат-пиперацетазин (artesunate-piperaquine) – це комбінований препарат поєднує в собі артесунат і пиперацетазин. Використовується для лікування малярії і демонструє високу ефективність проти *Plasmodium falciparum*.
- Артесунат-медоксоміл (artesunate-mefenoxam) – це похідний артемізиніну використовується як протипаразитарний препарат для лікування паразитарних інфекцій, таких як філяріатоз та щистявка [10].

Це лише кілька прикладів похідних артемізиніну, які використовуються в медицині. Ці препарати допомагають боротися з малярією та іншими паразитарними захворюваннями, проте, існують варіації, які можуть різнитися в залежності від країни та доступності лікарських засобів.

Загалом було підготовлено понад 120 інших похідних, але клінічне випробування було неможливим через відсутність фінансової підтримки серед світових урядовців [10].

1.2. Застосування та практичне використання артемізиніну

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) рекомендує артемізинін або одне з його похідних – зазвичай у поєднанні з довготривалими препаратами – як терапію першої лінії для всіх випадків малярії [8].

Механізм дії

Використовувані сьогодні артемізиніни є хімічно модифікованими формами більшості біологічно активного метаболіту дигідроартемізиніна, який є активним у стані, коли паразит знаходиться всередині червоних кров'яних клітин. Артемізинін надає свою дію на паразитів через утворення вільних радикалів, за рахунок наявності у артемізинінів ендопероксидного мостика. Коли паразит, який викликає малярію, заражає еритроцити, він потребує гемоглобіну в межах своєї вакуолі, і цей процес викликає окислювальний стрес [11]. У початковій теорії механізм дії заліза безпосередньо відновлює пероксидний зв'язок артемізиніна, генеруючи високовалентні види оксиду заліза і в результаті відбувається цілий каскад реакцій, які виробляють реактивні кисневі радикали, що викликають паразитів і призводять до їх смерті. Однак після широкого обговорення цього механізму з'явилися й інші гіпотези. Одним із варіантів є те, що артемізинін руйнує клітинні окислювально-відновлювальні процеси. Артесунат ефективно інгібує важливий для паразита білок – мембранну глутатию S-трансферазу. Нещодавно був запропонований вільно-радикальний механізм, в якому артемізинін активується внаслідок наявності заліза в харчовій вакуолі, який, у свою чергу, інгібує кальцієвий АТФ-фермент PfATP6 шляхом припинення фосфорилування та нуклеотидного збудження, приводячи до втрати функцій АТФ-ферменту PfATP6 паразита та його гібриду [10].

Медичне використання при лікуванні малярії

Артемізинін та його ендопероксидні похідні використовуються для лікування малярії, але їх низька біологічна засвоюваність, погані

фармакокінетичні характеристики та висока вартість препаратів стали основними перешкодами для їх використання як монотерапія. Використання препарату як монотерапія не схвалюється Всесвітньої організації охорони здоров'я, оскільки є ознаки того, що малярійні паразити розвивають стійкість до цього препарату. Застосування артемізиніна або його похідних у комбінації з іншими протималярійними препаратами є набагато кращим методом лікування малярії [12].

Для неускладненої малярії ВООЗ рекомендує триденне пероральне лікування будь-яким із п'яти комбінованих препаратів на основі артемізиніну : артеметер/люмефантрин, артесунат/амодіахін (ASAQ), артесунат/мефлохін, дигідроартемізинін/піперахін або артезунат/сульфадоксин/піриметамін. [13] У кожній із цих комбінацій похідна артемізиніну швидко вбиває паразитів, але сама швидко виводиться з організму.[13] Довший препарат-партнер вбиває решту паразитів і забезпечує деякий тривалий захист від повторного зараження [14].

При важкій формі малярії ВООЗ рекомендує внутрішньовенне або внутрішньом'язове лікування артезунатом похідного артемізиніну протягом принаймні 24 годин.[14] Лікування артезунатом продовжують до тих пір, поки пацієнт не стане достатньо здоровим, щоб приймати пероральні ліки. Потім їм призначають триденний курс артемізиніном, як при неускладненій малярії [15] Якщо артезунат недоступний, ВООЗ рекомендує внутрішньом'язову ін'єкцію менш потужного похідного артемізиніну - артеметер.[16] Дітям віком до шести років, якщо ін'єкція артезунату недоступна, ВООЗ рекомендує ректальне введення артезунату з подальшим направленням до закладу з ресурсами для подальшого догляду.[15]

Артемізиніни не використовуються для профілактики малярії через надзвичайно коротку дію (період напіврозпаду) препарату. Щоб бути ефективним, його потрібно вводити кілька разів на день.

Артемізинін та його похідні використовувалися для лікування малярії та паразитарних гельмінтів. Переваги такого лікування перед іншими

протипаразитарними препаратами включають швидше усунення паразитів і ширшу ефективність протягом усього життєвого циклу паразитів; недоліки включають їх низьку біодоступність, погані фармакокінетичні властивості та високу вартість [9, 10]. Крім того, Всесвітня організація охорони здоров'я категорично не рекомендує використання препарату як монотерапії [15], оскільки є ознаки того, що малярійні паразити розвивають резистентність до препарату. Комбінована терапія, що включає артемізинін або його похідні разом з деякими іншими протималярійними препаратами, становить сучасну стандартну схему лікування малярії [15].

Протипоказання

ВООЗ рекомендує уникати артемізинін жінкам у першому триместрі вагітності через відсутність досліджень безпеки артемізиніну на ранніх термінах вагітності. Натомість ВООЗ рекомендує семиденний курс кліндаміцину та хініну [15]. Вагітним жінкам у другому чи третьому триместрах ВООЗ рекомендує звичайний курс лікування з АСТ.[16] Для деяких інших груп уникають певних АСТ через побічні ефекти препарату-партнера: сульфадоксин-піриметамін уникають протягом перших кількох тижнів життя, оскільки він перешкоджає дії білірубіну та може погіршити неонатальну жовтяницю [15]. У ВІЛ-позитивних людей комбінація триметоприму/сульфаметоксазолу, антиретровірусних препаратів, що містять зидовудин, і АСАQ пов'язана з нейтропенією. Комбінація препарату проти ВІЛ ефавіренцу та АСАQ пов'язана з токсичністю для печінки.[15]

Побічні ефекти

Артемізиніни, як правило, добре переносяться в дозах, які використовуються для лікування малярії [13]. Побічні ефекти препаратів класу артемізинін схожі на симптоми малярії: нудота, блювота, втрата апетиту та запаморочення. Також були відзначені легкі аномалії крові. Рідкісним, але серйозним побічним ефектом є алергічна реакція. Повідомлялося про один випадок значного запалення печінки, пов'язаного з тривалим застосуванням відносно високої дози артемізиніну з незрозумілої

причини (пацієнт не хворів на малярію) [15]. Ліки, що використовуються в комбінованій терапії, можуть сприяти побічним ефектам, які відчувають ті, хто проходить лікування. Побічні ефекти у пацієнтів з гострою *P. falciparum* малярією, які отримували лікування похідними артемізиніну, мають тенденцію бути вищими.[15]

Виникнення резистентності

Найбільшою проблемою протималярійних лікарських засобів є виникнення резистентності. Два основні механізми резистентності обумовлюють стійкість плазмодіїв до протималярійних препаратів [16]. Перший – це відтік препарату від місця його дії через мутації в різних генах-транспортерах (наприклад, *pfcr1* при резистентності до хлорохіну) або збільшення кількості копій гена (як кількість копій *pfmdr1* при резистентності до мефлохіну). По-друге, це зміна мішені паразита через мутації у відповідних генах (наприклад, на рівні цитозолі, *dhfr* і *dhps* при стійкості до сульфадоксину-піриметаміну або, на рівні мітохондрій, цитохрому *b* при резистентності до атоваквону) [17]. Стійкість *P. falciparum* до нових сполук артемізиніну включає новий механізм, що відповідає феномену спокою. Починаючи з 2020 року, майбутні дослідження резистентності використовуватимуть трансгенних мишей для виявлення відповідних молекулярних маркерів [18].

Клінічні докази резистентності до артемізиніну в Південно-Східній Азії вперше були зареєстровані в 2008 році [18] і згодом були підтверджені детальним дослідженням у західній Камбоджі.

У 2012 році повідомлялося про випадки у сусідньому Таїланді, а в 2014 році – у північній Камбоджі, В'єтнамі та східній М'янмі [15-17]. У 2014 році повідомлялося про виникнення резистентності в південному Лаосі, центральній М'янмі та північно-східній Камбоджі. Ген *kelch* паразита в хромосомі 13, здається, є надійним молекулярним маркером клінічної стійкості в Південно-Східній Азії. У 2011 році ВООЗ заявила, що стійкість до найефективнішого протималярійного препарату, артемізиніну, може

зруйнувати національні індійські програми боротьби з малярією, які досягли значного прогресу за останнє десятиліття. ВООЗ виступає за раціональне використання протималярійних препаратів і визнає вирішальну роль громадських медичних працівників у зниженні поширення малярії в регіон ВООЗ чинить тиск на виробників, щоб вони припинили надання однокомпонентного препарату широкому медичному співтовариству, усвідомлюючи катастрофу, до якої призведе малярійний паразит, який виробить резистентність до артемізиніну [15-17].

Нові горизонти застосування артемізиніну

Артемізинін проходить клінічні дослідження в якості ліків для лікування раку. Артемізинін показав протипухлинний ефект в експериментальних моделях [19]. Він має пероксидно-лактонну групу в своїй структурі, і вважається, що, коли пероксид вступає в контакт з високою концентрацією заліза (які часто зустрічаються в ракових клітинах), молекула стає нестабільною і утворюють активні форми кисню. Було показано, що відбувається зниження ангіогенезу та експресія фактора росту ендотелію судин у деяких культурах тканин. Останні фармакологічні дані свідчать про те, що дигідроартемізинін (похідне артемізиніну) здатний впливати на метастатичні клітини меланоми людини в *in vitro*, викликаючи мітохондріальний апоптоз, що призводить до зниження залізоалежної генерації цитотоксичного окислювального стресу [20]. Експериментальні дослідження з використанням артезуната (похідне артемізиніну) дали обнадійливі результати для лікування деяких видів раку.

У пошуках нових протигельмінтних засобів для лікування шистосомозу в Китаї було зроблено відкриття, пов'язане з тим, що артемізинін ефективний проти шистозу, людських кров'яних гельмінтів, які є другою найбільш поширеною паразитарною інфекцією після малярії. Артемізинін і всі його продукти ефективно діють на дані гельмінти [21]. Пізніше було виявлено, що артемізиніни мають широкий спектр активності проти багатьох видів трематод, у тому числі *Schistosoma japonicum*,

Schistosoma mansoni, *Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica* та *Opisthorchis viverrini* [21]. У Кот-д'Івуарі та Китаї були успішно проведені клінічні випробування артемізиніну на пацієнтів з шистосомозом.

1.3. Особливості біосинтезу та підвищення виходу артемізиніну

1.3.1. Способи біосинтезу артемізиніну

Сучасні технології отримання протималярійних засобів передбачають використання хімічної переробки рослинної сировини, наприклад, деяких видів полину, так і використання сучасних біотехнологічних методів з використанням досягнень генної інженерії. В останні роки перевага надається саме методам генної інженерії завдяки їх високій ефективності, економічності після впровадження в промислове виробництво, безпечності для людини і навколишнього середовища [22].

Вважається, що біосинтез артемізиніну в *Artemisia annua* включає мевалонатний шлях (MVA) і циклізацію фарнезилдифосфату (FDP). Водночас незрозуміло, чи може немевалонатний шлях також сприяти створенню 5-вуглецевих попередників (IPP або DMAPP), як це відбувається в інших сесквітерпенових біосинтетичних системах. Шляхи синтезу від артемізинового спирту до артемізиніну залишаються суперечливими, і вони відрізняються головним чином тим, коли відбувається стадія відновлення. Обидва шляхи передбачають дигідроартемізинову кислоту як остаточний попередник артемізиніну. Потім дигідроартемізинова кислота піддається фотоокисленню з утворенням гідропероксиду дигідроартемізинової кислоти. Розширення кільця шляхом розщеплення гідропероксиду та повторне гідропероксидування, опосередковане киснем, завершують біосинтез артемізиніну (рис 1.2.) [23].

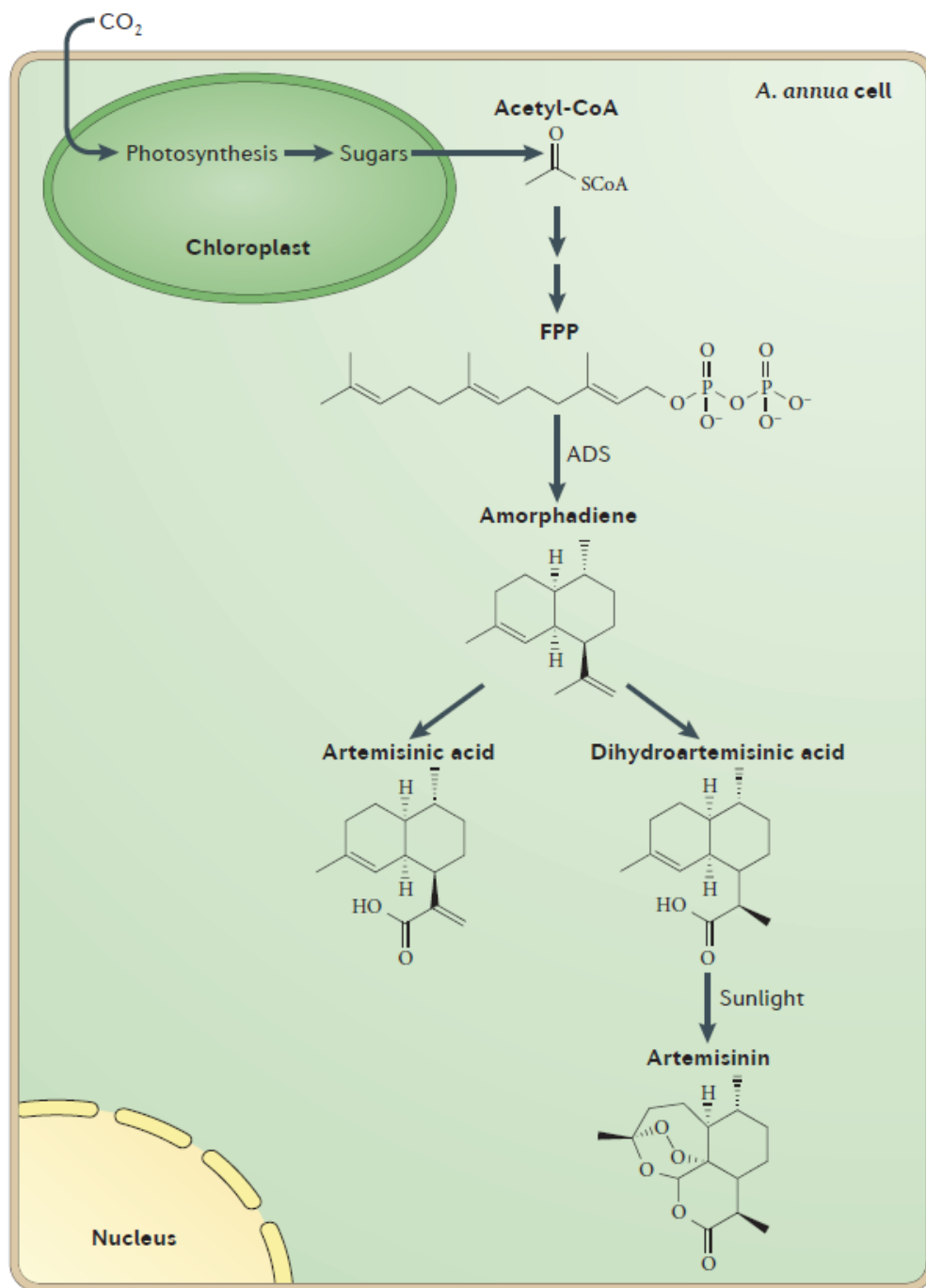


Рис. 1.2 Шлях біосинтезу артемізініну в *Artemisia annua*

Повний хімічний синтез артемізініну багато разів проводили з доступних органічних вихідних матеріалів, використовуючи основні органічні реагенти. Перші два загальні синтези були стереоселективним синтезом Шміда та Хофхайнца в Hoffmann-La Roche у Базелі, починаючи з (-)-ізопулеголу (13 етапів, ~5% загального виходу), і одночасним синтезом Чжоу та його співробітниками з Шанхайського інституту органічної хімії з (R)-(+)-цитронелаля (20 кроків, ~0,3% загальний вихід).[25] Ключові кроки

підходу Шміда-Гофхайнца включали початкове стереоселективне гідроборування/окислення за Орлоффом для встановлення «позакільцевого» метильного стереоцентру на бічному ланцюзі пропену; два послідовних алкілювання, опосередкованих літєвим реагентом, які ввели всі необхідні атоми вуглецю і які разом були високодіастереоселективними; і подальші стадії відновлення, окислення та десилілювання, що виконуються на цьому монокарбоциклічному проміжному продукті, включаючи кінцеву реакцію фотооксигенацію з використанням синглетного кисню, яка після кислотної обробки замикає три залишкові оксациклічні кільця бажаного продукту, артемізиніну.

Широкий спектр подальших шляхів продовжує досліджуватися, починаючи з перших днів і до сьогодні, включаючи шляхи загального синтезу з (R)-(+)-пулегону, ізоментену і навіть 2-циклогексен-1-ону [25]. А також шляхи, які краще описати як частковий або напівсинтез із більш багатого біосинтетичного попередника, артемізинової кислоти — в останньому випадку, включаючи деякі дуже короткі та дуже високопродуктивні приклади біоміметичного синтезу (Рота та Ектона та Хейнса та ін., 3 етапи, 30% вихід), але згідно літературними даними вихід та чистота артемізиніну при хімічному синтезу в порівнянні з іншими способами все одно залишається невеликою. [26-27]

Роботи з розробки напівсинтетичного артемізиніну очолювалося програмою розробки лікарських засобів PATH (через співпрацю з OneWorld Health) за фінансування від Фонду Білла та Мелінди Гейтс. Проект розпочався у 2004 році, і першими партнерами проекту були Каліфорнійський університет у Берклі (який надав технологію, на якій базувався проект – процес, який генетично змінював дріжджі для виробництва артемізинової кислоти)[27] та Amugis (біотехнологічна фірма в Каліфорнія, яка удосконалила процес для забезпечення великомасштабного виробництва та розробила масштабовані процеси для передачі промислового партнеру) [28].

У 2006 році команда з Каліфорнійського університету в Берклі повідомила, що вони створили дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* для отримання невеликої кількості попередника артемізинової кислоти. Потім синтезовану артемізинову кислоту можна транспортувати, очищати та хімічно перетворювати на артемізинін, який, як стверджують, коштуватиме приблизно 0,25 доларів США за дозу. У цій спробі синтетичної біології був використаний модифікований мевалонатний шлях, і дріжджові клітини були сконструйовані для експресії ферменту аморфадієнсинтази та цитохром P450 монооксигенази (CYP71AV1), обидва з *Artemisia annua*. Тристадійне окислення аморфа-4,11-дієну дає в результаті артемізинову кислоту. [29]

Метод Каліфорнійського університету в Берклі був доповнений за допомогою технологій інших організацій. Остаточна успішна технологія базується на винаходах, ліцензованих Каліфорнійським університетом у Берклі та Інститутом біотехнології рослин Канади Національної дослідницької ради (NRC) [30].

Комерційне виробництво напівсинтетичного артемізиніну зараз триває на заводі Санофі в Гаресіо, Італія. Це друге джерело артемізиніну готує забезпечити більш стабільний потік ключових протималарійних препаратів для тих, хто їх найбільше потребує [31]. Ціль виробництва встановлена на рівні 35 тонн на 2013 рік. Очікується, що він збільшиться до 50-60 тонн на рік у 2014 році, забезпечуючи приблизно одну третину світової річної потреби в артемізиніні .

У 2013 році Програма попередньої кваліфікації лікарських засобів ВООЗ оголосила про прийнятність напівсинтетичного артемізиніну для використання у виробництві активних фармацевтичних інгредієнтів, поданих до ВООЗ для попередньої кваліфікації або вже кваліфікованих ВООЗ [26-27]. Активний фармацевтичний інгредієнт Санофі (API), виготовлений з напівсинтетичного артемізиніну (артезунат), також був попередньо кваліфікований ВООЗ 8 травня 2013 року, що зробило його першим

напівсинтетичним похідним артемізиніну, який пройшов попередню кваліфікацію.

1.3.2. Особливості підвищення продуктивності одержання артемізиніну та його попередників

Відомо, що кількість артемізиніну, що виробляється з рослини *A. annua*, дуже низька, а доступності артемізиніну недостатньо для лікування всіх інфікованих малярією пацієнтів. Крім того, відома поява резистентних до артемізиніну плазмодіїв, що ускладнює використання даної речовини, яка отримана з полину [31]. Звичайні методи селекції рослин для відбору сортів із високим вмістом артемізиніну використовувалися протягом десятиліть від початку відкриття його фармакологічних властивостей. Ці методи включають вирощування *A. annua* та збирання сортів з бажаними властивостями. Відомо про використання [29-30] стійкого гібриду *A. annua* отриманого з комбінації сильнорослих сортів які продукують артемізинін, і результаті цього вихід артемізиніна вдалось збільшити більш ніж 2% сухої ваги. Також відомо про дослідження [31], де було запропоновано альтернативний підхід до збільшення виробництва артемізиніна при вирощуванні сортів полину з високим вмістом артемізинової кислоти або дигідроартемізинової кислоти, оскільки було розроблено метод напівсинтезу артемізиніна з цих двох попередників [32].

Вчені з Йоркського університету використовували передові методи селекції з метою оцінки розподілу ознак, які впливають на вихід артемізиніна [32]. В результаті скринінгу 23 000 штамів їм вдалося ідентифікувати гени та молекулярні маркери для прискореного розмноження, що дозволило побудувати докладну генетичну карту *A. annua* із дев'ятьма групами зчеплення. Встановлена карта локусів кількісних ознак (ЛКО) також може бути застосована для швидкої ідентифікації батьківських ліній *A. annua* з корисними для селекції рослин ознаками. Два гібриди, названі Hybrid 1209r Shennong і Hybrid 8001r Zenith., були створені з високою продуктивністю за артемізинін до 36,3 і 54,5 ц/га відповідно. Підхід діалельного схрещування

для визначення комбінованої здатності сильних батьківських ліній до виробництва високопродуктивних артемізінінових гібридів *A. annua* також був розроблений тією ж групою і показав результати, що узгоджуються з підходом молекулярної селекції на основі ЛКО [33].

Ще одним методом посилення виробництва вторинних (спеціалізованих) метаболітів є одержання культури волохатого кореня завдяки його здатності до швидкого росту [34]. Повідомлялося про протоколи трансформації для отримання волосистих коренів, що містять артемізинін з *A. annua*. Автори [35] заявили, що вони змогли створити альтернативний біотехнологічний протокол для великомасштабного виробництва артемізиніну. Він показав посилений ріст і виробництво артемізиніну завдяки культивуванню волохатих коренів у біореакторі з живильним туманом у поєднанні з новими стратегіями культивування, у трьох конфігураціях біореакторів – бульбашковий колонний реактор, біореактор з живильним туманом та модифікований біореактор з живильним туманом, зокрема, щоб встановити їх придатність для комерційного виробництва. Авторами було помічено, що культивування волосистих коренів у реакторі з барботажною колоною без перемішування продемонструвало лише накопичення біомаси 5,68 г/л, тоді як групове культивування у виготовленому на замовлення біореакторі з живильним туманом продемонструвало вищу концентрацію біомаси 8,52 г/л, але відносно нижче накопичення артемізиніну. 0,22 мг/г спостерігалось в цьому реакторі в порівнянні із біореактором із барботажною колоною. У цьому дослідженні для культивування волосистого кореня була прийнята суміш зануреного росту в рідкій фазі (протягом 5 днів) з подальшим культивуванням у газовій фазі в реакторі з живильним туманом (протягом наступних 15 днів). Обґрунтовано висока (23,02 г/л) кінцева суха маса разом із накопиченням артемізиніну (1,12 мг/г, що еквівалентно 25,78 мг/л артемізиніну) була отримана в цьому біореакторі, що є найвищим

zareestrovanim vиходом артемiзинiну в газовой фазi реактора з живильним туманом [36].

Серед вчених [36], якi займались шляхами пiдвищення бiосинтезу артемiзинiну, культивуванням *A. annua* шляхом надмiрної експресiї генiв, залучених до бiосинтезу артемiзинiну, великої уваги до якої придiляли протягом останнiх 20 рокiв. У науковiй працi [36] було оцiнено надмiрну експресiю кiлькох генiв, залучених до бiосинтезу артемiзинiну в *A. annua*. Надмiрна експресiя фарнезилпiрофосфатсинтази (FPS) збiльшила виробництво артемiзинiну до 2-3,6 разiв вище, нiж у контрольних пробах. Надмiрна експресiя CYP71AV1 та його редокс-партнера цитохром P450-редуктази (CPR) у бiосинтезi артемiзинiну може збiльшити вiмiст артемiзинiну в рослинах на 38 %. Сян та iн. [36] генерує dxr - i CYP71AV1 / CPR - надлишкову експресiю *A. Annua* i виявили, що обидва трансформанти пiдвищують продукцiю артемiзинiну. Надмiрна експресiя DBR2 збiльшила виробництво артемiзинiну, а також його попередника дигiдроартемiзинової кислоти майже вдвiчi порiвняно з нетрансгенними рослинами. Це також збiльшило виробництво артемiзинової кислоти до 5,48-9,06 разiв i артеаннуїну В до двох разiв [36]. Причина, чому надмiрна експресiя DBR2 посилює бiосинтез артемiзинової кислоти та артеаннуїну В, досконало не вивчена. Однак Юань та iн. [34] висунули гiпотезу, що надлишок дигiдроартемiзинової кислоти може бути перетворений на артемiзинову кислоту в рослинах .

Чен та iн. [35] показали, що надмiрна експресiя кiлькох генiв, залучених до бiосинтезу артемiзинiну, може значно збiльшити вироблення артемiзинiну в рослинах. В роботi висвiтлено, що спiльна надекспресiя FPS, CYP71AV1 i CPR пiдвищила рiвень артемiзинiну в *A. annua* до 3,6 разiв. Спiльна надекспресiя HMGR i FPS збiльшила вироблення артемiзинiну до 1,8 разiв вище, нiж у контролi. Алам та iн. [35] ко-надекспресований HMGR та ADS у *A. annua* виявили значно пiдвищенi рiвнi артемiзинiну, до 7,65 разiв, у цiй трансгеннiй лiнii.

Відомо [36] ще про один підхід до збільшення вмісту артемізиніну в рослинах шляхом пригнічення експресії генів, залучених у шляхи, що конкурують з біосинтезом артемізиніну. Чжан та ін. [37] використовували методи RNAi для придушення експресії SQS, першого коммітованого гена в біосинтезі стеролу. Пригнічення цього гена збільшило вироблення артемізиніну до 3,14 разів у рослинах.

Одним із найбільш сучасних методів в біотехнології при отриманні рослинних природних сполук за допомогою використання мікроорганізмів. Метаболічні шляхи мікроорганізмів можуть бути модифіковані для виробництва різних типів природних рослинних сполук, включаючи ізопреноїди, алкалоїди та фенілпропаноїди. Мікроорганізми можуть швидко рости, дозволяючи скоротити час виробництва порівняно з біосинтезом бажаних природних сполук у рослинах. Також можливе розширення виробництва до промислових масштабів [37].

Вперше про виробництво попередників артемізиніну в мікроорганізмах було повідомлено в 2003 році, Мартін та автори [38] експресували цілі гени, що кодують ізопреноїдний шлях з дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* в *Escherichia coli*, щоб збільшити внутрішньоклітинну концентрацію FPP. Щоб запобігти швидкій втраті високолеткого аморфа-4,11-дієну під час культивування, культуральне середовище було покрито додеканом для захоплення аморфа-4,11-дієну, що називається двофазним розподільним біореактором. У результаті вони відновили випарений аморфа-4,11-дієн, покращивши концентрації з 24 мг/л до приблизно 500 мг/л у біореакторі періодичної дії [39].

Далі науковці проводили багато праць для підвищення біосинтезу артемізиніну, одна з таких праць присвячено коекспресії оперону *MevT* з додатковими копіями *HMGR* зменшувала накопичення токсичного *HMG-CoA* та збільшувала продукцію мевалонату втричі [40]. Заміна *lac* на промотор *lacUV5* з кодоном-оптимізованим *MevT* і додатковою копією *MK* також призвела до збільшення продукції артемізиніну. Цурута та ін. [41]

вдалося підвищити виробництво аморфа-4,11-дієну в *E. coli* до 27,4 г/л шляхом заміни дріжджових HMGS і HMGR на еквівалентні ферменти з грампозитивних бактерій *Staphylococcus aureus*.

Дріжджі є ще одним привабливим мікроорганізмом для виробництва попередників артемізиніну, оскільки вони виробляють FPP для біосинтезу стеролів через ізопреноїдний шлях. Оскільки ізопреноїдний шлях у *S. cerevisiae* був охарактеризований, ADS було введено в ці дріжджі, і був успішно створений дріжджовий штам, що продукує аморфа-4,11-дієн [42]. Хоча існує багато питань щодо експресії цитохрому P450 в *E. coli*, експресія цього гена в дріжджах є набагато більш можливою. Таким чином, CYP71AV1 і CPR були коекспресовані, і всі гени, задіяні в ізопреноїдному шляху, були прямо або опосередковано активовані. Конкуруючий шлях (шлях біосинтезу стеролів) також був знижений за допомогою промотора, що пригнічується метіоніном, для покращення виробництва артемізинової кислоти в системі експресії дріжджів. В результаті цей трансгенний штам дріжджів продукував артемізинову кислоту до 100 мг/л [42-43].

Відомо також про експерименти щодо оптимізації для виробництва артемізинової кислоти в промисловому ферментері. Одна з таких праць, стосується оптимізації джерела вуглецю для вирощування дріжджів у ферментері було змінено з глюкози на галактозу, а швидкість передачі кисню контролювалася. Завдяки цій розробці, яка називається періодичним процесом із підживленням галактози, керованим алгоритмом DO-stat, титр артемізинової кислоти зріс до 2,5 г/л [44].

Незважаючи на те, що забезпечує більший вихід артемізинової кислоти, використання галактози є дорогим і непридатним, особливо в країнах, що розвиваються. Таким чином, потрібно розглядати дешевші хімічні речовини як джерела вуглецю. Дріжджі з делеціями GAL1, GAL7, GAL10 і GAL80 були створені, щоб виключити використання галактози, а етанол альтернативно використовувався як джерело вуглецю. Дві додаткові копії усіченого HMGR (tHMG1) були інтегровані в цей штам дріжджів. У

результаті виробництво аморфа-4,11-дієну було збільшено до понад 40 г/л [45].

Подальший розвиток було здійснено шляхом введення генів біосинтезу артемізиніну, CYP71AV1, CPR, ADH1 і ALDH1, для окислення аморфа-4,11-дієну в артемізинову кислоту. Цитохром b5 (CYB5) також був введений у цей штам, оскільки він може прискорювати реакції цитохрому P450. Таким чином було досягнуто високого рівня виробництва артемізинової кислоти, 25 г/л. Напівсинтез артемізиніну з артемізинової кислоти також був оптимізований, а загальний вихід після очищення зріс до 40–45 % [45]. Потім вченими був розроблений потужний метод сполученої хроматографії та кристалізації для очищення артемізиніну, і вихід цієї протималарійної сполуки з реакційної суміші зріс до 61,5 % із чистотою 99 % [46].

1.4. Особливості біотехнологічного одержання протипаразитарних речовин

1.4.1. Шляхи одержання штамів-продуцентів артемізиніну та його попередників

Шляхи одержання штамів-продуцентів для виробництва артемізиніну та його похідних зазвичай включає такі кроки:

Вибір відповідного штаму дріжджів, на цьому етапі обираються штами дріжджів, які можуть бути генетично модифіковані для виробництва артемізиніну або його прекурсорів. Наприклад, потенційні штами *Saccharomyces cerevisiae* можуть бути модифіковані для включення генів, які кодують ферменти, необхідні для синтезу артемізиніну [47].

Генетична модифікація дріжджів, тут використовуються методи генної інженерії для введення генетичних конструкцій, які кодують ферменти, відповідальні за біосинтез артемізиніну або його прекурсорів, в геном дріжджів.

З розвитком технології секвенування все більше і більше геномів лікарських рослин було секвеновано, а також з'ясовано шляхи біосинтезу багатьох природних продуктів [48]. На цій основі шлях біосинтезу природних продуктів може бути реконструйований у мікроорганізмів, а

природні продукти та їх прекурсори можуть бути отримані швидко та у великих кількостях шляхом біологічної ферментації, тим самим закладаючи основу для комерційного застосування натуральних рослинних продуктів. Розробка артемізиніну як ефективного протималярійного препарату була обмежена вартістю вилучення сполук із природного *A. annua* та складністю хімічного синтезу; однак для тих, хто найбільше уражений малярією (наприклад, африканські регіони), класичної селекції рослин може бути недостатньо, щоб знизити вартість виробництва артемізиніну до доступної ціни. Таким чином, використовуючи мікроорганізми (*Escherichia coli* та *Saccharomyces cerevisiae*) як клітини шасі, гетерологічний біосинтез артемізиніну або його попередника за допомогою метаболічної інженерії може забезпечити альтернативне джерело постачання артемізиніну. Лабораторії Кіслінга знадобилося десять років, щоб досягти напівсинтезу артемізиніну, таким чином перенісши виробництво артемізиніну з рослин на мікроорганізми.

У 2003 році Martin та ін. трансформував кодон-оптимізований ген Аморфа-4,11-діенсинтази у *E. coli*, одночасно коекспресував оперон *E. coli* SOE4 (кодує гени ферменту, що обмежує швидкість, *dxs*, *ippHr* та *ispA* шляху *E. coli* MEP), і гетерологічно експресував мевалонатний шлях гени (плазміді *pMevT* і *pMBIS*) з *S. cerevisiae*. Це був перший випадок, коли аморфа-4,11-дієн, попередник артемізиніну, був синтезований в *E. coli* в концентрації 24 мг/л. Після оптимізації умов культивування вихід аморфа-4,11-дієну зріс у 20 разів до 0,5 г/л [39]. Цурута та ін. Продовжили оптимізацію генів дріжджового мевалонатного шляху для гетерологічної експресії в *E. Coli* та замінили дріжджові гени *HMGS* і *tHMGR* у плазміді *pMevT* на більш активні еквівалентні гени *Staphylococcus aureus*. У поєднанні з обмеженим надходженням вуглецю та азоту виробництво аморфа-4,11-дієну в *E. coli* досягло 27,4 г/л [42]. На основі гетерологічної експресії генів дріжджового шляху MVA (плазміді *pAM92*), гени *ADS*, *AMO* (аморфа-4,11-

дієноксидаза) і CPR *A. annua* були одночасно експресовані для отримання артемізинової кислоти в *E. coli* з найвищим виходом 105 мг/л.

У подальшому біосинтетичному шляху артемізиніну перетворення аморфін-4,11-дієну в артемізинову кислоту та дигідроартемізинової кислоти вимагало синергічного каталізу CYP71AV1 і CPR, обидва з яких були пов'язані з ендомембранною системою клітини; однак у *E. coli* був відсутній ген CYP450 і ендомембранна система еукаріотичних клітин, що призвело до порушення експресії генів CYP71AV1 і CPR. У 2006 році Po та ін. модифікував шлях біосинтезу FPP у *S. cerevisiae*, щоб прискорити виробництво FPP, який знижував експресію EGR9 і пригнічував перетворення FPP у сквален, таким чином дозволяючи більшій кількості FPP надходити в шлях біосинтезу артемізинової кислоти. Тим часом гени ADS, CYP71AV1 і CPR *A. annua* були трансформовані в дріжджовий штам ERY224 (табл. 1.1). Нарешті, біосинтез артемізинової кислоти був досягнутий у дріжджах з виходом 100 мг/л [41].

Крім того, біосинтезовану артемізинову кислоту можна було виділити за межі сконструйованих дріжджів, сприяючи очищенню артемізинової кислоти з дріжджового ферментаційного бульйону, що ще більше спонукало процес індустріалізації артемізиніну.

Westfall та ін. прийняли штам дріжджів, CEN.PK2, для надмірної експресії всіх генів шляху MVA, одночасно знижуючи регуляцію гена EGR9, так що виробництво аморфа-4,11-дієну досягло 40 г/л [33]. У 2013 році Паддон та ін. трансформували гени ADS, CYP71AV1, CPR1, CYB5, ADH1 і ALDH1 *A. annua* в дріжджі після оптимізації кодону для зменшення накопичення артемізинового альдегіду та покращення процесу бродіння. У результаті вихід артемізинової кислоти досяг 25 г/л, що задовольнило потребу промислового виробництва. Потім артемізинову кислоту екстрагували з ферментаційного бульйону, і після чотирьох етапів хімічного синтезу *in vitro* нарешті було отримано артемізинін із загальним виходом 40–45% [45].

Підсумовуючи, використання методів біотехнології для отримання артемізинової кислоти в мікроорганізмах в основному призвело до таких покращень:

1. Оптимізація кодонів. Ключові гени шляху біосинтезу артемізинової кислоти були оптимізовані за кодонами та трансформовані в *E. coli* та дріжджі.

2. Перебудова метаболічних шляхів і підбір ферментів з високою каталітичною активністю. Ферменти дріжджового шляху MVA були замінені ферментами з *S. aureus*.

3. Вибір відповідних комірок шасі. Оксидаза та редуктаза CYP450 *A. annua* були експресовані в еукаріотичних дріжджах.

4. Контроль надходження метаболітів. У дріжджових клітинах пригнічення гена ERG9 (кодує скваленсинтазу) пригнічує перетворення FPP у сквален. Тим часом гени шляху MVA були надмірно експресовані під сильними промоторами, що дозволило більшій кількості FPP надходити в шлях біосинтезу артемізинової кислоти.

1.4.2. Методи культивування штамів-продуцентів артемізиніну та його попередників

На сьогодні про промислові штами для отримання артемізиніну відомо не багато, оскільки вони мають патентний захист, тому світові науковці знаходяться ще в пошуках та вдосконаленні своїх технологій по культивуванні мікроорганізмів з метою отримання артемізиніну або його попередників.

Відомо про біосинтез дигідроартемізинової кислоти, замість артемізинової кислоти, як передбачалося це знизить вартість напівбіосинтезу артемізиніна за рахунок усунення стадії початкового гідрування артемізинової кислоти. Основна проблема мікробного виробництва дигідроартемізинової кислоти полягає в тому, як ефективно маніпулювати послідовно розташованими ключовими ферментами ADH1 (артемізинова алкогольдегідрогеназа), DBR2 [артемізинова альдегід-111(13) редуктаза] та

ALDH1 (альдегіддегідрогеназа) для перенаправлення кислота. Тут біосинтез дигідроартемізинової кислоти був досягнутий в *Saccharomyces cerevisiae* шляхом введення ряду гетерологічних ферментів: ADS (аморфа-4,11-діенсинтаза), CYP71AV1 (аморфадієноксидаза), ADH1, DBR2 і ALDH1, отримуючи вихідне співвідношення DHA. Потік у бік дигідроартемізинової кислоти посилювався за рахунок парування злитих білків DBR2-ADH1 та DBR2-ALDH1, що призводило до збільшення відношення DHAA/AA у 1,75 раза (до 6,97) [46].

Підготовка посівної культури була такою ж, як ферментація в колбі. Посівну культуру (200 мл) вирощують в 5-літровому біореакторі, що містить 2-літрове порційне середовище з 20 г/л глюкози та наступним складом ПС - 8 г/л KH_2PO_4 , 15 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6,2 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 г/л глюкози, 12 мл/л розчину вітаміну та 10 мл/л мікроелементів. Розчин вітамінів включав 0,05 г/л біотину, 1 г/л пантотенату кальцію, 1 г/л нікотинової кислоти, 25 г/л міоїнозиту, 1 г/л тіаміну HCl , 1 г/л піридоксалу HCl , 0,2 г/л п-амінобензойної кислоти та 2 г/л аденіну сульфату. Розчин мікроелементів складався з 5,75 г/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,32 г/л $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,32 г/л безводного CuSO_4 , 0,47 г/л $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,48 г/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,9 г/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,8 г/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ та 80 мл/л розчину EDTA (містить 0,5 моль/л Na_2EDTA pH = 8,0). Розчин амінокислоти (10 мл/л), включаючи 2 г/л метіоніну, 6 г/л триптофану, 8 г/л ізолейцину, 5 г/л фенілаланіну, 10 г/л глутамату натрію, 20 г/л треоніну, 10 г/л аспартату, 15 г/л валіну, 40 г/л серину та 2 г/л аргініну було додано до середовища в дослідженні для кращого використання росту клітин [45].

Основні компоненти ПС (8 г/л KH_2PO_4 , 15 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і 6,2 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) і базовий розчин глюкози (667 г/л) стерилізували за допомогою автоклава. Розчин вітаміну, розчин мікроелементів та розчин амінокислоти стерилізували фільтрацією. Усі компоненти ПС змішували разом після стерилізації. Основний розчин глюкози (667 г/л), відфільтрований 95% (об./об.) розчин етанолу та відфільтрований вихідний розчин (80 г/л KH_2PO_4 , 150 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 62 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) також

необхідно підготувати для ферментації в біореакторі об'ємом 5 л. Перед використанням рН доводили до 5 на 10 моль/л NaOH [45].

Для приготування посівних флаконів окремі ізоляти кожного штаму з чашок з агаром вирощували протягом 18 годин у середовищі ПС при 30°C і 200 об/хв. Потім культури інокулювали у свіже середовище ПС при початковій OD600 0,05 і вирощували протягом ще 16 годин культивування при 30 °C. Посівну культуру перенесли в колбу на 250 мл, що містить 25 мл середовища ПС при початковій OD600 0,2. Клітини вирощували при 30°C зі струшуванням при 200 об/хв. Через 24 години в кожену колбу додавали 5 мл ІРМ (ізопропілмірикат) і 20 г/л етанолу. Весь процес ферментації тривав протягом 120 годин

Підготовка посівної культури була такою ж, як і ферментація в колбі. Посівну культуру (200 мл) інокулюють у 5-літровий біореактор, що містить 2-літрове порційне середовище FM з 20 г/л глюкози. Рівень рН контролювали на рівні 5 шляхом додавання 5 моль/л NaOH. Потік повітря та температуру підтримували на рівні 1,5 і 30 °C. Під час ферментації розчин глюкози подавався в біореактор зі швидкістю 0,3 мл/хв після того, як глюкоза була вичерпана протягом приблизно 6 годин. Під час етапу подачі глюкози рівень розчиненого кисню (DO) підтримувався на рівні 40% шляхом каскадного перемішування від 400 до 600 об/хв. Коли OD600 збільшився до 50 (приблизно 30–36 год), підживлення глюкозою було переведено на підживлення етанолом. Концентрацію етанолу підтримували на рівні 10 г/л, щоб гарантувати відсутність надлишкового накопичення вуглецю. Під час процесу подачі етанолу DO автоматично підтримувався на рівні приблизно 30% шляхом каскадного перемішування. У даному дослідженні підкреслюється синергія метаболічної та білкової інженерії у перенаправленні метаболічного потоку для отримання найбільш ефективного продукту для хімічного процесу та спрощення подальшого процесу перетворення, в такий спосіб культивування вдалося отримати 1,7 г/л дигідроартемізинової кислоти – прекурсор артемізиніну [43].

Іншою групою вчених було досліджено ферменти, які завершують біосинтетичний шлях виробництва артемізиніну, вчені провели кілька вдосконалень оригінального штаму *Saccharomyces cerevisiae* Y337, що продукує аморфадієн. Ми замінили промотор MET3 на регульований міддю промотор CTR3, що дозволяє обмежити експресію ERG9 (ERG9 кодує скваленсинтазу, яка каталізує конкуруючу реакцію з'єднання двох фрагментів фарнезилдифосфату з утворенням сквалену) шляхом додавання недорогого репресора CuSO_4 до середовища, а не дорожчого метіоніну. Штами Y1516 (PCTR3-ERG9) та Y337 (PMET3-ERG9) обидва виробляли однакові кількості аморфадієну, демонструючи еквівалентність промоторів MET3 і CTR3 для репресії експресії ERG9. В роботі було порівняно виробництво аморфадієну з Y337 з виробництвом артемізинової кислоти з Y285, варіанту Y337, який також експресував аморфадієноксидазу CYP71AV1 (цитохром P450) і *A. annua* CPR1 (його споріднену редуктазу) з висококопійної плазмиди (pAM322). Обидва штами вирощували у ферментаторі періодичної дії із змішаним вмістом глюкози та етанолу. У той час як Y337 виробляв більше 12 г/л аморфадієну, Y285 виробляв значно менше сесквітерпену: 3,3 г/л артемізинової кислоти плюс 0,3 г/л аморфадієну, 0,18 г/л артемізинового спирту та не виявлявся артемізиновий альдегід. Життєздатність культури Y285 також помітно знизилася після експресії CYP71AV1 і CPR1 [46].

Виробництво аморфа-4,11-дієну (попередник артемізиніну) з *S. cerevisiae* спочатку було розроблено як засіб для сприяння клонуванню цитохрому P450, який, як вважають, відповідальний за виробництво артемізинової кислоти, окисленого попередника артемізиніну на пізній стадії. Ряд інженерних кроків, а саме високий рівень експресії ADS, надлишкова експресія фарнезилдифосфатсинтази та каталітичного домену ГМГ-КоА-редуктази, зниження експресії скваленсинтази та загальне підвищення експресії мевалонатного шляху за рахунок надекспресії активованого алеля. Фактор транскрипції UPC2, UPC2-1, дозволив продукувати 153 мг/л аморфа-

4,11-дієну у колбах на качалці, а це дає обнадійливі результати для подальшого промислового виробництва даного продукту. Цей штам використовувався для функціональної експресії CYP71AV1 [також відомого як аморфадієноксидаза (АМО)], цитохрому P450, відповідального за триетапне окислення аморфа-4,11-дієну, разом із його спорідненою редуктазою AaCPR (*A. annua* цитохром P450 редуктази), виробляючи >100 мг/л артемізинової кислоти (13). Включення всіх генів *A. annua* (ADS, CYP71AV1 і AaCPR) в одну експресійну плазмиду дозволило отримати 2,5 г/л артемізинової кислоти шляхом розвитку процесу ферментації на основі галактози (14), хоча була продемонстрована стабільність плазмиди. Бути нижчим у штамі, що продукує артемізинову кислоту, порівняно зі штамом, що продукує аморфа-4,11-дієн, а продукція артемізинової кислоти призвела до індукції плеiotропних генів стійкості до ліків (15). Зараз ми описуємо створення нових штамів *S. cerevisiae* і процеси для виробництва аморфа-4,11-дієну, кульмінацією якого є 250-кратне збільшення виробництва аморфа-4,11-дієну до концентрації 40 г/л, і процес його ефективного хімічного перетворення в дигідроартемізинову кислоту, попередник артемізиніну [43-47].

1.5. Способи виділення та очищення артемізиніну та похідних

Важливо, що конкретні методи очищення та оптимізації процесу залежатимуть від конкретного проекту та умов. Безперервні дослідження та розробки в цій галузі допоможуть покращити ефективність та економічну життєздатність процесу виробництва артемізинінової кислоти з використанням дріжджів [47-48].

На сьогодні відомі основні методи отримання артемізиніну, які будуть розглянуті нижче.

Метод прямого виділення. Екстракція артемізиніна з рослини *Artemisia annua* (полин однорічний). Загальний вихід артемізиніна становить трохи більше 1%. Виділення найефективнішого протималарійного препарату лише з *Artemisia annua* не забезпечує отримання необхідної кількості щорічних

курсів лікування. Неможливо покрити світовий ринковий попит лише за рахунок наявної рослинної сировини без генної модифікації.

Для збільшення кількості доступної сировини при прямому виділенні артемізиніна існують і використовуються шляхи: нетрансгенні – це селекція на основі природного полину та вирощування культур у пробірці, трансгенні - це клонування біосинтетичних генів артемізиніна в *Escherichia coli* і *Saccharomyces cerevisiae*, що і дало шанс великомасштабному мікробному виробництву попередників артемізиніна, таких як аморфа-4,11-дієн і артемізинова кислота цим самим зробивши конкурентноспроможну альтернативу прямої екстракції артемізиніна з *Artemisia annua* [48].

Рідкі відходи процесу прямої екстракції містять артемізинову кислоту, кількість якої в рослині приблизно в 5-10 разів більша за артемізинін. Кислота може бути виділена з відходів без хроматографії та перероблена в артемізинін за схемами, зазначеними нижче.

Повні хімічні синтетики артемізиніна включають багато енергозатратних стадій, для прикладу у 1987 році був розроблений 10-ти стадійний процес отримання артемізиніну з використанням циклогексану, по завершенню яких вихід речовини становив близько 9% [49].

Тому виходячи з цього, світові науковці шукають інші шляхи синтезу артемізиніну, серед них слід виділити неповні хімічні або напівсинтетичні синтетики артемізиніну з доступної вихідної біосинтетичної сировини – артемізинової кислоти та аморфадієну, які можна отримати за допомогою мікроорганізмів. Нижче детальніше описані дані способи.

Гідрування артемізинової кислоти до дигідроартемізинової кислоти на каталізаторах родієвих, або борогідратних,. Вихід становить до 99% при використанні родієвих каталізаторів і більше 90% при використанні борогідратних.

Відомий спосіб по окисленню киснем у середовищі дихлорметану при низькій температурі та опроміненні ультрафіолетом. Вихід артемізиніна становить 24%-39% при двох стадіях, схожий спосіб окислення киснем у

середовищі діазометану при низькій температурі та опроміненні ультрафіолетом. Вихід артемізиніна становить 20% при чотирьох стадіях [50].

Перспективним виглядає спосіб окисленням киснем у проточному реакторі середовищі трифтороцтової кислоти при кімнатній температурі та опроміненні ультрафіолетом. Вихід артемізиніна сягав 39% на потоці. Відновлення артемізиніну у середовищі етанолу до дигідроартемізиніна виробляється борогідридом натрію. Технологічна схема складається з трьох взаємопов'язаних модулів для отримання дигідроартемізиніна: артеметра, артеетра і артесунату. Очищення продуктів за допомогою градієнтної колонкової хроматографії проводиться у четвертому модулі. Вихід артеметра досягав 25% артесунату 48% кількості дигідроартемізиніна (рис. 1.3) [51].

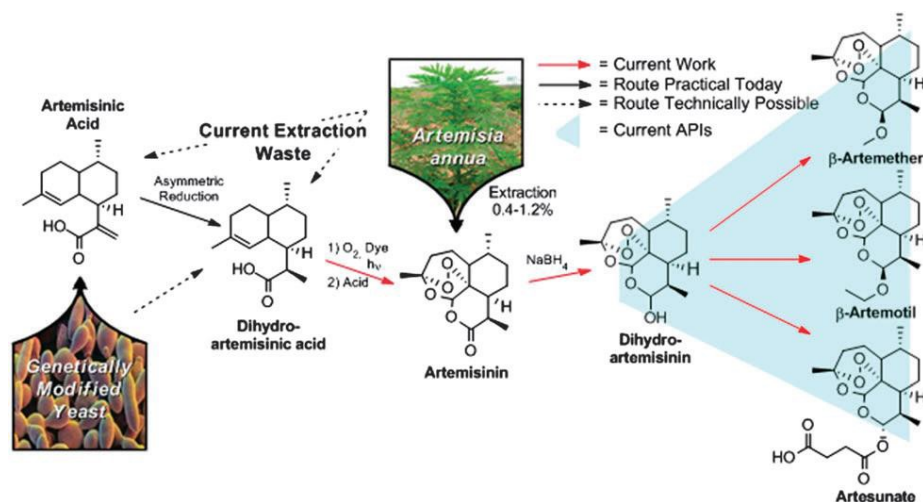


Рис.1.3. Схема отримання похідних артемізиніну

Каталітичне відновлення артемізинінової кислоти воднем дає суміш енантіомерів, які перетворюються на змішані ангідриди в системі – етилхлорформіат та карбонат калію. Змішані ангідриди при опроміненні ультрафіолетом у середовищі дихлорметану з використанням тетрафенілпорфірину, як фотосенсибілізатора та трифтороцтової кислоти, як ініціатора, проходять каскад реакцій – розщеплення по Хоку, додаткове окиснення, циклізація. Все перераховане і лягло в основу промислового процесу від компанії Sanofi, що має вихід артемізиніну до 55% від вихідної артемізинінової кислоти [51].

Аморфа-4,11-дієн є біогенетичним попередником артемізиніну і може бути отриманий з використанням інженерного штаму дріжджів, що містять необхідні гени полину в поєднанні з посиленням регулювання терпенового шляху. Вихід артемізиніну досягає 30% у дев'ять стадій, основний проміжний продукт – дигідроартемізинінова кислота, схема зображена на рис 1.4 [52].

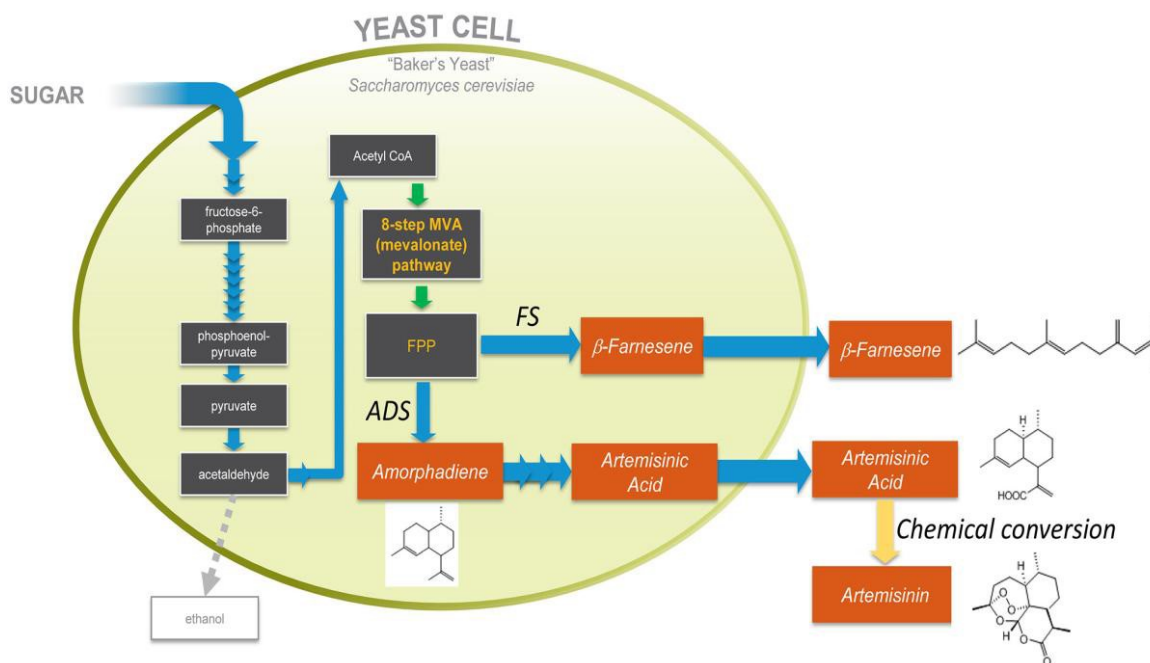


Рис. 1.4. Схема отримання артемізиніну з артемізинової кислоти за допомогою дріжджів.

Для мікроорганізмів процес очищення артемізиніну та його похідних після культивування дріжджів може включати такі кроки та методи:

- після культивування дріжджів у біореакторі культурна рідина, що містить артемізин, відокремлюється від біомаси. Це може бути виконано шляхом відокремлення дріжджів від рідини за допомогою фільтрації або центрифугування.
- відокремлена культурна рідина може містити різні домішки та компоненти, такі як білки, ліпіди, цукри та інші метаболіти дріжджів. Для видалення цих домішок може бути потрібна попередня обробка, така як фільтрація, осадження або осмотична дефібринація [48].
- екстракція: Артемізинінова кислота може бути вилучена з культурної рідини за допомогою екстракційних методів. Один з найпоширеніших

методів - екстракція розчинниками, де органічний розчинник, такий як етер або хлороформ, використовується для вилучення артемізинінової кислоти з водної фази. Після екстракції артемізинінова кислота може бути сконцентрована шляхом видалення розчинника [49].

- Хроматографія, для подальшого очищення артемізинінової кислоти і видалення домішок, що залишилися, застосовуються методи хроматографії. Хроматографія може містити колонкову хроматографію на гелі, зворотну фазу або інші види хроматографії, які можуть розділити артемізинінову кислоту від інших сполук на основі їх хімічних та фізичних властивостей [50].
- Кристалізація: Для отримання чистішої форми артемізинінової кислоти може бути застосована кристалізація. Це процес, при якому артемізинінова кислота виділяється у вигляді кристалів з розчину. Кристали можуть бути відфільтровані або відокремлені від розчину, а потім промиті і сушені для отримання [51].
- Додаткове очищення, залежно від необхідного рівня чистоти, можуть бути застосовані додаткові методи очищення, такі як діаліз, фільтрація через мембрану або використання іонного обміну. Ці методи допоможуть видалити залишкові домішки та покращити чистоту артемізинінової кислоти.

Наукові статті з проблематики виділення та очищення артемізинової кислоти (також відомої як артемізинін) надають важливі відомості про різні методи та технології, які застосовуються для отримання цієї активної сполуки [51].

Автор Ferreira описує методи екстракції та очищення артемізинової кислоти з рослинного матеріалу *Artemisia annua*. Розглядаються різні розчинники, включаючи етанол, метанол, ацетон і н-гексан, а також методи хроматографії для подальшого очищення [52].

Відомо про використання ультразвукової екстракції, мікрохвильової екстракції та інших нетрадиційних методів для підвищення виходу артемізиніну.

Розглянуті дослідження разом з іншими, надають важливі відомості про різні методи і технології, які використовуються для виділення та очищення артемізину та/або артемізинової кислоти. Результати досліджень, що описані в цих статтях, можуть бути корисними для розробки більш ефективних та економічних методів виділення та очистки артемізину та його похідних [53].

РОЗДІЛ 2. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

2.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ на основі обраної субстанції, галузей використання, потреби у ЛЗ

Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу (ЛЗ) на основі артемізиніну включає дослідження його ефективності, фармакокінетики, механізму дії, токсичності та безпеки. Артемізинін - це лікарська речовина, яка використовується в лікуванні малярії. Вона відноситься до класу антималярійних препаратів і головною фармакологічною властивістю артемізиніну є його здатність ефективно боротися з паразитом *Plasmodium*, що викликає малярію. Він виявляє протипаразитарну активність, діючи на різні стадії розвитку паразита, включаючи інвазію еритроцитів та внутрішньоклітинний розвиток [54].

Артемізинін відзначається високою швидкістю дії. Він здатний швидко знищувати паразити в еритроцитах, що дозволяє ефективно контролювати малярійну інфекцію, речовина може сприяти зменшенню паразитарної навантаженості шляхом пригнічення розмноження паразита і знищення заражених еритроцитів [55].

Артемізинін також може мати профілактичну дію, запобігаючи інвазії паразита в еритроцити та розвитку паразитарної інфекції.

Механізм дії артемізиніну включає декілька ключових етапів, після прийому артемізиніну в організмі, він пройде процес ферментативної активації. Артемізинін перетворюється відносно неактивний компонент, який називається дигідроартемізинін (DHA). Цей етап відбувається за участю залежних від гему монооксигеназ CYP450 ферментів, зокрема CYP2B6. DHA виявляє здатність утворювати вільні радикали в присутності залежних від гему ферментів, які можуть знаходитися у плазмі крові або виштовхуватися

					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Степаненко І.Ю.			РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для лікарського засобу	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					39	19
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

плазмочитами паразита. Ці вільні радикали, включаючи гідроксильні радикали, можуть бути важливими для антималярійної активності артемізиніну [55-56].

ДНА і вільні радикали, утворені під час його розщеплення, взаємодіють з гемом (залежним від заліза пігментом), який міститься у гемоглобіні еритроцитів. Ця взаємодія призводить до утворення циклічних пероксидів, які можуть пошкоджувати клітинні мембрани паразита, включаючи його плазматичну мембрану та ендоплазматичну мережу [57-58].

Пошкодження мембран і ендоплазматичної мережі призводить до руйнування паразитів, що проживають у еритроцитах. Артемізинін також може сприяти формуванню гем-білків.

Поміж іншими фармакологічними властивостями артемізиніну є також антиоксидантна активність, протівірусна дія проти ВІЛ-1, протимікробна активність проти різноманітних бактерій та грибів, антиканцерогенна дія та протизапальна активність [58-59].

Також відомо, що артемізинін може мати корисні ефекти для лікування гіпертонії, та бути корисним для захисту від інсульту. Проте, вивчення цих властивостей ще триває, і їх застосування потребує подальших досліджень.

Артемізинін і його похідні, такі як артесунат і артеметер, використовуються як активні інгредієнти у препаратах для лікування малярії. Деякі з торгових марок, що містять артемізинін або його похідні:

Artesunate (Артесунат): Arsumax, Artenam, Artesol, Arsumax.

Artemether (Артеметер): Artenam, Co-Artem, Arsumax.

Artemisinin Combination Therapies (ACT) (Комбінована терапія з артемізиніну): Co-Artem, Duo-Cotecxin, Artesunate-Amodiaquine.

Важливо зауважити, що доступність торгових марок може різнитися залежно від регіону та країни.

Згідно з статистичними даними ВООЗ, у 2020 році приблизно 229 мільйонів нових випадків малярії було зареєстровано в країнах, де виявлена

малярія. Відомо, що попит на антималярійні препарати був значним в цих регіонах для лікування та контролю цієї хвороби [60-62].

Найбільш поширені антималярійні препарати, що використовуються в лікуванні малярії, включають:

Артемізінінові комбіновані терапії (АКТ): Це комбінація артемізініну або його похідних з іншими антималярійними препаратами, такими як амодіаквін, мефлоквін, люмефантрин і доксициклін.

Хлороквін - препарат був широко використовуваний для лікування малярії, але у деяких регіонах з'явилися резистентні штами паразитів до цього препарату.

Примаквін - препарат також використовується для лікування малярії, зокрема в разі виявлення резистентності до хлороквіну.

Дозування артемізіну для лікування малярії може варіюватися залежно від країни, протоколу лікування та ступеня важкості хвороби. Зазвичай, артемізінін або його похідні використовуються в складі комбінованої терапії, наприклад, артеметер-люмефантрин (Co-Artem), артесунат-амодіаквін або дигідроартемізінін-піперахін [62-63].

2.2. Обґрунтування вибору форми випуску протипаразитарного препарату

Паразитарні захворювання в наш час залишаються найбільш частим видом патології, які завдають велику шкоду здоров'ю. За офіційними статистичними даними, в Україні щорічно реєструються близько 100 тисяч випадків захворювань, із них 80% у дітей до 17 років [64].

Тому необхідним є підбір оптимальної форми випуску протипаразитарного препарату з артемізіном, а також вибір первинного та вторинного пакування.

2.2.1. Обґрунтування форми випуску препарату

Антималярійні препарати випускаються в різних формах, що дає можливість вибрати найбільш підходящий варіант для пацієнта з

урахуванням його віку, стану здоров'я, специфіки захворювання та інших факторів:

- Таблетки та капсули — найбільш поширена форма випуску лікарських засобів . Вони зручні для вживання та дозування.
- Суспензії чи сиропи — зазвичай використовуються для дітей, які можуть мати труднощі з ковтанням таблеток. Засоби мають приємний смак, що спрощує їх вживання.
- Ін'єкції — при серйозних інфекціях, можуть вводитися ін'єкціями внутрішньом'язово чи внутрішньовенно [65].

Розглянемо переваги та недоліки двох найпоширеніших лікарських форм – таблетки та капсули.

Капсули – тверді лікарські засоби з твердою або м'якою оболонкою, різної форми і місткості. Це дозована лікарська форма, яка складається з діючих і допоміжних речовин, поміщених в оболонку, та містить одну дозу діючої речовини. Капсулюють лікарські речовини різної хімічної природи і спрямованості дії, включаючи препарати рослинного походження, вітаміни, антибіотики і їх суміші в різноманітних комбінаціях з іншими речовинами, снодійні, протисудомні, транквілізатори, антигельмінтні, проносні, діуретики, анальгетики, складні вітамінні суміші з мікроелементами [66].

Особливо різноманітні комбінації кислоти ацетилсаліцилової з різними речовинами (кислотою аскорбіновою, атропіном, барбітуратами, камforoю, фенацетином, ефедрином тощо). Капсули призначені для внутрішнього, іноді для ректального, вагінального й інших способів застосування. Залежно від локалізації оральні капсули поділяють: на сублінгвальні, шлунково-розчинні та кишково-розчинні.

Переваги лікарських засобів в желатинових капсулах:

- висока біодоступність;
- точність дозування;
- гарний зовнішній вигляд;
- легко проковтуються, швидко набухають;

- желатинові капсули легкокорозчинні, вони проникні для травних соків і лікувальна дія лікарської речовини проявляється швидко (у середньому через 4 – 5 хв). Шляхом введення до складу желатинових стінок допоміжних речовин або покриття спеціальними плівками вдається одержувати капсули з різною швидкістю вивільнення й локалізацією дії лікарської речовини;

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

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

- виготовлення капсул майже цілком механізоване й автоматизоване. Перевагою капсул є можливість з їхньою допомогою поліпшувати терапевтичну активність діючих речовин, пролонговувати їхню дію, забезпечувати розчинення в певному відділі ШКТ, а також їх ректальне застосування. Ректальне застосування капсул обумовлене високою всмоктувальною здатністю слизової оболонки прямої кишки, що дозволяє економно витратити лікарський засіб, вміщений в оболонку. Ректокапсули швидше вивільняють свій вміст, не подразнюючи слизову оболонку кишечника [66].

Недоліки лікарських засобів в желатинових капсулах:

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

- желатинова маса є прекрасним середовищем для розвитку мікроорганізмів;

- висока чутливість до вологи – гігроскопічність.

Таблетки – тверда лікарська форма, одержувана шляхом технологічного оброблення й пресування лікарських і допоміжних, речовин, призначена для внутрішнього, зовнішнього, сублінгвального, імплантаційного або парентерального застосування. Назва "таблетки" походить від латинського слова "tabella" – дощечка, плитка. Тому різні лікарські форми, подібні за формою до дощечки або плитки, тепер називають таблетками або тритураційними таблетками, незалежно від їхніх технологічних особливостей.

Виробництво таблеток у світі щорічно зростає на 10 – 15%. За даними ВООЗ, такі темпи збережуться до середини ХХІ ст. Таблетки як лікарська форма одержали широке розповсюдження й у країнах СНД. Обсяг виробництва звичайних таблеток становить близько 90%, дражированих – 9 – 4%, із сухим покриттям – 0,5%, із плівковим – близько 0,1%. Їхня популярність обумовлена рядом позитивних якостей у порівнянні з іншими лікарськими формами.

Таблетки мають такі переваги:

1. Медико-фармацевтичні – зручність застосування; точність дозування; регулювання всмоктування лікарських речовин з таблеток за місцем локалізації (шлунок, кишечник) і в часі; можливість сполучати несумісні за фізико-хімічними властивостями і терапевтичній дії лікарські речовини; можливість маскуванню неприємного запаху, смаку, кольору й здатності до забарвлення.

2. Виробничі – висока продуктивність і економічність у порівнянні з іншими лікарськими формами; можливість повної механізації й автоматизації виробництва; гігієнічність і масовість виробництва.

3. Експлуатаційні – висока компактність; портативність; стійкість до впливу несприятливих механічних і кліматичних факторів; зручність транспортування, зберігання й відпускання, тривалий строк придатності [66].

Однак таблеткам властиві й деякі недоліки:

1. Дія лікарських речовин може розвиватися відносно повільно.
2. Таблетки неможливо ввести хворому при блювоті, у непритомному стані.
3. При тривалому зберіганні деякі таблетки можуть цементуватися, що призводить до зміни часу розпадання.
4. До складу таблеток часто вводяться баластні речовини, що не мають терапевтичної цінності, які іноді викликають деякі побічні явища (наприклад, тальк подразнює слизові оболонки).
5. Окремі лікарські речовини утворюють у зоні розчинення висококонцентровані розчини, які можуть викликати сильне подразнення слизових оболонок. Усувають цей недолік шляхом розчинення таблеток у певній кількості води.
6. Не всі хворі, особливо діти, можуть вільно проковтувати таблетки [66].

Сучасний фармацевтичний ринок пропонує спектр протипаразитарних препаратів, з варіаціями діючих речовин. На сьогодні, найбільш часто як активний агент антигельмінтиків використовують «Альбендазол» – синтетичний препарат із групи похідних бензimidазолу. Серед усіх зареєстрованих в Україні лікарських препаратів з діючою речовиною «Альбендазол» 57,1% випускається у формі таблеток, 21,4% – суспензій [64].

Серед таблетованих форм українського виробництва (75%) препаратів «Альбендазолу» є «Альбендазол» ТОВ Тернофарм; «Ангельмекс» ТОВ Агрофарм; «Альбела» ТОВ «Кусум Фарм»; «Альдазол» АТ Київський вітамінний завод; імпорتنі становлять 25%, серед яких «Ворміл» (Індія) та «Зентел» (Південна Африка).

У вигляді суспензій – «Фармокс» виробляє фармацевтична компанія ТОВ «ДКП Фармацевтична фабрика» (Україна), що становить 33,3%, інші 66,7% представлені імпортними препаратами «Ворміл» (Індія) та «Зентел» (Франція).

Протигельмінтною дією володіють препарати з активною речовиною пірантелу памоатом, який на українському ринку представлений у таблетованій, суспендованій та порошкових формах [64].

Таким чином, обираємо таблетовану форму випуску антигельмінтного препарату артемізіну після культивування *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки антигельмінтного препарату

Пакування готових лікарських засобів виконує такі важливі функції:

- ✓ збереження товару і захист його від дії зовнішнього середовища;
- ✓ створення раціональних одиниць для транспортування, навантаження і розвантаження товарів;
- ✓ створення раціональних одиниць для їх складування;
- ✓ забезпечення оптимальних — за масою і об'ємом — одиниць для продажу товару;
- ✓ це комунікативний, рекламний та стимулювальний засіб збуту продукції [67].

Вибір виду пакування залежить:

- ✓ від маси та об'єму товару при оптимальному використанні транспортних засобів і засобів складування;
- ✓ рівня пристосування пакування до засобів автоматизації вантажно-розвантажувальних робіт, транспортування і складування товару в клієнтів;
- ✓ транспортних засобів і шляхів перевезення товару.

Таблетки складають приблизно 70% від загального випуску готових лікарських засобів. Таблетки пакують у різноманітну тару, у тому числі в полімерну (блістери).

Блістери — це прозоре контурне коміркове пакування, виготовлене з полімерної плівки, яке має форму, подібну до товару. Блістери виготовляють з полімерної плівки, яка, як правило, утворює достатньо жорсткий каркас.

Завдяки таким властивостям вона захищена від механічних пошкоджень, попадання вологи і забруднень.



Рис. 2.1. Блістер.

Блістери виробляють з різних видів плівки, отже, можна знайти оптимальне рішення для товару. Крім того, сучасна полімерна плівка, з якої виготовляються блістери, довговічна, проста і з легкістю переробляється [67].

Матеріали для виготовлення полімерної плівки можуть бути різні: поліпропілен, поліетилен, полівінілхлорид, полівінілденхлорид та ін., що дає простір для оптимального рішення в залежності від результатів вивчення стабільності готового лікарського засобу [68].

Для захисту таблеток від чинників зовнішнього середовища та інформативності пакувальна система представлена не лише блістером, але й фольгою.

Фольга алюмінієва застосовується для пакування лікарських препаратів, виробів медичного призначення, продукції косметичної промисловості, а також для виробництва пакувальних матеріалів на основі алюмінієвої фольги (ГОСТ 745— 2014). Фольга виготовляється з алюмінію марок АТ (з кількістю алюмінію 99,6 %), А1 (алюмінію 99,5 %) і А2 (алюмінію 99,0% відповідно). За ГОСТ 745—2014 випускається фольга таких марок [69]:

- 1) гладка - ФГ,
- 2) лакована з одного боку -ФЛ,
- 3) лакована з двох сторін – ФЛЛ,
- 4) з лаком термозварювальним з однієї сторони - ФТЛ,
- 5) фарбована кольоровим лаком або фарбою з однієї сторони або з двох сторін – ФО,

- 6) друкована з однієї або з двох сторін - ФП,
- 7) з друком по одній стороні та лакуванням з іншої сторони - ФПЛ,
- 8) фарбована з однієї сторони та лакована з іншої сторони - ФОЛ,
- 9) друкована з однієї сторони та з лаком термозварювальним з іншої сторони - ФПТЛ,
- 10) лакована з однієї сторони та з лаком термозварювальним з іншої сторони - ФЛТП,
- 11) друкована з лаком поверх друку з однієї сторони та з лаком термозварювальним з іншої сторони - ФЛПТЛ,
- 12) з друкованим лаком термозварювальним по друку з однієї сторони та лакована з іншої сторони - ФТЛПЛ,
- 13) з лаками термозварювальними з двох сторін - ФТЛТЛ.

Фольгу випускають тиснену, забарвлену, лаковану (для підвищення антикорозійних властивостей), кашовану (склеювання фольги з папером) та ін. На фользі допускаються поодинокі дрібні отвори, видимі оком проти світла, що не мають рядкового та місцевого розташування. Торці рулонів мають бути без забруднень, забоїн і вмятин [69].

Отже, для пакування таблеток з артемізиніном обираємо фольгу з друком по одній стороні та лакуванням з іншої сторони марки ФПЛ. Така фольга обумовлює захист від впливу світла, води, парів, газів, високих/низьких температур, мікроорганізмів та механічної дії, а також за рахунок друку з одного боку виконує інформативну функцію, оскільки споживач може швидко ідентифікувати назву препарату, його дозування, виробника, термін придатності тощо.

Вторинне пакування — пакування, яке призначене для захисту первинного пакування (його збереження) і для докладнішого комплексу інформативних відомостей. Вторинне пакування дозволяє здійснювати найбільш простий і зручний облік, а також контролювати лікарські препарати. Як вторинне пакування застосовують картонні або полімерні пачки, коробки. У ряді випадків вторинне пакування створює додаткову

герметизацію і захист первинного пакування від дії зовнішніх чинників. Вторинне пакування також належить до споживчого [67].

Отже, первинною упаковкою антималярійного препарату артемізіну є блістер, по 30 таблеток у блістері відповідно; вторинним пакуванням є картонна пачка у комплекті з листівкою-вкладкою для застосування.

2.3. Обґрунтування вибору біологічного агента для отримання субстанції

На сьогоднішній день залишається актуальним питанням пошуку ефективних та безпечних продуцентів артемізініну [49].

Для того, щоб обрати найефективнішого біологічного агента, необхідно порівняти їх. Порівняння здійснюється в 3 етапи.

На першому етапі вибору різні штами продуцентів порівнюються за показниками утворення артемізініну: концентрація цільового продукту, час за який вона утворена та склад поживного середовища необхідного для отримання даного продукту, всі ці данні наведені в табл. 2.1.

При виборі даних біологічних агентів особлива увага приділялася кількості та типу утвореного продукту – артемізініну чи його прекурсорів, а також часу за який його було утворено.

Так штам *S. cerevisiae* Sc457 продукує прекурсор артемізініну за 130 годин, даний штам продукує 1,7 г/л дигідроартемізинової кислоти [47] також про штам Y1283, який здатен синтезувати до 0,6 г/л артемізініну, що в порівнянні з іншими мікроорганізмами доволі небагато.

Інший штам *S. cerevisiae*, який розроблений китайськими вченими [69] продукує артемізинової кислоти з продуктивністю 10,2 г/л протягом 90 годин. Даний штам *S. cerevisiae* проявляє високу продуктивність і може використовуватись в промислових масштабах [70].

Таблиця 2.1

Поживні середовища для культивування штамів мікроорганізмів, які продукують прекурсори артемізиніну

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація цільового продукту	Тривалість процесу, год	Особливості технологічного процесу	Використана література
<i>S. cerevisiae</i> <i>Sc457</i>	Глюкоза – 40,0 KН ₂ PO ₄ – 8 (NH ₄) ₂ SO ₄ , – 15,0 MgSO ₄ * 7H ₂ O – 6,2 Розчин вітамінів – 12 мл/л Розчин мікроелементів – 10 мл/л Склад розчину вітамінів: Біотин – 0,05, Пантотенат кальцію – 1 Нікотинова к-та – 1; Міо-інозитол – 25 Тіамін – 1; Придоксин – 1; Аденін – 2 4-Амінобензойна кислота – 0,2; Склад розчину мікроелементів: ZnSO ₄ 7H ₂ O – 5,75, MnCl ₂ 4H ₂ O – 0,32, CuSO ₄ – 0,32, CoCl ₂ 6H ₂ O – 0,47, Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O – 0,48, CaCl ₂ 2H ₂ O – 2,9, FeSO ₄ 7H ₂ O – 2,8, EDTA – 80 мл/л	1,7 г/л дигідроартемізинової кислоти	130	Початковий рН 5,0. Основний етап культивування проводили в 5-літровому ферментері (Kobiotech, Інчхон, Корея), за температури 30°C швидкість перемішування підтримувалася в межах 400 - 600 об / хв, для того ,щоб підтримувати концентрацію розчиненого кисню вище 40%	Bo-Xuan Zeng, Ming-Dong Yao, Ying Wang Wen-Hai Xiao and Ying-Jin Yuan. Metabolic Engineering of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for Enhanced Dihydroartemisinic Acid Production // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology – 2020. - V. 8. – p.1-11 doi: 10.3389/fbioe.2020.00152

<p><i>S. cerevisiae</i> Y1283</p>	<p>Глюкоза – 386,0 KH_2PO_4 – 9 K_2SO_4, – 3,5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,12 Na_2SO_4 - 0.28 Етанол -237 мл Розчин вітамінів – 12 мл/л Розчин мікроелементів – 10 мл/л Склад розчину вітамінів: Біотин – 0,05, Пантотенат кальцію – 1 Нікотинва к-та – 1; Міо-інозитол – 25 Тіамін – 1; Піридоксин – 1; Аденін – 2 4-Амінобензойна кислота – 0,2; Склад розчину мікроелементів: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,75, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,32, CuSO_4 – 0,32, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,47, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,48, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 2,9, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,8, EDTA – 80 мл/л</p>	<p>0,6 г/л артемізиніну</p>	<p>72 год.</p>	<p>Основний етап культивування проводили в 2-літровому ферментері, за температури 30°C швидкість перемішування підтримувалася в межах 500 об / хв, для того ,щоб підтримувати концентрацію розчиненого кисню вище 30%</p>	<p>C. J. Paddon, P. J. Westfall, D. J. Pitera at el.-K. <i>High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin.</i> Nature, – 2013. - 496, P. 528–532. https://doi.org/10.1038/nature12051</p>
---------------------------------------	---	---------------------------------	----------------	---	--

<p><i>S. cerevisiae</i></p>	<p>Глюкоза – 19,5 метіонін – 0,25 (NH₄)₂SO₄, – 15,0 KH₂PO₄ – 8 MgSO₄ * 7H₂O – 6,15 Розчин вітамінів – 12 мл/л Розчин мікроелементів – 10 мл/л Склад розчину вітамінів: Біотин – 0,05, Пантотенат кальцію – 1 Нікотинва к-та – 1; Міо-інозитол – 25 Тіамін – 1; Придоксин – 1; Аденін – 2 4-Амінобензойна кислота – 0,2; Склад розчину мікроелементів: ZnSO₄ 7H₂O – 5,75, MnCl₂ 4H₂O – 0,32, CuSO₄ – 0,32, CoCl₂ 6H₂O – 0,47, Na₂MoO₄ 2H₂O – 0,48, CaCl₂ 2H₂O – 2,9, FeSO₄ 7H₂O – 2,8, EDTA – 80 мл/л</p>	<p>10,2 г/л</p>	<p>90 год.</p>	<p>Параметри культивування температура - 30°C швидкість перемішування - ±500 об / хв, концентрація розчиненого кисню ±40%</p>	<p>Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., Banat, I. M. <i>Rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection.</i> Journal of Basic Microbiology, – 2017. - V.57(5), P.364-375. doi:10.1002/jobm.201600658.</p>
-----------------------------	---	-----------------	----------------	---	--

На другому етапі порівнюється вартість поживних середовищ для культивування обраних продуцентів (табл. 2.2).

З табл. 2.1 видно, що всі автори використовують за базове середовище одне і теж, яке було вперше згадано в 2007 році, тому при розрахунку вартості середовища, будемо враховувати лише вартість основних компонентів, що входять до середовища, оскільки кількості розчину вітамінів та мікроелементів будуть однакові та знаходяться в дуже малих кількостях, тому при розрахунку їх не враховуватимемо, з цього виходить, що вартість 1 л середовища для культивування *S. cerevisiae* Y1283 коштує найбільше з решти продуцентів - 69,93 грн, найдешевшим продуцентом є *S. cerevisiae* з ціною 4,27 грн.

Таблиця 2.2

Вартість поживних середовищ для культивування штамів мікроорганізмів, які продукують прекурсори артемізиніну

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело (1, 2, 3, 4)*
<i>S. cerevisiae</i> <i>Sc457</i>	Глюкоза – 40	108	4,32	1
	KH ₂ PO ₄ – 8	195	1,56	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄ , – 15,0	31	0,465	2
	MgSO ₄ * 7H ₂ O – 6,2	10	0,062	3
	Вартість 1 л середовища – 4,61 грн			
<i>S. cerevisiae</i> <i>Y1283</i>	Глюкоза – 386,0	108	41,68	2
	KH ₂ PO ₄ – 9	195	1,75	2
	K ₂ SO ₄ , – 3,5	100	0,35	5
	MgSO ₄ * 7H ₂ O – 5,12	10	0,051	3
	Na ₂ SO ₄ - 0.28	110	0,03	6
	Етанол -237 мл	110	26,07	7
Вартість 1 л середовища – 69,93 грн				
<i>S. cerevisiae</i>	Глюкоза – 19,5	108	2,11	1
	метіонін – 0,25	310	0,08	8
	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 15,0	31	0,46	3
	KH ₂ PO ₄ – 8	195	1,56	2
	MgSO ₄ * 7H ₂ O – 6,15	10	0,06	3
Вартість 1 л середовища – 4,27 грн.				

Примітка: * – ціни наведено з урахуванням ПДВ станом на грудень 2022 р.:

1. <https://prom.ua/ua/p1187606664-glyukoza-dekstroza-1kg.html>
2. <https://prom.ua/ua/p1091383043-monofosfat-kaliya-kalij.html?&primelead=My42>
3. <https://prom.ua/ua/p1728950993-sulfat-amoniyu-amonij.html>
4. <https://prom.ua/ua/p509984645-sulfat-magniyu-semivodnyj.html>
5. <https://prom.ua/ua/p1032553548-sulfat-kaliya-k2o.html>
6. <https://prom.ua/ua/p1447102459-natrij-sernokislyj-1kg.html?&primelead=MC45NQ>
7. <https://prom.ua/ua/p1479645126-etanol-tehnicheskij-20l.html>
8. <https://prom.ua/ua/p1010790225-metionin-kormovyjprodazha.html>

На третьому етапі продуценти порівнюються за умовною вартістю 1 г утвореної ними прекурсору артемізиніну (табл. 2.3).

З даних наведених у табл. 2.3 видно, що найменшу умовну вартість 1 г продукту має *S. cerevisiae*, який продукує прекурсори. Слід відмітити, що концентрація цільового продукту синтезованого за годину у даного штаму також найвища у порівнянні з усіма наведеними в таблиці мікроорганізмами.

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г продукту при культивуванні штамів мікроорганізмів, які продукують прекурсори артемізиніну

Продуцент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація цільового продукту, г/л	Умовна вартість 1 г продукту, грн	Тривалість культивування, год	Концентрація продукту, синтезованого за год, г/л
<i>S. cerevisiae</i> <i>Sc457</i>	4,61	1,7 г/л дигідроартемізинової кислоти	2,71	130	0,01
<i>S. cerevisiae</i> <i>Y1283</i>	69,93	0,6 г/л артемізиніну	116,55	72	0,008
<i>S. cerevisiae</i>	4,27	10,2г/л артемізинінової кислоти	0,41	90	0,11

Підсумовуючи дані, наведені у табл. 2.1, табл. 2.2 і табл. 2.3, продуцентом прекурсору артемізиніну обирається штам *S. cerevisiae*, оскільки, він вирощується на порядок дешевшому середовищі, яке складається з дешевих солей в не великій концентрації також він має найнижчу умовну вартість 1 г продукту, лише 0,41 грн і синтезує найбільшу кількість продукту за годину.

Слід відмітити, що всі обрані штами є перспективним продуцентами і на даний момент тривають наукові дослідження з оптимізації процесу культивування та виходу прекурсорів артемізиніну.

2.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції

За даними ВООЗ загальна кількість хворих на малярію у світі за 2021 рік становить 230 млн хворих. Зрозуміло що в африканських та латино-американських регіонах доступ до дешевих ліків низький через низький рівень життя, тому для розрахунку річної потреби розглянемо саме цей регіон, тому звернемо увагу на Латинську Америку. Згідно відкритих даних ВООЗ кількість випадків малярії за 2021 рік близько 1.1 млн випадків [71].

Загально прийнята доза артемізиніну в комбінованій терапії для лікування малярії у дорослих становить близько 500 мг на добу, розподілені на протягом 3-5 днів. Це означає, що курс лікування може вимагати від 1500 до 2500 мг артемізиніну або його еквіваленту.

Проте, важливо зазначити, що конкретна доза артемізиніну може бути змінена залежно від рекомендацій лікаря та індивідуальних характеристик пацієнта, тому приймемо, що на курс візьмемо 2000 мг артемізиніну.

Також слід зауважити, що існує близько 10 активних фармацевтичних інгредієнтів проти малярії, які використовуються як в монотерапії та в комбінації, тому враховуючи інформацію вище, для розрахунку потреби монотерапії артемізиніном будемо проводити розрахунок для 10 % хворих на малярію, а це 110 тис хворих [72].

Зробимо розрахунок загальної потреби в артемізиніну на 110 тис. хворих:

$$\text{Загальна потреба} = 110\,000 * 2000 \text{ мг}/1000 = 220 \text{ тис. г} = 220 \text{ кг}$$

Враховуючи, що в світі є виробники артемізиніну в тому числі основна частина отримується з рослини *Artemisia annua*, тому ми зможемо забезпечити близько 10 відсотків від потреби в артемізинінові, а це $220 * 0,1 = 22 \text{ кг}$.

Узагальнені дані щодо потреби артемізиніну наведені у табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Вихідні дані для розрахунку річної потреби в артемізиніну

Захворювання	Тривалість прийому, днів	Кількість на 1 людину, мг	Загальна кількість хворих в регіоні, млн	Загальна потреба, млн	Потреба в біотехнологічному артемізиніну, кг
Малярія	3-5	2000	1,1	220 кг	22

Відомо, що концентрація артемізинової килоти (попередника артемізиніну) 10,2 г/л розрахуємо загальну кількість культуральної рідини:

$$10,2 \text{ г} - 1 \text{ л}$$

$$22\,000 - x$$

$$x = 2157 \text{ л культуральної рідини за рік}$$

Річна потреба соматотропіну складає $G_{\text{гп}} = 22 \text{ кг}$.

Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{\text{рд}}$) 200, тоді кількість продукту за цикл становить:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{гп}} \times T_{\text{цф}} / 24 \times T_{\text{рд}} = 22 \times 100 / 24 \times 200 = 0,458 \text{ кг/цикл}$$

де $T_{\text{цф}}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (90 год) та час підготовки ферментера до роботи. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація апарату (2 год), охолодження апарату (1,5 год),

завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

$$\text{Отже, } T_{\text{цф}} = 90+2+2+2+1,5+1+0,5+1=100 \text{ год}$$

$$\text{Кількість циклів: } N_{\text{ц}} = G_{\text{гп}}/G_{\text{цк}} = 22/0,458 = 48$$

Враховуючи частку сухих речовин в готовому продукті, яка складає $C_{\text{гп}}=0,95$, кількість артемізинової кислоти, що синтезує продуцент ($P_{\text{кр}}=10,2$ г/л), $K1$ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (приймаємо $K1= 1,1$), та втрати при виділенні ($E_{\text{св}}=50\%$), об'єм культуральної рідини складатиме:

$$V_{\text{кр}} = K1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot C_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} (1 - E_{\text{св}}) = 1,1 \cdot 0,458 \cdot 0,95 / 10,2 \cdot (1 - 0,5) = 0,091 \text{ м}_3/\text{цикл} = 91 \text{ л/цикл.}$$

РОЗДІЛ 3. ОБГРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

3.1. Відокремлення біомаси від рідкої фази

При культивуванні біооб'єктів в багатьох біотехнологічних процесах утворюються двофазні системи, в яких тверда фаза – маса клітин продукту біосинтезу (біомаса), а рідка – рідина з розчиненими залишками живильних речовин та продуктами біосинтезу, в якій проходив процес культивування біомаси (культуральна рідина) [73].

Методами відділення біомаси від культуральної рідини є сепарування та центрифугування; фільтрація; осадження за допомогою флокулянтів; дистиляція; сублімація; зневоднення (випаровування, сушіння); ліофілізація; заморожування; осадження шляхом змін розчинності речовини; кристалізація; сорбція; екстракція; ультрафільтрація на мембранних фільтрах [73]. Розглянемо детальніше найчастіше використовувані методи відділення біомаси.

Фільтрація

У виробництвах, де цільовим продуктом є один з метаболітів, розчинений в культуральній рідині, для відділення клітин біомаси від розчину найчастіше використовують фільтрацію. Вона полягає в розділенні суспензії при її пропусканні через пористу перегородку. Основна характеристика процесу — швидкість фільтрації (кількість фільтрату, що отримується з одиниці фільтруючої поверхні в одиницю часу). Процес фільтрації, при якому відбувається накопичення осаду, здійснюють у фільтрах застарілої конструкції — фільтр-пресах. Вони характеризуються низькою швидкістю фільтрації, але головне — низьким ступенем механізації (вивантаження осаду проводять уручну); неможливо забезпечити дотримання санітарно-гігієнічних вимог [74].

					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування післяферментаційних процесів	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Степаненко І.Ю.					58	14
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

Проте при фільтрації деяких культуральних рідин, зокрема культуральній рідині актиноміцетів, питомий опір драглистого осаду, що утворюється, дуже великий. Навіть тонкий шар осаду, який залишається після того, що зрізає ножом, призводить до різкого зниження швидкості фільтрації. Для інтенсифікації процесу рідину заздалегідь обробляють (кислотна або теплова коагуляція обробка електролітами) або використовують барабанні вакуумфільтри з намивним шаром допоміжного матеріалу фільтрації. Останній є тонкодисперсний порошок (найчастіше перліт або діатоміт), який намивають на фільтрувальну тканину перед початком фільтрації культуральної рідини. Він оберігає пори фільтрувальної тканини від закупорювання, збільшуючи тим самим швидкість фільтрації. Крім того, в барабанних вакуум-фільтрах, призначених для роботи з намивним шаром, передбачено повільне переміщення ножа для того, що зрізає осаду до поверхні барабана в процесі фільтрації (0,1— 0,2 мм за оборот). Це забезпечує постійне оновлення поверхні фільтрації і, отже, високу швидкість фільтрації. Наприклад, при фільтрації культуральної рідини тетрацикліну на барабанному вакуум-фільтрі з намивним шаром перліту досягається середня швидкість фільтрації 150—180 л/(м² год), а для фільтрпресу цей показник не перевищує 25—30 л/(м² год) [74].

Центрифугування

У мікробіологічній промисловості центрифуги широко використовують для розділення суспензій, що містять до 5 – 10% твердої фази (найчастіше, мікробних клітин), і для сепарації емульсій. Двофазну систему залежно від властивостей можна розділити методом відцентрового фільтрування або відцентрового осадження, тому центрифуги діляться на ті, що фільтрують (фільтруючі) і осаджувальні. У свою чергу, серед осаджувальних центрифуг зазвичай виділяють велику групу з барабанами тарільчатого типу, звану рідинними сепараторами. Швидкість розділення сумішей в центрифугах значно вища, ніж у фільтрах і відстійниках, завдяки більшій рушійній силі,

що виникає при обертанні ротора центрифуги разом з суспензією, що знаходиться в ній, або емульсією [74].

Сепарування

Першим етапом постферментаційної стадії є фракціонування культуральної рідини й відділення зваженої фази - біомаси. Найпоширеніший для цих цілей метод - сепарації, який здійснюється в спеціальних апаратах - сепараторах, які працюють по різних схемах залежно від властивостей оброблюваної культуральної рідини [75].

Суспензія, що розділяється, через розподільну трубу і внутрішню порожнину тарілотримача подається до нижньої (периферичною) частини міжтарілочатого простору барабана. При цьому важчі частинки твердої фази відкидаються до нижніх поверхонь тарілок, сповзають вниз і накопичуються на стінці барабана у вигляді твердого осаду або суспензії. Освітлена рідка фаза відводиться з верхньої частини барабана. Залежно від способу вивантаження осаду сепаратори ділять на машини безперервно-циклічної дії з ручним або механізованим вивантаженням осаду і безперервної дії [74].

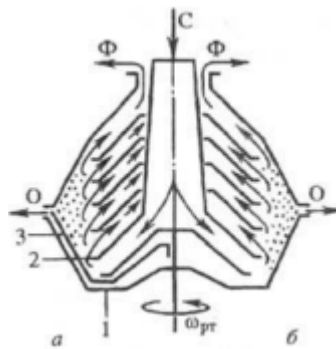


Рис. 3.1. Сепаратор для розділення суспензій - сепаратор очищувач. 1 - ротор; 2 - пакет тарілок; 3 - рухоме днище.

У сепараторах безперервно-циклічної дії рідкі (точніше, текучі) фракції віддаляються з барабана безперервно, а твердий осад — періодично, у міру накопичення. При розділенні емульсій з мінімальним змістом твердих частинок (до 0,1%) використовують сепараторів з ручним вивантаженням осаду, при розділенні суспензій із змістом твердої фази до 3 – 5% – з механізованим вивантаженням осаду під дією відцентрової сили. Осад в

такому сепараторі вивантажується періодично, після припинення подачі суспензії. За допомогою спеціального механізму відкривають отвори в зовнішній стінці барабана, через які осад віддаляється.

Сепаратори безперервно забезпечують розділення дії суспензій з безперервним відведенням всіх фракцій, що утворюються. Для вивантаження осаду в таких машинах використовують сопла або клапани, встановлені в периферичній частині барабана.

Сепаратори безперервно-циклічної дії з механізованим вивантаженням осаду широко застосовують для відділення біомаси у виробництві антибіотиків, ферментів, бактерійних препаратів [74].

Для підвищення ефективності процесу сепарації застосовують попередню спеціальну обробку культури - зміна рН, нагрівання, додавання хімічних агентів [75].

Тому для відокремлення біомаси з метою одержання артемізинової кислоти обираємо метод сепарування, оскільки такий спосіб дозволяє ефективно розділити тверду та рідку фази із забезпеченням швидкості процесу.

3.2. Виділення артемізинової кислоти

3.2.1. Екстракція артемізинової кислоти

Процеси екстракції в системах рідина-рідина знаходять широке застосування в хімічній, нафтопереробній і нафтохімічній та інших галузях промисловості. Вони ефективно використовуються для виділення в чистому виді різних продуктів органічного і нафтохімічного синтезу, вилучення і розділення рідких і розсіяних елементів, очищення стічних вод і т. ін. Екстракція в системах рідина-рідина являє собою дифузійний процес, що протікає за участю двох взаємно нерозчинних або обмежено розчинних рідких фаз, між якими розподіляється речовина, що екстрагується (або кілька речовин). У результаті взаємодії екстрагента з вихідним розчином утворюються: екстракт – розчин вилучених з вихідної суміші компонентів в

екстрагенті і рафінат – рідка суміш, яка збіднена компонентами, що вилучаються, і яка містить деяку кількість екстрагента [76].

Розділення рідкої суміші методом екстракції складається з наступних процесів:

- 1) змішування вихідної суміші з екстрагентом для створення між ними тісного контакту;
- 2) розділення двох рідких фаз, що не змішуються (екстракту і рафінату);
- 3) регенерація екстрагента, тобто видалення його з екстракту і рафінату

Основні промислові екстрагенти можна розділити на три групи:

- 1) органічні кислоти або їх солі (феноли, нафтонові кислоти, сульфокислоти і т.п.), що вилучають катіони металів в органічну фазу з водної;
- 2) солі органічних основ (солі первинних, вторинних і третинних амінів і т.п.), за допомогою яких вилучають аніони металів з водних розчинів;
- 3) нейтральні розчинники (вода, спирти, альдегіди, кетони і т.п.).

Найбільше поширення в промисловості одержала екстракція одним розчинником, хоча знаходить застосування й екстракція двома екстрагентами. У хімічній технології використовуються в основному наступні способи проведення екстракції: одноступінчаста екстракція, багатоступінчаста екстракція з перехресним і протитечійним рухом розчинника і безперервна протитечійна екстракція [76].

У хімічній і фармацевтичній промисловості найчастіше застосовують такі екстрагенти, як вода, етанол, бензол, тетрахлорид вуглецю, хлороформ, трихлоретилен, ацетон, диетиловий ефір, інші органічні розчинники, скраплені гази тощо [77].

Так, гексан є популярним розчинником для екстракції, оскільки його унікальні властивості обумовлюють його ефективність. Основною причиною переважного вибору гексану в якості екстрагенту є його висока швидкість випаровування та низька температура кипіння. Низька температура кипіння

дозволяє гексану зберігати рідкий стан при низьких температурах. Висока швидкість випаровування гексану дозволяє цьому розчиннику витягувати найбільшу кількість цільової екстрагованої речовини за найшвидший проміжок часу [78].

Зважаючи на вищевказане, після відділення біомаси проводять двох разову екстракцію з протитечею розчинника в установці дворазової протитечійної екстракції. Цей спосіб проведення екстрагування характеризується багаторазовим контактуванням при протиточному русі потоків рафінату і екстракту артемізинової кислоти при поданні вихідного розчину відділеної культуральної рідини і гексану, як екстрагента з протилежних кінців екстракторної установки – вихідний розчин культуральної рідини самопливом перетікає з рівня в рівень, передаючи артемізинову кислоту естрагенту (гексану). В кожному ступені здійснюється одноразова екстракція очищеного рафінату більш свіжим гексаном, який рухається протитоку. На останньому щаблі рафінат контактує зі свіжим гексаном. В результаті проведення такої операції отримуємо екстраговану артемізинову кислоту в кількості 10,2 г/л КР, яка надходить на концентрування.

3.2.2. Концентрування екстракту

Методи концентрування поділяються на [79]:

- 1) Осідання (перекристалізація)
- 2) Іонообмінна сорбція
- 3) Випарювання
- 4) Ультрафільтрація

Метод осадження або кристалізації з нативних розчинів застосовується для виділення речовин, здатних утворювати з деякими реагентами нерозчинні з'єднання або кристалізуватися за певних умов з водного середовища. Основним чинником, що обмежує застосування процесу осадження біологічно активних речовин з нативного розчину, є низька концентрація цих речовин у розчинах (зазвичай не більше 1...2%). При

цьому залишкова концентрація цільового продукту в маточному розчині не повинна перевищувати 0,1...0,2% (інакше помітно зростають втрати продукту). Метод осадження знайшов промислове застосування у виробництві ферментів і тетрациклінових антибіотиків. У деяких випадках він дозволяє відокремити з'єднання, близькі до цільових продуктів за хімічною структурою [79].

Сорбцію широко використовують для розділення і концентрування речовин. Сорбційні методи зазвичай забезпечують гарну селективність розділення, високі значення коефіцієнтів концентрування. Сорбційні методи концентрування застосовують у тому випадку, коли мікроелементи в процесі аналізу можуть створювати один одному перешкоди. Сорбційне концентрування забезпечує належну вибірковість розділення, високі значення коефіцієнтів концентрування; ним відносно легко керувати, оскільки сам процес відбувається при невисоких температурах і, варіюючи умови експерименту, можна здійснити кількісну сорбцію-десорбцію й контролювати цей процес [80].

При йонообмінному концентруванні відбувається обмінна адсорбція: замість адсорбованих іонів у розчин переходить еквівалентна кількість інших іонів, які входять спочатку до складу використаного адсорбенту. Схематично механізм йонного обміну полягає в тому, що спочатку відбувається дифузія йону до частки, затим дифузія вглибину йонообмінника до його активних центрів, обмін з іоном, дифузія витиснутого йона до поверхні частки йонообмінника й, нарешті, його дифузія в розчин. При перемішуванні розчину пересування йонів до поверхні й від поверхні частки сорбента відбувається швидко і ці стадії суттєво не впливають на швидкість встановлення рівноваги (за виключенням дуже розведених розчинів). Однак дифузія йонів в самій частинці сорбенту відбувається повільно й практично не залежить від перемішування розчину. Тому рівновага встановлюється не миттєво, а протягом кількох хвилин або навіть годин, залежно від розмірів обмінюваних іонів і щільності часток йонообмінника [80].

Випарюванням називається концентрування розчинів практично нелетких або малолетких речовин у рідких летких розчинниках, шляхом видалення частини леткого розчинника. Випарюванню піддають розчини твердих речовин (водні розчини лугів, солей і ін.), а також висококиплячі рідини, що мають при температурі випарювання досить малий тиск насиченої пари – деякі мінеральні й органічні кислоти, багатоатомні спирти та ін. При випарюванні здійснюється часткове видалення розчинника з усього об'єму розчину при температурі кипіння. Тому випарювання принципово відрізняється від випаровування, що, як відомо, відбувається з поверхні розчину при будь-яких температурах нижче температури кипіння [81].

Процеси випарювання проводять під вакуумом, при підвищеному й атмосферному тисках. Вибір тиску залежить від властивостей розчину, що випарюється, і можливістю використання тепла вторинної пари.

Випарювання під вакуумом має переваги перед випарюванням під атмосферним тиском, незважаючи на те, що теплота випаровування розчинника із розчину трохи зростає зі зниженням тиску і відповідно збільшується витрата пари на випарювання 1 кг розчинника (води). Вакуумне випарювання дозволяє знизити температуру кипіння розчину і застосовується для випарювання термічно нестійких речовин (наприклад розчинів органічних речовин), а також висококиплячих розчинів, коли температура гріючого агента, не дає можливості вести процес під атмосферним тиском. Використання вакууму дозволяє також збільшити корисну різницю температур в випарному апараті, а отже, зменшити поверхню теплообміну.

Для випарювання під тиском необхідно застосовувати гріючі агенти з більш високою температурою. При випарюванні під атмосферним тиском вторинна пара, що утворюється, конденсується і направляється на очистку, але для зменшення енергозатрат на процес, її доцільніше використовувати, як для підігрівання початкового розчину в підігрівачі перед подачею його в випарний апарат, так і для інших нестатків.

Однак випарювання під надлишковим тиском пов'язано з підвищенням температури кипіння розчину, тому такий спосіб застосовується для випарювання розчинів термічно стійких речовин [81].

Для концентрування чи очищення розбавлених водних розчинів широко використовуються мембранні процеси, що протікають під дією перепаду тиску або баромембранні процеси. Розмір частинки чи молекули, а також хімічні властивості розчиненої речовини визначають структуру мембрани, тобто розмір пор, їх розподілення за розміром, котрі необхідні для розділення даної суміші. Різні мембранні процеси можна класифікувати за розміром розділюваних частинок розчиненої речовини і, відповідно, за структурою використовуваних мембран. До таких процесів належить ультрафільтрація [82].

Ультрафільтрація – це мембранний процес, що за своєю природою займає проміжне положення між зворотнім осмосом і мікрофільтрацією. Розміри пор ультрафільтраційних мембран змінюються від 0,05 мкм до 1 нм. Типове застосування ультрафільтрації – відділення макромолекулярних компонентів від розчину, при чому нижня межа відповідає молекулярним масам в декілька тисяч.

Ультрафільтрацію зазвичай застосовують для фракціонування макромолекул, при чому більші молекули затримуються мембраною, тоді як невеликі молекули (як і молекули розчинника) повинні вільно проникати через мембрану [82].

Оскільки від попереднього етапу ми отримуємо розчин артемізинової кислоти в органічному розчиннику, доцільно обрати спосіб вакуум-випарювання для концентрування одержаного екстракту.

3.3. Очищення артемізинової кислоти

3.3.1. Кристалізація

Кристалізація – процес виділення твердої фази у вигляді кристалів із розчинів, розплавів та газової фази [83].

Процес кристалізації широко використовують у різних галузях промисловості. Методами кристалізації здійснюють такі технологічні процеси:

- виділення твердих розчинених речовин із розчинів у чистому вигляді; Одночасне отримання в промисловому масштабі великої кількості кристалів носить назву масової кристалізації. Масову кристалізацію, як правило, проводять із водних розчинів, а в ряді випадків із розчинів органічних речовин за рахунок зміни температури розчину або видалення частини розчинника;

- кристалізацію із розплавів проводять для затвердіння розплавів при їх охолодженні. Перевагою кристалізації із розплавів є відсутність розчинника, який може бути сам по собі джерелом забруднення продукту;

- фракційна кристалізація – розділення суміші речовин на фракції, збагачені деяким компонентом, а іноді на практично чисті компоненти. При фракційній кристалізації кожний із компонентів при певних умовах може утворювати свої власні кристали, за рахунок чого виникає кристалізація індивідуальних компонентів.

- глибоке очищення речовин від домішок;

- вирощування монокристалів.

Усі методи кристалізації підкоряються єдиним закономірностям але відрізняються рядом технологічних особливостей. В промислових умовах процес кристалізації складається із операцій саме кристалізації, відділення кристалів від маточного розчину, що залишається після випадіння кристалів, перекристалізації (у випадку необхідності), промивки та сушіння кристалів.

Кристалізацію можна здійснювати принципово різними способами:

- шляхом видалення із розчину частини розчинника (ізотермічна кристалізація);

- шляхом охолодження розчинів, розплавів та парів (при кристалізації із водних розчинів цей спосіб називають ізогідричною кристалізацією);

- комбіновані способи, до яких відноситься:

- 1) вакуум-кристалізація;
- 2) кристалізація з випаровуванням частини розчинника в потоці носія;
- 3) фракційна кристалізація;
 - кристалізація висолуванням;
 - в результаті протікання хімічної реакції.

В хімічній промисловості найбільшого розповсюдження набув метод кристалізації речовин з позитивною розчинністю шляхом охолодження розчинів. Пересичення розчину досягається за рахунок його охолодження. Охолодження проводять, як правило, охолоджуючою водою [83].

Тому для отримання кристалів артемізинінової кислоти використовують кристалізатор, який заповнюють гарячим концентрованим розчином гексану, включають у роботу мішалку та у сорочку подають холодоносій, знижуючи температуру до 5 °С [84].

Перекристалізація — один з найважливіших методів очищення твердих речовин як у лабораторних, так і в промислових умовах. Він ґрунтується на тому, що розчинність твердих сполук в гарячих розчинниках набагато вище, ніж в холодних, а також на розходженні в розчинності різних речовин в одному і тому ж розчиннику. Перекристалізацією можна очистити речовини, розчинність яких істотно зростає з підвищенням температури. При цьому домішки, що містяться в основній речовині або добре розчиняються в обраному розчиннику, або навпаки, залишаються нерозчиненими.

Якщо розчинність домішок більше розчинності основної речовини, то після проведення перекристалізації, основна речовина буде осаджуватись у вигляді кристалів, а домішки залишаться в маточному розчині. Після відфільтрування кристалів отримують основний продукт, вміст домішок у якому менше, ніж до очищення [84].

Тому для отримання високоочищеної артемізинінової кислоти кристалічну суспензію промивають етиловим спиртом для видалення

органічних домішок та проводять процес повторної кристалізації за тих же умов, що й для кристалізації.

3.3.2. Сушіння

Сушіння це процес видалення вологи із матеріалів, що забезпечує її випарювання та відведення парів які утворилися. Апарати в яких здійснюють сушку називаються сушарками. За способом передачі тепла розрізняють конвективні, контактні, терморадіаційні, сублімаційні та високочастотні сушарки [85].

Розпилювальне сушіння в основному застосовується, якщо необхідно випарувати розчинник і отримати з висушеного матеріалу порошкоподібний або гранульований сухий продукт. Економічна доцільність розпилювального сушіння особливо очевидно при необхідності сушіння матеріалів, близьких до стану насичення, а також при організації у камері сушарки комбінованого процесу гідротермічної обробки.

Спосіб сушіння, при якому розчин продукту перегрівають перед розпиленням, має свої переваги. Даний метод дозволяє підвищити ефективність розпилення, зменшити розміри установки, знизити питомі витрати. У деяких випадках підвищуються технологічні показники готового продукту. При необхідності висушити дорогі термочутливі продукти застосовують ультразвукові розпилювачі і генератори ультразвукового поля в сушильних камерах. Процес розпилювальної сушіння може бути здійснений для будь-яких продуктів, які можливо подати до розпилювальних пристроїв за допомогою насоса або під тиском [85].

Однак у методу сушіння розпиленням є і свої недоліки:

- При сушінні продуктів з початковою температурою повітря від 100 до 150°C необхідні сушарки з досить великими питомими габаритами;
- Значна вартість обладнання для диспергування рідкого продукту та відділення сухого продукту від відпрацьованого сушильного агента;
- Даний метод пов'язаний з великою витратою електричної енергії для забезпечення розпилення продукту і підтримки значної витрати сушильного

агента. Останній не може бути насичений вологою в повній мірі у разі невисоких початкових температур процесу сушіння;

- Отриманий сухий порошкоподібний продукт має невелику об'ємну вагу. Через це доводиться вводити додаткові операції (брикетування).

Стан шару матеріалу, що характеризується безперервним хаотичним рухом частинок в обмеженому по висоті обсязі, носить назву киплячого. Сушіння різних матеріалів у киплячому шарі отримала широке розповсюдження завдяки специфіці процесу. По-перше, цим методом можна висушувати зернисті, сипучі, пастоподібні і рідкі матеріали; по-друге, процес протікає дуже інтенсивно.

В установках з киплячим шаром можна одночасно проводити кілька процесів: сушіння і випалювання, сушку і класифікацію за розмірами частинок, сушку і гранулювання і т.д. Однак ці сушарки мають і недоліки: підвищена витрата електроенергії (в деяких випадках і палива), невисока інтенсивність процесу при сушінні тонкодисперсних продуктів та ін.

У пневматичних сушарках сушіння матеріалів здійснюється в процесі їх транспортування газоподібним теплоносієм. Пневматичні сушарки використовують для сушіння дисперсних матеріалів. Найчастіше сушарка представляє собою вертикально розташовану трубу, де в режимі, близькому до режиму ідеального витіснення, газова суспензія переміщається зазвичай знизу вгору. Ці особливості дозволяють використовувати пневмотруби для сушіння великої групи дисперсних матеріалів хімічної промисловості (порошкоподібні, зернисті, гранульовані і т. д.), в тому числі і вибухонебезпечних. Недоліком слід вважати значне стирання матеріалу і підвищену витрату електроенергії [85].

Процес сушіння у вакуумних сушарках відбувається періодично, тобто у шафу на полиці закладають вологий матеріал, створюють вакуум, починають обігрівання шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом. Процес закінчують, коли матеріал матиме певну залишкову вологість, після чого готовий сухий матеріал вивантажують [79].

Перевагою вакуум–сушарок у порівнянні з конвективними атмосферними сушарками є більш інтенсивне сушіння при низьких температурах, що важливо для речовин, які не витримують високої температури (термолабільних). Вакуумне сушіння вимагає меншої витрати теплоти внаслідок (майже) відсутності втрат з повітрям, що викидається з сушарки. Також характеристикою вакуум–сушарок є стерильність середовища. Герметичність сушильної камери дає гарантію проти забруднення продукту пилом з навколишнього середовища й окислювання його киснем повітря. Вакуумне сушіння дозволяє також виключити виділення з матеріалу шкідливих парів і газів у навколишнє середовище, що особливо важливо при сушінні отруйних речовин [86].

Оскільки артемізинова кислота характеризується термолабільністю, слід обрати метод вакуум-сушіння для висушування кристалічної маси цільового продукту з метою збереження його основних властивостей.

РОЗДІЛ 4. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

- 1). Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 91 л;
- 2). Концентрація артемізинової кислоти у культуральній рідині ($C_{арт}$) = 10,2 г/л;
- 3). Концентрація біомаси в культуральній рідині ($C_{біом}$) = 12,58 г/л;
- 4). Втрати на стадіях виділення і очищення ($W_{втрат}$) = 50 %;

Початкова кількість артемізинової кислоти в культуральній рідині складає $91 \cdot 10,2 = 0,928$ кг, а кінцева кількість, з урахуванням 50 %-ів втрат, має становити 0,464 кг. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 4.1.

					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	Літ.	Арк.	Аркушів
<i>Розроб.</i>		<i>Степаненко І.Ю.</i>				72	3	
<i>Перевір.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				Кафедра БТМ		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Таблиця 4.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 40 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	КР	91	-	91	- Збірник культуральної рідини об'ємом 120 л
Відокремлення біомаси від рідкої фази						
2	Сепарування культуральної рідини	КР,	91	20%	72,8	Сепаратор моделі МВРХ 810Н компанії Alfa Laval, зроблений із високоякісної нержавіючої сталі. Продуктивність 250 л/год.
		біомаса	-/-	-/-	18,2	
Виділення артемізинової кислоти						
3	Екстракція артемізинової кислоти	екстракт	72,8	10%	65,5	Установка дворазової протитечійної екстракції
		рафінат	-/-	-/-	7,28	
4	Концентрування екстракту	екстракт	65,5	-/-	-/	Вакуум-випарний апарат з висхідною плівкою
		Концентрат	-/-	10	20	
Очищення артемізинової кислоти						
5	Кристалізація	Концентрат	13,1	-//	-/-	Кристалізатор Нутч-фільтр Гранулятор
		Вологі кристали	-/-	10	15	
6	Перекристалізація	Вологі кристали	15	-/-	14,64	Кристалізатор Нутч-фільтр Гранулятор

7		Вологі кристали	14,64	-	-	Вакуумна сушильна шафа, що вміщує до 100 кг продукту
	Сушіння кристалів	Сухий кристалічний порошок	-/-	1%	0,464	Зберігається у ємності об'ємом 134 л (80 кг)
Пакування, маркування і відвантаження висушеного артемізиніну						
8	Пакування, маркування і відвантаження висушеного порошку	Сухий порошок	44,45 кг			
		Упакований у поліетиленові пакети порошок	-	1%	44	Фасувально-пакувальний апарат

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1.

Специфікація обладнання ділянки післяферментаційних робіт по виділенню артемізинової кислоти

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
ЗБ-1	Реактор–змішувач для зберігання КР	1	Реактор об'ємом 20 л, з перемішуючим пристроєм. «Техинсервіс», швидкість перемішування 100 об/хв, сталь 12ХІ8Н10Т <u>h</u>
Н-2; Н-21; Н-23;	Насос	3	Герметичні насоси серії FMB. Відцентрові герметичні насоси з магнітним приводом. Продуктивність - від 15 до 70 л/хв. Напор - макс. до 8 м.
С-3	Сепаратор тарілчастий	1	Продуктивність 2,86 м ³ /год, фірми Gea
ЗБ-4,Н-4, ПН-5, С-6, ЗБ-6, Н-7, ПН-8, ЗБ-9, Н-10, ЗБ-11, Н-12, С-13, ЗБ-14, Н-15, ЗБ-16, Н-17	Установка дворазової протитечійної екстракції	1	Всі компоненти установки виконані із нержавіючої сталі. Оснащений підйомною кришкою, перемішуючим пристроєм, сорочкою, трубопроводною обв'язкою, необхідною для процесу проведення екстрагування. Апарат оснащений вертикальним оглядовим склом.
ВВА-19	Вакуум-випарний апарат з висхідною плівкою	1	Вакуум-випарний апарат фірми «NORMIT». Апарат оснащений паросепаратором, конденсатовідбійником, конденсатовловлювачем [16]
КР-20	Кристалізатор	1	Кристалізатор GLZN-01-750 із нержавіючої сталі AISI 316L об'ємом, з мішалкою, $\varnothing = 500$ мм, об'ємом 100 л. Виробник «ПРОМВІТ», Україна

НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Степаненко Л.Ю.		
Перевір.		Стабніков В.П.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 5. Специфікація обладнання			Літ.	Арк.
				75
			Аркушів	
			2	
Кафедра БТМ				

Закінчення таблиці 5.1.

НФ-22	Нутч-фільтр	1	Фільтр марки НСЕ 0,4-1-12-01, Продуктивність, 0,8 м3/час, Виробник «ГК Єврохіммаш К.О.», Україна
ГР-24, ГР-26	Гранулятор	2	Гранулятор марки GSE 100 Продуктивність від 20 кг/год до 5 т/год. Виробник «Glatz», Німеччина.
ВС-25	Вакуум-сушильна шафа	1	Апарат марки СВП-300 об'ємом 300 л. Камера сушильної шафи виготовлена з високоміцної нержавіючої сталі марки AISI 304. Оснащений системою програмного керування, Виробник «НВП» Укроргантес», Україна
ФП-27	Фасувально-пакувальний апарат	1	Фасувально-пакувальний апарат для сипких матеріалів для пакування в паперові пакети по 5 кг, маркування та відвантаження. Продуктивність: 10 уп/хв. Точність дозування – 1%. Виробник НВП «Техноваги» , Україна

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ТП 1. Відділення біомаси

Культуральна рідина зі збірника (З-1) за допомогою відцентрового насоса надходить до тарілчастого сепаратора (С-2) для відділення біомаси. Розділення відбуватиметься при частоті обертання 5000 об/хв. Культуральна рідина, що розділяється, входить через трубу і рухається в порожнинах між тарілками. На тарілки рідина поступає через канали, утворені отворами. Клітини, щільність яких більше щільності культуральної рідини, піддаються дії більшої відцентрової сили і відкидаються до нижніх поверхонь тарілок, стікають по ним до окружності барабана в камеру, потім на знешкодження відходів. Культуральна рідина, звільнена від клітин, відтісняється до центру, піднімається і через трубу направляється на екстракцію.

ТП 2. Екстракція артемізинової кислоти

Після відділення біомаси проводять двох разову екстракцію з протитечею розчинника в установці дворазової протитечійної екстракції. Цей спосіб проведення екстрагування характеризується багаторазовим контактуванням при протиточному русі потоків рафінату і екстракту артемізинової кислоти при поданні вихідного розчину відділеної культуральної рідини і гексану, як екстрагенту з протилежних кінців екстракторної установки – вихідний розчин культуральної рідини самопливом перетікає з рівня в рівень, передаючи артемізинову кислоту екстрагенту (гексану). В кожному ступені здійснюється одноразова екстракція очищеного рафінату більш свіжим гексаном, який рухається протитоку. На останньому щаблі рафінат контактує зі свіжим гексаном. В результаті проведення такої операції отримуємо екстаговану артемізинову кислоту в кількості 10,2 г/л КР, яка надходить на концентрування.

					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 6. Опис технологічної схеми	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Степаненко І.Ю.					77	4
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

ТП 3. Концентрування артемізинової кислоти

Екстрагована суміш (від ТП 2) із реактора (Зб-8) надходить безперервним потоком знизу у випарник з висхідною плівкою, розподіляється по трубах, проходить частину довжини труб і нагрівається до температури кипіння. Екстра-пара, що утворюється, з великою швидкістю проходить вздовж залишку довжини труб. При цьому разом з нею піднімається вгору і частина розчину, яка утворює на внутрішній поверхні труби висхідну плівку. У верхній зоні труби відбувається подальше випаровування цієї плівки. У верхній розширеній частині апарата (сепараторі) швидкість пари різко знижується, внаслідок чого крапельки концентрату від пари відділяються. Цьому сприяє і конденсатовідбійник, що встановлений в паросепараторі. Як джерело тепла використовуємо пару під тиском 1,2 МПа. Екстра-пара, а саме пари етилацетату, що виходять з верхньої частини апарату конденсуємо, таким чином гексан може застосовуватися неодноразово.

Екстракт артемізинової кислоти упарюють на вакуум випарній установці (ВВА-19) до 70 %-го вмісту сухих речовин. Випарювання здійснюють упродовж 1 год (продуктивність випарної установки 100 л/год) при температурі 70 °С. Далі упарений продукт поступає на кристалізатор (К-20) до ТП 11.

ТП 4. Кристалізація

Для отримання кристалів артемізинінової кислоти використовують кристалізатор, який заповнюють гарячим концентрованим розчином гексану, включають у роботу мішалку та у сорочку подають холодоносій, знижуючи температуру до 5 °С .

Після досягнення заданої кінцевої температури охолодження розчину, припиняють подачу холодоносія. Процес здійснюється до повної кристалізації речовини із концентрату.

ТП 5. Промивання кристалів

Не зупиняючи мішалку, пропускають кристалічну суспензію через нутч-фільтр. Після цього артемізинову кислоту промивають етиловим спиртом для видалення органічних домішок та проводять процес повторної кристалізації.

ТП 6. Перекристалізація

Для отримання високо очищеної артемізинової кислоти, отриманий напівпродукт зі стадії ТП 5 поміщають у збірник та заново розчиняють для отримання пересиченого розчину, після чого розчин фільтрують для відділення нерозчинних компонентів, потім поміщають у кристалізатор, вмикають мішалку та подають у сорочку холодоносії, знижуючи поступово температуру до 5 °С .

Після досягнення заданої кінцевої температури охолодження розчину, припиняють подачу холодоносія. Процес здійснюється до повторної кристалізації артемізинової кислоти із концентрату, після чого кристалічну суспензію фільтрують через нутч-фільтр та передають на наступну стадію.

ТП 7. Гранулювання вологих кристалів

Вологі кристали калібрують через сито з діаметром отворів 5 мм, швидкість обертів ротора 300 об/хв, відкалібрований вологий гранулят передають на стадію сушіння ТП 8.

ТП 8. Сушіння кристалів

Вологі відкалібровані кристали зі стадії ТП 7 завантажують на полиці вакуум-сушильної шафи (ВС-25) рівномірним тонким шаром. Апарат щільно закривають дверцятами. Нагрівання шафи здійснюють парою під тиском 0,4МПа. Висушування продукту відбувається при температурі близько 30-40°С.

Процес закінчують, коли матеріал матиме 10 % залишкової вологості, після чого готовий сухий матеріал вивантажують.

ПМВ 9. Просіювання кристалів

Перед подачею висушеного порошку на стадію **ПМВ 10**, його направляють на вібраційне сито (ГР-26), для калібрування отриманих кристалів. Розмір отворів сита – 0,5 мм.

ПМВ 10. Пакування, маркування, відвантаження

Артемізінова кислота у вигляді кристалічного порошку подається на автомат пакування та маркування.

Фасування, пакування та маркування проводяться на вертикальному фасувально-пакувальному апараті (ФП-27) марки НВП «Техноаги». Маркування роблять фарбою чорного кольору безпосередньо на пакеті у які пакуватиметься готовий продукт. На паперовому пакеті зазначають назву продукту, спосіб застосування, дату виготовлення та партію. Апарат обладнаний сенсорним дисплеєм, на якому задається та відображається: дата і час, доза, температура зклеювання, мова відображення інформації (польська, англійська, українська), час подачі клею, лічильник розфасованих пакетів, код оператора, текст, що відобразатиметься на упаковці та ін.

ЗВ 11. Знешкодження відходів.

ЗВ 11.1 Знешкодження рідких відходів.

Рідкі відходи збирають у каналізаційний колектор та направляють на біологічне очищення забруднених вод, саме на біофільтр. В біофільтрі рідкі відходи, проходячи через фільтрувальний матеріал, очищаються створюваною на ньому біологічною плівкою. Проходячи через завантаження біофільтра, забруднені відходи залишають в ньому нерозчинні домішки, а також колоїдні і розчинені органічні речовини, що сорбуються біологічною плівкою.

ЗВ 11.2 Знешкодження газоподібних викидів.

Газоподібні відходи направляються на модуль сухого очищення повітря продуктивністю 0,5 - 1 тис.м³/год з вбудованим індивідуальним аспіратором потужністю до 1 кВт. Пристрій забезпечений пило вихідним патрубком, до якого може бути підвішена пакувальна тара (герметичний мішок). Патрубок виходу очищеного повітря може з'єднуватися з відповідним трактом і викидною трубою.

ЗВ 11.3. Знешкодження твердих відходів

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

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ

Так як у подальшому порошок артемізинової кислоти буде використовуватися у виробництві нестерильних лікарських засобів, то після отримання АФІ у вигляді сухого порошку, необхідно здійснити її контроль за наступними показниками:

1. Опис;
2. Вміст вологи.
3. Супровідні домішки;
4. Мікробіологічна чистота;
5. Кількісне визначення;

Опис: Артемізинінова кислота - гранульований кристалічний порошок білого або майже білого кольору, без сторонніх механічних включень.

7.1. Кількісне визначення артемізинінової кислоти в субстанції

Визначення артемізинінової кислоти в субстанції проводять хроматографічним методом [53].

Розчинник: суміш гексану, ацетону, толуолу і дегідратованого спирту (10: 7: 7: 6).

Рухома фаза. готова відфільтрована і дегазована суміш гексану і етилацетату (75:25).

Стандартний розчин. Розчинений стандарт USP ART RS в рухомій фазі концентрацією 150 мкг / мл.

Хроматографічна система оснащена детектором 446 нм і колонкою 4,6 мм × 25 см, що містить 5 мкм упаковки L3. Швидкість потоку рухомої фази близько 1,5 мл /хв.

Процедура. Ввести 10 мкл тестового розчину в хроматограф, записати хроматограму і виміряти пікові відповіді. Відсотковий вміст артемізинінової кислоти розраховують за формулою щодо загальної кількості в порошок.

					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Степаненко І.Ю.			РОЗДІЛ 7. Контроль виробництва субстанції для ЛЗ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					81	7
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

$$100 * (r_i / r_s)$$

в якій r_i – індивідуальне пікове значення артемізинінової кислоти в тестовому розчині;

а r_s - сума відповідей всіх піків: не менше 85,0% артемізинінової кислоти.

Кількість артемізинінової кислоти в препараті розраховують за формулою:

$$T (r_i / r_s)$$

в якій T являє собою вміст у відсотках від загальної кількості артемізинінової кислоти;

в якій r_i – індивідуальне пікове значення артемізинінової кислоти в тестовому розчині;

а r_s - сума відповідей всіх піків: не менше 85,0% артемізинінової кислоти [53].

7.2. Визначення вологості у готовому продукті

Визначення вологості у готовому продукті визначається за допомогою аналізатора вологості MLB 50-3N. Принцип роботи приладу заснований на висушуванні певного об'єкту, в даному випадку порошку артемізинінової кислоти, при одночасній фіксації вагових показників. Тобто аналізатор вологості можна назвати своєрідним приладом, що об'єднує в одному корпусі ваги та сушарку.



Рис. 7.1. Аналізатор вологості MLB 50-3N

Серед переваг компактного приладу варто назвати в першу чергу швидкість проведення вимірів (на роботу необхідно від 5 до 20 хв, залежно від продукту) та точність прибору, яка є дуже високою. Даний прилад включає в себе ваги та вбудований над ним прилад для сушки (2 галогенні лампи, що розміщені колою) над зразком, що висушується. Процес сушіння вимикається автоматично:

- по закінченні установленого часу;
- при досягненні постійної ваги протягом встановленого проміжку часу.

Принцип роботи аналізатора вологості заснований на термогравіметричному методі, який полягає у визначенні маси зразка до і після його висушування шляхом його нагрівання [87].

7.3. Мікробіологічна чистота субстанції

Субстанції і допоміжні речовини для виробництва готових лікарських засобів для орального застосування і ректального введення повинні відповідати таким вимогам щодо мікробіологічної чистоти:

- Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів - не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у грамі або мілілітрі;
- Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1 г або 1 мл;
- Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г або 1 мл;
- Відсутність *Staphylococcus aureus* в 1 г або 1 мл.

Визначення проводять згідно ДФУ п. 2.6.12 [88].

Визначення мікробіологічної чистоти здійснюють методом висіву на чашки Петрі. Висів можна здійснювати глибинним або поверхневим способом.

Спочатку готують розведення гормону 1:10. 10 г соматотропіну розчиняють у 100 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0. Далі роблять 5 пасажей розведень.

Метод глибинного висівання: у кожен чашку Петрі вносять 1 мл розведення і 15-20 мл розплавленого густого поживного середовища для

вирощування бактерій (МПА) або для грибів (середовище Сабуро). Температура середовища має становити не більше 45°C. Роблять посів на дві чашки Петрі з кожним середовищем. Посіви інкубують при температурі від 30°C до 35°C для бактерій та від 20°C до 25°C для грибів протягом п'яти діб.

Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости, і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 грамі.

Метод поверхневого висівання: 0,1 мл розведення розподіляють по поверхні поживного середовища для вирощування бактерій (МПА) або для грибів (середовище Сабуро). Роблять посів на дві чашки Петрі з кожним середовищем. Посіви інкубують при температурі від 30°C до 35°C для бактерій та від 20°C до 25°C для грибів протягом п'яти діб.

Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости, і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 грамі [88].

Також проводять випробування на окремі види мікроорганізмів.

Родина *Enterobacteriaceae*

10 мл розведення соматотропіну вносять у 100 мл поживного середовища № 3, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашки Петрі з густими поживними середовищами №4 і №5. Посіви інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Наявність на середовищах характерного росту грамнегативних паличок, вказує на забруднення соматотропіну бактеріями родини *Enterobacteriaceae* та деякими іншими грамнегативними бактеріями:

- середовище № 4 (рис 7.2): круглі малинові з металевим блиском або без нього колонії; рожеві, безбарвні, блискучі опуклі колонії діаметром від 2 мм до 4 мм;
- середовище № 5: чорні з металевим блиском колонії, ділянки середовища під якими забарвлені в чорний колір; зеленувато-бурі, ясно-зелені, бурі колонії [89].



Рис. 7.2. Колонії бактерій родини *Enterobacteriaceae*

Staphylococcus aureus

10 мл розведення соматотропіну вносять у 100 мл поживного середовища №8, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №10 і інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Ріст золотаво-жовтих колоній (рис. 7.3), оточених жовтими зонами (що свідчить про ферментацію маніту), указує на можливість забруднення соматотропіну *S. aureus* [89].



Рис. 7.3. Колонії *S. aureus*

Pseudomonas aeruginosa

10 мл розведення соматотропіну вносять у 100 мл поживного середовища №8, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №9 і інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Ріст зеленуватих, як правило, флуоресціюючих колоній (рис. 7.4), блакитних в ультрафіолетовому світлі (що свідчить про наявність пігменту піоціаніну), указує на можливість забруднення соматотропіну *P. aeruginosa* [89].



Рис. 7.4. Колонії *P. aeruginosa*

Згідно науково-технічної документації на підприємстві забезпечується контроль готової продукції. Це здійснюється для забезпечення відповідності готової продукції вимогам.

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю і показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та порядок відбору проб	Нормативна характеристика показника, що визначається
Кт 1 Зберігання культуральної рідини	Кількість обертів мішалки, температура	Тахометр, термометр технічний	Протягом процесу зберігання	w=50 об/хв; t= 17-20 °C

Кт 2. Сепарування культуральної рідини	Частота обертів барабана	Візуально на дисплеї сепаратора	Визначається під час сепарування	w=12000 об/хв;
Кт, Кх 3 Екстракція	Кількість обертів мішалки, час роботи, температура	Тахометр, годинник, термометр технічний	Протягом процесу екстракції	w=200 об/хв; T =1 год; t= 30oC
Кт 4 Вакуум-екстракту	Температура теплоносія, тиск	Термометр технічний, манометр технічний	Під час процесу випарювання	t= 60 °C; P=1,2 МПа
Кт 5. Кристалізація	Температура теплоносія, тиск, час кристалізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Протягом процесу кристалізації	t= 4 °C; P=1,2 МПа T =1 год;
Кт 6. Промивання кристалів	Температура теплоносія, тиск, час кристалізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Протягом процесу кристалізації	t= 4 °C; P=1,2 МПа T =1 год;
Кт 7 Перекристалізація	Температура теплоносія, тиск, час кристалізації	Термометр технічний, манометр технічний, годинник	Протягом процесу кристалізації	t= 4 °C; P=1,2 МПа T =1 год;
Кт 8. Гранулювання вологих кристалів	Швидкість обертання подрібнювача	Манометр технічний	Протягом процесу гранулювання	W=300 об/хв
Кт 9 Сушіння кристалів	Температура, тиск, вологість	Термометр технічний, манометр технічний, аналізатор вологості	Протягом процесу сушіння	t= 30-40 °C; P=0,4 МПа r= 10 %
Кт 10 Просіювання кристалів	Розмір отворів сита	Сито	Перед просіюванням	d=0,5 мм
Кт 11 Пакування готового продукту	Маса запакованого продукту	Ваги електронні	Після процесу пакування	m = 5 кг
Кт 12 Маркування готового продукту	Текст на первинній упаковці	Візуальний контроль	Після процесу маркування	Відповідність тексту на первинній упаковці заданому макету

РОЗДІЛ 8. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ПРОТИПАРАЗИТАРНОГО ЗАСОБУ

8.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік

Кількість висушеного артемізиніну, що отримується з однієї ферментації, становить 0,464 кг.

Припускаємо, що маса 1 таблетки становить 0,1 г.

Тоді за 1 цикл виробництва отримуємо $464/0,1 = 4640$ таблеток. Якщо 1 блістер містить 30 таблеток, то за 1 цикл отримаємо близько $4640/30 = 154$ блістери.

Річна потужність артемізиніну – 44 кг. Це відповідає такій кількості таблеток: $44\ 000/0,1 = 440\ 000$ таблеток.

Загальна кількість блістерів складає: $N_{\text{бліст}} = 440\ 000 / 30 = 14\ 666$ шт.

Продуктивність фасувальної блістерної машини – до 30 блістерів/хвилину [90], що відповідає 1800 блістерів/год.

Таким чином, за один цикл фасується $N_{\text{цк}} = 1800 \times 8 = 14\ 400$ блістерів.

Тоді кількість серій на рік становитиме:

$$N_{\text{сер}} = N_{\text{бліст}} / N_{\text{цк}} = 14\ 666 / 14\ 400 \approx 1 \text{ серія.}$$

8.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень

1) Підготовка персоналу

Наразі співробітники сучасних підприємств з виробництва лікарських засобів (ПВЛЗ) на всіх рівнях і в усіх структурних підрозділах зіштовхуються з потребою виконання ряду робіт, що пов'язані з утворенням і впровадженням, а також надалі з постійним підтриманням функціонування фармацевтичних систем якості. Така робота є відносно специфічною та новою для українських ПВЛЗ. Це пов'язано з тим, що вона передбачає впровадження сучасних принципів забезпечення та управління якістю, які

					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
	до	недавня	не					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання протигельмінтного засобу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Степаненко І.Ю.					88	15
Перевір.		Стабніков В.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ		

застосовувалися на вітчизняних підприємствах [91].

Виробник має забезпечити проведення навчання для всього персоналу, який виконує обов'язки у виробничих та складських приміщеннях або контрольованій лабораторії (включаючи технічний та обслуговуючий персонал і персонал з прибирання), а також для іншого персоналу, чії обов'язки можуть вплинути на якість продукту [92].

На додаток до базової підготовки з теорії та практики систем управління якістю та GMP, кожен новий співробітник повинен пройти навчання відповідно до завдань, за які він або вона відповідає. Крім того, слід проводити навчання для регулярної оцінки його практичної ефективності. Повинна існувати програма навчання, затверджена або керівником виробництва, або керівником відділу контролю якості. Необхідно вести записи про навчання.

Кожен, хто працює в зонах, де існує ризик забруднення, наприклад, у чистих приміщеннях або зонах, де працюють зі шкідливими, отруйними, інфекційними або сенсibiliзуючими речовинами, повинен пройти спеціальне навчання. Як правило, непідготовлені відвідувачі та працівники не допускаються до виробничих приміщень і зон контролю якості. Якщо цього неможливо уникнути, персонал слід заздалегідь проінформувати, зокрема, про вимоги до гігієни та використання захисного одягу. Вони також повинні перебувати під суворим наглядом. На навчальних семінарах для персоналу слід детально обговорити фармацевтичну систему якості та будь-які заходи, спрямовані на поліпшення розуміння системи та впровадження.

Для задоволення різних потреб підприємства слід розробити детальні програми охорони здоров'я та безпеки праці, які б відповідали різним потребам. Вони повинні включати процедури щодо здоров'я, гігієни та одягу працівників. Працівники, чії обов'язки вимагають перебування у виробничих та контрольних зонах, повинні розуміти та суворо дотримуватися цих процедур. Керівництву слід сприяти розробці програм з охорони здоров'я на робочому місці, які слід широко обговорювати під час навчальних занять. Усі

працівники повинні проходити медичний огляд під час прийому на роботу. Виробник несе відповідальність за забезпечення інформування виробника про будь-який стан здоров'я працівників, що може вплинути на якість продукції. Після первинного медичного огляду подальші медичні огляди повинні проводитися періодично і за необхідності для роботи або здоров'я працівника.

Там, де це можливо, необхідно вжити заходів для того, щоб працівники, які страждають на інфекційні захворювання або мають відкриті рани на відкритих частинах тіла, не були залучені до виробництва лікарських засобів. Кожна особа, яка входить у виробничу зону, повинна носити захисний одяг, що відповідає виконуваний роботі. Слід заборонити вживання їжі, напоїв, та куріння, а також зберігання продуктів харчування, напоїв, тютюнових виробів та особистих ліків у виробничих та складських приміщеннях. Загалом, будь-яке порушення гігієнічних вимог у виробничих приміщеннях або в будь-якій іншій зоні, що може мати негативний вплив на продукт, має бути заборонено.

Необхідно уникати прямого контакту рук працівників з відкритими продуктами та частинами обладнання, які контактують з продуктом. Працівники повинні бути навчені використанню засобів для миття рук [92].

2) Підготовка дезінфікуючих засобів

Дезінфекційні заходи включають використання дезінфікуючих засобів з окислювачами (перекис водню) та глутаральдегідом (корзолін іД) в якості активно діючих речовин (далі - АДР), четвертинні амонієві сполуки, похідні гуанідину (гембар) та хлорпохідні гуантоїну (дезактин, хлорантоїн) в якості АДР, змішані з глутаральдегідом у миючому засобі, що їх містить [93].

Дезінфікуючі та миючі засоби повинні надійно знезаражувати виробничі приміщення, обладнання, техніку та поверхні складських приміщень від патогенних і гнильних мікроорганізмів.

Дезактин - дезінфекційний засіб з миючим ефектом виробництва ТОВ "ДЕЛАНА" (Україна). Містить дихлорантин в якості АДР. До складу засобу

входять аніонні поверхнево-активні речовини, диспергатори та наповнювачі. Це порошок від білого до жовтуватого кольору зі слабким запахом хлору. Розчинність у воді перевищує 20 мг/дм. Не викликає корозії металу, скла, гуми, полімерних матеріалів, дерева, кахлю, порцеляни, фаянсу, а також пофарбованих, полімерних і гальванічних покриттів технічних установок і поверхонь обладнання, не осідає на обробленій поверхні білкових і жирових забруднень, проявляє змочувальні і миючі властивості, добре змивається. Продукт є помірно небезпечною речовиною (3 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007). Дезактин має бактерицидну, туберкулоцидну та фунгіцидну дію. Для поточної дезінфекції поверхонь приміщень (стін, підлоги, вікон, дверей), прибирального інвентарю, технічного та гігієнічного обладнання, засобів зв'язку, інвентарної та внутрішньомагазинної тари рекомендується використовувати 0,2% дезінфікуючий розчин, 1,0% дезінфікуючий розчин - для дезінфекції об'єктів, заражених *Mycobacterium tuberculosis*, 2,0% дезінфікуючий розчин - для дезінфекції об'єктів, заражених пліснявою [93].

Корзолін іД- дезінфекційний засіб виробництва BODE Chemie GmbH & Co. (Німеччина). Містить глутаральдегід в якості АДР. До складу засобу входять тензиди, інгібітори корозії, активуючі добавки та вода. Продукт являє собою прозору рідину жовтого забарвлення. Без специфічного запаху. Добре розчиняється у воді та етиловому спирті. Для приготування робочих розчинів Корзоліну іД використовують холодну воду (використання гарячої води може призвести до випаровування токсичних парів альдегідів). Водні розчини Корзоліну іД прозорі, середньо-жовтого кольору, без запаху. Водні розчини корзолін іД добре змиваються з поверхонь, не залишають слідів і не пошкоджують предмети з металу, порцеляни, скла, полімерних матеріалів і гуми. Продукт є помірно небезпечною речовиною при введенні в шлунок лабораторних тварин (3 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007). Препарат подразнює шкіру, слизові оболонки очей та верхніх дихальних шляхів. Корзолін іД має бактерицидну, віруліцидну, спорицидну, туберкулоцидну та фунгіцидну дію; для дезінфекції інструментів та обладнання рекомендується

використовувати 4,0% та 10,0% розчини Корзоліну іД. Розчин Корзоліну іД у концентрації 4,0% ефективний протягом 10 діб з моменту приготування в тарі з щільно закритою кришкою, а розчин у концентрації 10,0% - протягом 14 діб. [93].

Перекис водню медичний згідно з ГОСТ-117 - це безбарвна прозора рідина, що містить 30-40% АДР. Перекис водню стабілізується пірофосфатом натрію або однозаміщеним фосфатом натрію при концентрації нижче 0,6 г/дм³. Перекис водню - незаймиста, горюча рідина і потужний окислювач. Перекис водню розкладається на воду та кисень і змішується з водою. Перекис водню є дуже небезпечною речовиною (2 клас небезпеки згідно з ГОСТ 12.1.007). Подразнює шкіру, слизову оболонку очей і верхніх дихальних шляхів. Перекис водню має бактерицидні, віруліцидні та спороцидні властивості. Для дезінфекції змішати з 0,5% синтетичним миючим засобом (Лотос). 1,0%, 3,0% і 4,0% розчини перекису водню рекомендуються для поточної дезінфекції технологічного обладнання, технологічного обладнання, товарів на складі та внутрішньої тари, а 6,0% розчин перекису водню рекомендується для дезінфекції технологічного обладнання, технологічного обладнання, товарів на складі та внутрішньої тари, забруднених спороутворюючими мікроорганізмами [93].

Оскільки виникнення резистентності до дезінфектантів на підприємствах є сучасною виробничою проблемою, приймаємо використання кількох вищезазначених засобів для обробки технологічного обладнання та поверхонь. Для уникнення виникнення стійкості патогенів слід використовувати ці засоби по черзі з інтервалом в 1 місяць.

3) Підготовка вентиляційного повітря

Одним з найважливіших елементів забезпечення чистоти чистих приміщень для виробництва фармацевтичних препаратів є очищення великих обсягів вентиляційного повітря відповідно до технічних характеристик процесів, що відбуваються в цих приміщеннях. Останній етап є критично важливим і вимагає використання фільтрів, здатних затримувати практично

всі частинки діаметром від 0,1 мікрона і більше. При визначенні ефективності кінцевого фільтра для оснащення конкретного чистого приміщення слід враховувати наступні фактори: клас чистоти чистого приміщення, об'єм повітря, що нагнітається, і концентрацію дрібнодисперсних частинок в ньому, об'єм циркулюючого (рециркулюючого) повітря і концентрацію дрібнодисперсних частинок в ньому, характеристики фільтра попереднього очищення і експлуатаційні витрати [94].

Важливим елементом при проектуванні систем очищення повітря є вибір фільтра. Фільтри є найважливішим компонентом системи очищення повітря в чистих приміщеннях, оскільки вони в кінцевому підсумку визначають необхідну чистоту приміщення. Треступенева система очищення повітря з використанням фільтрів грубого і тонкого очищення на першому і другому ступенях відповідно, а також мікро- або ультратонкого очищення на третьому ступені дозволяє досягти бажаних результатів. Встановлення перед кожною групою фільтрів фільтра низького рівня у вигляді попереднього фільтра подовжує загальний термін служби основного фільтра.

Згідно з стандартом фільтрувальні елементи підрозділяються на такі групи [12]:

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;

Група U - фільтри (Ultra Low Penetration Air) ULPA.

Фільтри грубого очищення випробовуються гравіметричним (ваговим) методом з використанням синтетичного пилу в якості тестового аерозоллю. Фільтри тонкого очищення випробовуються фотометричним методом з використанням атмосферного пилу в якості тестового аерозоллю; фільтри HEPA і ULPA випробовуються методом підрахунку частинок з використанням DEHS(діетілгексилсебацінату) або DOP (діоктілфталату) в

якості тестового аерозолю для визначення інтегральної ефективності або локальної ефективності або коефіцієнта пропускання.

Аналізування спрощених апаратних схем дозволяє зробити деякі висновки щодо проектування систем очищення повітря.

1. Важливим елементом схем як індивідуальних схем підготовки повітря для приміщень одного класу, так і загальних схем підготовки повітря для приміщень різних класів чистоти. Повітря подається в кондиціонер після попереднього очищення.
2. Використовують багатоступеневу очистку на фільтрах типу EU 4 з метою подовження строку використання фільтрів HEPA/ULPA; при цьому використовують мішечні, сухі коміркові або фільтри інших конфігурацій.
3. Наявність систем рециркуляції повітря. Використання рециркуляції дозволяє значно знизити витрати на багатоступеневе очищення повітря.
4. Кожне чисте приміщення має незалежну систему очищення вентиляційного повітря до кінця лінії [94].

В якості фільтрів можуть використовуватися рукавні фільтри (з синтетичних волокон) і комірчасті фільтри з різними властивостями наповнювачів (пінополіуретан, металева сітка, волокна), такі як ФЯПБ, ФЯУБ, ФАРБ, ФЯВБ. Основна роль фільтра першого ступеня полягає у видаленні великих частинок пилу для запобігання зносу вентилятора. Ефективність очищення повинна становити 70% згідно часток Корунду розміром 4 мкм і 35% для частинок атмосферного пилу в приміщеннях класу D. У приміщеннях класу чистоти A/B ефективність очищення пари від чистої води становить 90% і 45% відповідно. Фільтр працює від початкового опору 50 Па до засмічення 100-250 Па, після чого може бути регенерований до п'яти разів.

Сухі фільтри можна регенерувати шляхом продування або пирососування. Комірчасті фільтри після очищення слід просушити. В

рамках попередньої підготовки систему повітропроводів слід продезінфікувати розчином формаліну як частину допоміжних робіт.

Для підготовки пари до зволоження використовується стерильна пара з окремих парогенераторів. Кондиціонування повітря складається з ряду операцій: перше нагрівання, охолодження, друге нагрівання і зволоження парою [94].

8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Упаковка готового лікарського засобу володіє такими важливими функціями [67]:

- ✓ зберігання товарів та захист від зовнішнього середовища;
- ✓ створення раціональних одиниць для транспортування, завантаження та розвантаження товарів та створення раціональних одиниць для зберігання товарів;
- ✓ забезпечення оптимальних одиниць продажу товарів за вагою та об'ємом;
- ✓ забезпечення оптимальних одиниць продажу товарів за вагою та об'ємом;
- ✓ забезпечення оптимальних одиниць продажу товарів за вагою та об'ємом;
- ✓ забезпечення оптимальних одиниць продажу товарів за вагою та об'ємом;
- ✓ є комунікаційними, рекламними та стимулюючими засобами для продажу товарів [67].

Тип упаковки визначається на основі:

- ✓ Вага та об'єм товару для оптимального використання транспортних засобів і складських приміщень;
- ✓ Автоматизовані засоби вантажно-розвантажувальних робіт; придатність упаковки для транспортування та зберігання товару на території замовника.
- ✓ Транспортні засоби та способи транспортування товарів.

Таблетки становлять близько 70% від загального обсягу виробництва готових лікарських засобів. Таблетки упаковують у різноманітні контейнери, в тому числі полімерні (блістери).

Блістери - це прозора, контурна чарункова упаковка з полімерної плівки у формі продукту. Блістери виготовляються з полімерної плівки і зазвичай утворюють досить жорсткий каркас. Ця властивість забезпечує захист від механічних пошкоджень, вологи та забруднень.



Рис. 8.1. Блістер.

Блістери виготовляються з широкого спектру типів плівок, тому ви можете знайти найкраще рішення для вашого продукту. Крім того, сучасні полімерні плівки, що використовуються для блістерів, довговічні, прості та легко переробляються [67]. У свою чергу, для виготовлення полімерної плівки використовують поліпропілен, поліетилен, полівінілхлорид і полівініліденхлорид [68]. Отже, первинною упаковкою антигельмінтного препарату артемізіну є блістер, по 30 таблеток у блістері відповідно.

Для захисту таблеток від чинників зовнішнього середовища та інформативності пакувальна система представлена не лише блістером, але й фольгою.

Фольга алюмінієва застосовується для пакування лікарських препаратів, виробів медичного призначення, продукції косметичної промисловості, а також для виробництва пакувальних матеріалів на основі алюмінієвої фольги (ГОСТ 745— 2014). Фольга виготовляється з алюмінію марок АТ (з кількістю алюмінію 99,6 %), А1 (алюмінію 99,5 %) і А2 (алюмінію 99,0% відповідно). За ГОСТ 745—2014 випускається фольга таких марок [69]:

- 1) гладка - ФГ,

- 2) лакована з одного боку -ФЛ,
- 3) лакована з двох сторін – ФЛЛ,
- 4) з лаком термозварювальним з однієї сторони - ФТЛ,
- 5) фарбована кольоровим лаком або фарбою з однієї сторони або з двох сторін – ФО,
- 6) друкована з однієї або з двох сторін - ФП,
- 7) з друком по одній стороні та лакуванням з іншої сторони - ФПЛ,
- 8) фарбована з однієї сторони та лакована з іншої сторони - ФОЛ,
- 9) друкована з однієї сторони та з лаком термозварювальним з іншої сторони - ФПТЛ,
- 10) лакована з однієї сторони та з лаком термозварювальним з іншої сторони - ФЛТП,
- 11) друкована з лаком поверх друку з однієї сторони та з лаком термозварювальним з іншої сторони - ФЛПТЛ,
- 12) з друкованим лаком термозварювальним по друку з однієї сторони та лакована з іншої сторони - ФТЛПЛ,
- 13) з лаками термозварювальними з двох сторін - ФТЛТЛ.

Фольгу випускають тиснену, забарвлену, лаковану (для підвищення антикорозійних властивостей), кашовану (склеювання фольги з папером) та ін. На фользі допускаються поодинокі дрібні отвори, видимі оком проти світла, що не мають рядкового та місцевого розташування. Торці рулонів мають бути без забруднень, забоїн і вмятин [69].

Отже, для пакування таблеток з артемізиніном обираємо фольгу з друком по одній стороні та лакуванням з іншої сторони марки ФПЛ. Така фольга обумовлює захист від впливу світла, води, парів, газів, високих/низьких температур, мікроорганізмів та механічної дії, а також за рахунок друку з одного боку виконує інформативну функцію, оскільки споживач може швидко ідентифікувати назву препарату, його дозування, виробника, термін придатності тощо.

8.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Зважаючи на те, що цільовим продуктом є таблетки, які вживаються перорально, немає потреби у приготуванні води високоочищеної або води для ін'єкцій. Натомість слід забезпечити підготовку води очищеної, ступеня очищення якої буде достатньо для одержання цільового препарату.

Очищена вода - це вода для виробництва лікарських засобів, для яких не вимагається стерильність та/або безпірогенність. Для виробництва діалізних розчинів може використовуватися очищена вода, яка пройшла тест на вміст ендотоксинів.

Очищену воду отримують з води, яка відповідає вимогам нормативних документів, затверджених компетентними органами щодо якості води, призначеної для споживання людиною, шляхом дистиляції, іонного обміну або іншими відповідними способами [95].

Наразі актуальним є використання новітніх технологій та установок водопідготовки на фармацевтичних підприємствах, розглянемо одну з них.

Система зберігання та розподілу очищеної води є дуже важливою частиною загальної системи, оскільки вона безпосередньо впливає на якість фармацевтичного виробництва. Очищену воду необхідно спочатку транспортувати до резервуарів для зберігання, а потім розподіляти до різних точок водоспоживання. Резервуари для зберігання води також є важливим буфером у процесі фармацевтичного виробництва [96].

Проектування системи зберігання та розподілу води повинно ґрунтуватися на даних про точки використання, статистику пікового споживання та розрахунок загального споживання протягом дня. На основі цього слід спроектувати виробничу потужність обладнання та буферну ємність резервуара для зберігання.

Відповідно до вимог цього проекту, методом стерилізації системи підготовки, зберігання та розподілу очищеної води є загальносистемна пастеризація, а процес приготування являє собою двоступінчастий зворотний осмос з наступною електродеіонізацією.

При розробці систем зберігання та розподілу важливо уникати зростання мікроорганізмів. Мікроорганізми легко прикріплюються до поверхні труб, фітінгів та клапанів. Тому в системі зберігання та розподілу слід використовувати електролітично відполіровані труби, фітінги та клапани зі ступенем полірування ($Ra < 0,4$). Необхідно розрахувати оптимальний розмір труби, витрату та напір насоса та підтримувати позитивний тиск у системі, що може знизити ризик зворотного всмоктування та уникнути росту мікроорганізмів. Варто використовувати двоходовий клапан або клапан T-подібного типу, який забезпечує уникнення тупикових зон. Необхідно строго контролювати витрату води у трубопроводі, щоб підтримувати її в турбулентному стані та уникнути ризику росту та розмноження мікробів.

Система приготування води очищеної має такі характеристики:

1. Використовується двоканальний водозабірник. Коли в резервуарі для зберігання досягається високий рівень і подача води припиняється, система автоматично перемикається в режим циркуляції, а водозабірний трубопровід перебуває в стані промивання, що ефективно пригнічує зростання мікроорганізмів;

2. Перед кожним вимкненням обладнання автоматично запускається процес промивання мембрани зворотного осмосу прісною водою (пермеатом), що дозволяє знизити рівень її забруднення з боку концентрованої води та продовжити термін служби.

3. Продуктивність цієї системи очищення води становить 15 тонн за годину. З метою економії електроенергії концентрована вода (концентрат) переробляється та фільтрується для повторного використання. При цьому ступінь добування може досягати 80% і більше;

4. Система управління спроектована так, щоб працювати у переривчастому режимі, тому що у святкові та вихідні дні вона не використовується. Це дозволяє економити електроенергію та контролювати контамінацію сторонніми мікроорганізмами [96].

8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Вихідні дані:

- 1). Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 91 л;
- 2). Концентрація артемізинової кислоти у культуральній рідині (Сцеф) = 10,2 г/л;
- 3). Концентрація біомаси в культуральній рідині ($C_{біом}$) = 12,58 г/л;
- 4). Втрати на стадіях виділення і очищення цефалоспорину С ($W_{втрат}$)= 50 %;

Початкова кількість артемізинової кислоти в культуральній рідині складає $91 * 10,2 = 0,928$ кг, а кінцева кількість, з урахуванням 50 %-ів втрат, має становити 0,464 кг. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 8.1.

Таблиця 8.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати (разом 40 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	КР	91	-	91	- Збірник культуральної рідини об'ємом 120 л
Відокремлення біомаси від рідкої фази						
2	Сепарування культуральної рідини	КР,	91	20%	72,8	Сепаратор моделі МВРХ 810Н компанії Alfa Laval, зроблений із високоякісної нержавіючої сталі. Продуктивність 250 л/год.
		біомаса	-/-	-/-	18,2	
Виділення артемізинової кислоти						
3	Екстракція артемізинової кислоти	екстракт	72,8	10%	65,5	Установка дворазової протитечійної екстракції
		рафінат	-/-	-/-	7,28	
4	Концентрування екстракту	екстракт	65,5	-/-	-/	Вакуум-випарний апарат з висхідною плівкою
		Концентрат	-/-	10	20	
Очищення артемізинової кислоти						
5	Кристалізація	Концентрат	13,1	-//	-/-	Кристалізатор Нутч-фільтр Гранулятор
		Вологі кристали	-/-	10	15	

Закінчення табл. 8.1.

6	Перекристалізація	Вологі кристали	15	-/-	14,64	Кристалізатор Нутч-фільтр Гранулятор
		Вологі кристали	14,64	-	-	Вакуумна сушильна шафа, що вміщує до 100 кг продукту
7	Сушіння кристалів	Сухий кристалічний порошок	-/-	1%	0,464	Зберігається у ємності об'ємом 134 л (80 кг)
ПМВ 17 Пакування, маркування і відвантаження висушеного артемізиніну						
8	Пакування, маркування і відвантаження висушеного порошку	Сухий порошок	44,45 кг			
		Упакований у поліетиленові пакети порошок	-	1%	44	Фасувально-пакувальний апарат

РОЗДІЛ 9. ОПИС ПРОТИГЕЛЬМІНТНОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО

АНД

Основні фізико-хімічні властивості: білого або майже білого кольору, подовженої форми, двоопуклі, не вкриті таблетки з лінією розлому та відтиском;

Склад: діюча речовина: 1 таблетка містить артемізиніну 500 мг;
допоміжні речовини: крохмаль кукурудзяний, целюлоза мікрокристалічна, натрію метилпарабен (Е 219), натрію пропілпарабен (Е 217), натрію крохмальгліколят (тип А), кремнію діоксид колоїдний безводний, тальк, магнію стеарат, суха есенція змішаних фруктів, аспартам (Е 951), натрію лаурилсульфат.

Форма випуску. Таблетки.

Фармакотерапевтична група. Антипротозойні засоби, артемізинін та похідні, код АТС: P01BE03.

Фармакологічні властивості. Артемізиніни — це сімейство сесквітерпенових триоксанлактонових протималярійних засобів, отриманих із лікарської трави *Artemisia annua*, яка вже давно використовується в традиційній китайській медицині для лікування лихоманки. Механізм дії артемізинінів у протималярійній терапії полягає в їхній унікальній хімічній структурі, яка значно відрізняється від стандартного хіноліну, а також у значно швидшому виведенні малярійних паразитів із крові порівняно з іншими доступними протималярійними засобами. Артезунат, артеметер і артетер є більш широко використовуваними похідними артемізиніну при малярії і вони універсально перетворюються на активний метаболіт дигідроартемізинін (DHA) після введення в ротималярійні механізми дії артемізиніну, які, як правило, пов'язані з утворенням вільних радикалів артемізиніну внаслідок розщеплення ендопероксидного зв'язку гемовим

за лізоном у його структурі.					НУХТ БТЕК 02.02.19 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Степаненко І.Ю.			РОЗДІЛ 9. Опис протигельмінтного засобу згідно АНД	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Стабніков В.П.					103	10
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Ці вільні радикали артемізиніну можуть сприяти знищенню видів *Plasmodium* шляхом зміни біохімічних шляхів у паразитах, включаючи алкілування молекул гему та втручання в шлях детоксикації гема, інактивація саркоплазматичного ендоплазматичного ретикулуму кальцієвого насоса PфАТРase6 (SERCA), алкілування цитозольних білків, таких як PфТСТР, потенційного пухлинного білка, можливо пов'язаного з реплікацією паразитів і порушення мітохондріальних функцій.

Фармакокінетика. Фармакокінетичні властивості артемізиніна та його похідних загалом вивчені недостатньо у зв'язку з відсутністю методів їх визначення у тканинах та біологічних рідинах. Після введення в організм швидко гідролізуються з утворенням активного метаболіту – дигідроартемізиніна. Артезунат має коротший період напіввиведення (близько 1 год), ніж артеметер (4–12 год).

Показання для застосування. Лікування малярії, включаючи церебральні форми, при резистентності до інших препаратів (іноді разом з мефлохіном, хініном, галофантрином, піриметаміном/сульфадоксином або доксицикліном).

Побічні реакції

ШКТ: біль у животі, діарея.

Печінка: підвищення активності трансаміназ.

Гематологічні реакції: транзиторна ретикулоцитопенія та нейтропенія.

Інші: лікарська лихоманка, брадикардія.

Протипоказання.

Гіперчутливість до артемізиніна та його похідних. Вагітність.

Спосіб застосування та дози. Тільки для короткотривалого перорального застосування. Таблетки необхідно ковтати, запиваючи водою, не розжовувати.

Строго дотримуватись режиму та схем лікування протягом усього курсу, не пропускати дозу і приймати її через рівні проміжки часу. У разі пропуску дози прийняти її якнайшвидше; не приймати, якщо майже настав

час прийому наступної дози; не подвоювати дозу. Витримувати тривалість курсу.

Не використовувати препарати з терміном придатності, що минув.

Проконсультуватися з лікарем, якщо покращення не настає протягом декількох днів або з'являються нові симптоми.

При знаходженні в ендемічних регіонах вживати всіх необхідних заходів захисту від укусів комарів (захисні сітки, одяг, репеленти тощо).

Терміново звертатися до лікаря у разі розвитку лихоманки під час перебування в ендемічному регіоні та протягом кількох місяців після повернення.

Особливості застосування.

Вагітність. Повних досліджень безпеки люди не проводили. Застосування при вагітності не рекомендується.

Годування груддю. Дані про проникнення у грудне молоко відсутні. При призначенні жінкам, що годують, необхідно зіставляти можливу користь і ризик.

Педіатрія. Повні дослідження безпеки не проводились. Слід застосовувати обережно.

Умови та термін зберігання. Зберігати при температурі не вище 25°C. Зберігати у недоступному для дітей місці. Термін придатності – 3 роки.

Умови відпуску. Без рецепта.

Упаковка. По 30 таблеток у контурній чарунковій упаковці; по 1 контурній чарунковій упаковці у пачці.

СПЕЦИФІКАЦІЯ

на Артемізинін 500 мг

Таблиця 9.1

№	Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю
1.	Опис	Білого або майже білого кольору, подовженої форми, двоопуклі, не вкриті таблетки з лінією розлому та відтиском	За п.1, візуально
2.	Ідентифікація	Час утримування основного піку на хроматограмі випробуваного розчину має співпадати з часом утримування піку на хроматограмі розчину порівняння	За п. 2, ДФУ 2.2.24, ДФУ 2.2.29
3.	Розчинення	Не менше 75 % від вмісту артемізиніну, зазначеного в маркуванні	За п. 3, ДФУ 2.9.3, 2.2.29
4.	Однорідність дозованих одиниць	Допустиме відхилення 10%	За п. 4, ДФУ, 2.9.40.
5.	Розпадання	Не менше 16 із 18 випробовуваних таблеток розпалися	За п.5, ДФУ, 2.9.1
6.	Кількісне визначення	Не менше 95.0 % і не більше 105.0% від вмісту артемізиніну, зазначеного в маркуванні	За п. 6
7.	Мікробіологічна чистота	Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – не більше 10^3 КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – не більше 10^2 КУО/г. Відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 г.	За п. 7, ДФУ, .2.6.12
8.	Зберігання	Зберігати при температурі не вище 25 °С. Зберігати у недоступному для дітей місці.	Згідно інструкції до застосування
9.	Термін придатності	Термін придатності – 3 роки.	Згідно інструкції до застосування

Методи контролю

1. Опис.

Оцінку зовнішнього вигляду (органолептичних властивостей) проводять за ДФУ, статтею 2.9.1. «Таблетки» шляхом візуального огляду 20 таблеток. При цьому на таблетках не повинно бути наступних дефектів розміру, кольору, покриття, шрифту напису, розділової риски: виступи (поверхня в виступах, частинках порошку, що прилипли); заглиблення (лунки, викришені частини таблеток); бруд або пил на таблетках; мармуровість (нерівномірний колір, локальне, місцеве змінення кольору); відколи (відшарування або відколи таблеток, зменшення товщини); злипання (злипання двох таблеток разом або їх з'єднання зруйнованими поверхнями); крошіння; деформація (порушення округлості форми); подряпини (нанесення риски – подряпини по поверхні таблеток); дефект покриття (поверхня покриття нерівномірна, різної товщини, зміщена по відношенню до ядра). Таблетки повинні мати круглу чи іншу форму з плоским двоопуклими поверхнями, цільними краями, поверхня повинна бути гладкою і однорідною, колір – рівномірним,

Білого або майже білого кольору, подовженої форми, двоопуклі, не вкриті таблетки з лінією розлому та відтиском

2. Ідентифікація.

Переглядають хроматограми, одержані в кількісному визначенні. Визначення проводять згідно ДФУ 2.2.29, методом рідиної хроматографії.

На хроматограмі випробовуваного розчину час утримування основного піка має відповідати часу утримування основного піка на хроматограмі розчину порівняння.

3. Розчинення.

Середовище розчинення: буферний розчин рН 7.2 Р; 900 мл.

Обладнання: прилад 2, швидкість обертання 50 об/хв.

Час розчинення: 45 хв.

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (2.2.29) та згідно ДФУ 2.9.3.

Випробовуваний розчин. Аліквоту фільтрату проби розводять, якщо потрібно, середовищем розчинення, щоб одержати розчин з очікуваною концентрацією 0.2 мг/мл.

Розчин порівняння. Готують розчин із концентрацією 0.2 мг/мл стандартного зразка у середовищі розчинення.

Колонка:

— розмір: 0.25 м × 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель для хроматографії октадецилсилільний, ендкепований Р (10 мкм)(1).

Рухома фаза: фосфорна кислота Р – вода Р – метанол Р (3:247:750).

Швидкість рухомої фази: 1.5 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 264 нм.

Інжекція: 20 мкл.

Обчислюють вміст артемізиніну в середовищі розчинення, враховуючи заявлений вміст у стандартному зразку.

Не менше 75 % від вмісту артемізиніну, зазначеного в маркуванні.

4. Однорідність дозованих одиниць.

Визначення проводять за ДФУ 2.9.40., стаття Однорідність дозованих одиниць.

Точно зважують кожну з 10 відібраних таблеток. Розраховують вміст діючої речовини в кожній таблетці у відсотках від номінального вмісту виходячи з маси окремої таблетки та результату кількісного визначення. Розраховують приймальне число.

Нормування: допустиме відхилення 10%.

5. Розпадання

Випробування проводять за ДФУ, 2.9.1., стаття Таблетки.

Таблетки, вкриті оболонкою, за винятком таблеток, вкритих плівковою оболонкою, мають витримувати випробування на розпадання таблеток і

капсул. Як рідке середовище використовують воду Р. У кожную скляну трубку поміщають диск. Прилад вмикають на 60 хв, якщо не обґрунтовано та не дозволено інше. Якщо жодна з таблеток не розпалася, випробування повторюють на наступних шести таблетках, замінивши воду Р у посудині на 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти. Якщо 1 або 2 таблетки не розпалися, випробування повторюють на 12 додаткових таблетках. Вимоги випробування вважаються виконаними, якщо не менше 16 із 18 випробовуваних таблеток розпалися. Таблетки, вкриті плівковою оболонкою, мають витримувати випробування на розпаданні в умовах, прийнятих для таблеток без оболонки, за такої умови прилад вмикають на 30 хв, якщо не обґрунтовано та не дозволено інше.

Не менше 16 із 18 випробовуваних таблеток розпалися.

6. Кількісне визначення.

Визначення артемізинінової кислоти в субстанції проводять хроматографічним методом [53].

Розчинник: суміш гексану, ацетону, толуолу і дегідратованого спирту (10: 7: 7: 6).

Рухома фаза: готова відфільтрована і дегазована суміш гексану і етилацетату (75:25).

Стандартний розчин: Розчинений стандарт USP ART RS в рухомій фазі концентрацією 150 мкг / мл.

Хроматографічна система оснащена детектором 446 нм і колонкою 4,6 мм × 25 см, що містить 5 мкм упаковки L3. Швидкість потоку рухомої фази близько 1,5 мл /хв.

Процедура. Ввести 10 мкл тестового розчину в хроматограф, записати хроматограму і виміряти пікові відповіді. Відсотковий вміст артемізинінової кислоти розраховують за формулою щодо загальної кількості в порошку.

$$100 * (r_i / r_s)$$

в якій r_i – індивідуальне пікове значення артемізинінової кислоти в тестовому розчині;

а r_s - сума відповідей всіх піків: не менше 85,0% артемізинінової кислоти.

Кількість артемізинінової кислоти в препараті розраховують за формулою:

$$T (r_i / r_s)$$

в якій T являє собою вміст у відсотках від загальної кількості артемізинінової кислоти;

в якій r_i – індивідуальне пікове значення артемізинінової кислоти в тестовому розчині;

а r_s - сума відповідей всіх піків: не менше 85,0% артемізинінової кислоти [53].

Не менше 95.0 % і не більше 105.0% від вмісту артемізиніну, зазначеного в маркуванні.

7. Мікробіологічна чистота.

Субстанції і допоміжні речовини для виробництва готових лікарських засобів для орального застосування повинні відповідати таким вимогам щодо мікробіологічної чистоти:

- Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів - не більше 10^3 бактерій і не більше 10^2 грибів у грамі або мілілітрі;
- Відсутність бактерій родини *Enterobacteriaceae* в 1 г або 1 мл;
- Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г або 1 мл;
- Відсутність *Staphylococcus aureus* в 1 г або 1 мл.

Визначення проводять згідно ДФУ п. 2.6.12.

Визначення мікробіологічної чистоти здійснюють методом висіву на чашки Петрі. Висів можна здійснювати глибинним або поверхневим способом.

Спочатку готують розведення гормону 1:10. 10 г соматотропіну розчиняють у 100 мл буферного розчину із натрію хлоридом і пептоном рН 7,0. Далі роблять 5 пасажей розведень.

Метод глибинного висівання: у кожен чашку Петрі вносять 1 мл розведення і 15-20 мл розплавленого густого поживного середовища для вирощування бактерій (МПА) або для грибів (середовище Сабуро). Температура середовища має становити не більше 45°C. Роблять посів на дві чашки Петрі з кожним середовищем. Посіви інкубують при температурі від 30°C до 35°C для бактерій та від 20°C до 25°C для грибів протягом п'яти діб.

Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости, і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 грамі.

Метод поверхневого висівання: 0,1 мл розведення розподіляють по поверхні поживного середовища для вирощування бактерій (МПА) або для грибів (середовище Сабуро). Роблять посів на дві чашки Петрі з кожним середовищем. Посіви інкубують при температурі від 30°C до 35°C для бактерій та від 20°C до 25°C для грибів протягом п'яти діб.

Обчислюють середнє арифметичне значення числа колоній, які вирости, і визначають число колонієутворюючих одиниць у 1 грамі.

Також проводять випробування на окремі види мікроорганізмів.

Родина *Enterobacteriaceae*

10 мл розведення соматотропіну вносять у 100 мл поживного середовища № 3, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашки Петрі з густими поживними середовищами №4 і №5. Посіви інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Наявність на середовищах характерного росту грамнегативних паличок, вказує на забруднення соматотропіну бактеріями родини *Enterobacteriaceae* та деякими іншими грамнегативними бактеріями:

- середовище № 4: круглі малинові з металевим блиском або без нього колонії; рожеві, безбарвні, блискучі опуклі колонії діаметром від 2 мм до 4 мм;

○ середовище № 5: чорні з металевим блиском колонії, ділянки середовища під якими забарвлені в чорний колір; зеленувато-бурі, ясно-зелені, бурі колонії.

10 мл розведення соматотропіну вносять у 100 мл поживного середовища №8, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №10 і інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Ріст золотаво-жовтих колоній, оточених жовтими зонами (що свідчить про ферментацію маніту), указує на можливість забруднення соматотропіну *S. aureus*.

10 мл розведення соматотропіну вносять у 100 мл поживного середовища №8, гомогенізують і інкубують при температурі 35-37°C впродовж 18-24 год.

Якщо спостерігаються ознаки помутніння, бродіння, то роблять пересів на чашку з густим поживним середовищем №9 і інкубують при температурі 35-37°C протягом 24-48 год.

Ріст зеленуватих, як правило, флуоресціюючих колоній (рис. 5.4), блакитних в ультрафіолетовому світлі (що свідчить про наявність пігменту піоціаніну), указує на можливість забруднення соматотропіну *P. aeruginosa*.

Загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) – не більше 10^3 КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – не більше 10^2 КУО/г. Відсутність *Escherichia coli* в 1 г.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Andrew A Lover, J Kevin Baird, Roly Gosling, Ric N Price. Malaria Elimination: Time to Target All Species/ Am J Trop Med Hyg. 2018 Jul;99(1):17-23. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0869> .
2. Boden R. Editorial: on artemisinin, avermectins and Nobel prizes. FEMS Microbiol Letts 2015; 362(23): Article number fnv 199.
3. Danny A Milner Jr. Malaria Pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jan 2;8(1):a025569. doi: 10.1101/cshperspect.a025569.
4. Wang J, Xu C, Wong YK, Li Y, Liao F, Jiang T, Tu Y (2019). "Artemisinin, the Magic Drug Discovered from Traditional Chinese Medicine". Engineering. 5 (1): 32–9. doi:10.1016/j.eng.2018.11.011.
5. Andrew A Lover, J Kevin Baird, Roly Gosling, Ric N Price. Malaria Elimination: Time to Target All Species/ Am J Trop Med Hyg. 2018 Jul;99(1):17-23. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0869> .
6. Boden R. Editorial: on artemisinin, avermectins and Nobel prizes. FEMS Microbiol Letts 2015; 362(23): Article number fnv 199.
7. Danny A Milner Jr. Malaria Pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jan 2;8(1):a025569. doi: 10.1101/cshperspect.a025569 .
8. Pelfrene E, Pinheiro MH, Cavaleri M (2015). "Artemisinin-based combination therapy in the treatment of uncomplicated malaria: review of recent regulatory experience at the European Medicines Agency". International Health. 7 (4): 239–46. doi:10.1093/inthealth/ihv017.
9. Wicht KJ, Mok S, Fidock DA (September 2020). "Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Plasmodium falciparum Malaria". Annual Review of Microbiology. Annual Reviews. 74 (1): 431–454. doi:10.1146/annurev-micro-020518-115546. PMC 8130186. PMID 32905757.
10. Li Y (2012). "Qinghaosu (artemisinin): chemistry and pharmacology". Acta Pharmacologica Sinica. 33 (9): 1141–6. doi:10.1038/aps.2012.104. PMC 4003104. PMID 22922345.

11. Aderibigbe BA (2017). "Design of Drug Delivery Systems Containing Artemisinin and Its Derivatives". *Molecules*. 22 (2): 323. doi:10.3390/molecules22020323.
12. Pelfrene E, Pinheiro MH, Cavaleri M (2015). "Artemisinin-based combination therapy in the treatment of uncomplicated malaria: review of recent regulatory experience at the European Medicines Agency". *International Health*. 7 (4): 239–46. doi:10.1093/inthealth/ihv017
13. Morris CA, Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Jung D, Shin CS, Fleckenstein L (2011). "Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration". *Malaria Journal*. 10 (1): 263. doi:10.1186/1475-2875-10-263
14. Tilley L, Straimer J, Gnädig NF, Ralph SA, Fidock DA (2016). "Artemisinin Action and Resistance in *Plasmodium falciparum*". *Trends in Parasitology*. 32 (9): 682–96. doi:10.1016/j.pt.2016.05.010
15. Winzeler EA, Manary MJ (2014). "Drug resistance genomics of the antimalarial drug artemisinin". *Genome Biology*. 15 (11): 544. doi:10.1186/s13059-014-0544-6
16. Phyo AP, Nkhoma S, Stepniewska K, Ashley EA, Nair S, McGready R, et al. (2012). "Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study". *Lancet*. 379 (9830): 1960–6. doi:10.1016/S0140-6736(12)60484-X
17. Briggs M (July 30, 2014). "Call for 'radical action' on drug-resistant malaria". BBC News. Retrieved 2013-07-30.
18. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. (2014). "Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria". *The New England Journal of Medicine*. 371 (5): 411–23. doi:10.1056/NEJMoa1314981.
19. Ariev F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. (2014). "A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*

malaria". *Nature*. 505 (7481): 50–5. Bibcode:2014Natur.505...50A. doi:10.1038/nature12876.

20. Bushra Hafeez Kiani 1, Waqas Khan Kayani 2, Asma Umer Khayam 3, Erum Dilshad 4, Hammad Ismail 5, Bushra Mirza 3 Artemisinin and its derivatives: a promising cancer therapy/ *Mol Biol Rep* 2020 Aug;47(8):6321-6336. doi: 10.1007/s11033-020-05669-z. Epub 2020 Jul 24.

21. Silvia Slezakova 1, Jana Ruda-Kucerova . Anticancer Activity of Artemisinin and its Derivatives *Anticancer Res*. 2017 Nov;37(11):5995-6003. doi: 10.21873/anticancer.12046.

22. Robert A, Benoit-Vical F, Liu Y, Meunier B (2019). Sigel A, Freisinger E, Sigel RK, Carver PL (eds.). "Small Molecules: The Past or the Future in Drug Innovation?". *Metal Ions in Life Sciences*. de Gruyter mbH. 19: 17–48.

23. James Kirby, Dante W. Romanini, Eric M. Paradise and Jay D. Keasling Engineering triterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* – b-amylin synthase from *Artemisia annua*. *FEBS Journal* 275 (2008) 1852–1859. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06343.x

24. Nivedita Patra, Ashok K Srivastava Artemisinin production by plant hairy root cultures in gas- and liquid-phase bioreactors *Plant Cell Rep* . 2016 Jan;35(1):143-53. doi: 10.1007/s00299-015-1875-9.

25. Cockram J, Hill C, Burns C, Arro RRJ, Woolley JG, Flockart I, Robinson T, Atkinson CJ, Davies MJ, Dungey N, Greenland AJ, Smith LLMJ, Bentley S. Screening a diverse collection of *Artemisia annua* germplasm accessions for the antimalarial compound, artemisinin. *Plant Gen Res*. 2012;10:152–154. doi: 10.1017/S1479262112000159.

26. Delabays N, Simonnet X, Gaudin M. The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. *Curr Med Chem*. 2001;8:1795–1801. doi: 10.2174/0929867013371635.

27. Larson TR, Branigan C, Harvey D, Penfield T, Bowles D, Graham IA. A survey of artemisinic and dihydroartemisinic acid contents in glasshouse and

global field-grown populations of the artemisinin-producing plant *Artemisia annua* L. *Ind Crops Prod.* 2013;45:1–6. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.12.004.

28. Graham IA, Besser K, Blumer S and al. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. *Science.* 2010;327:328–331. doi: 10.1126/science.1182612.

29. Townsend T, Segura V, Chigeza G, Penfield T, Rae A, Harvey D, Bowles D, Graham IA. The use of combining ability analysis to identify elite parents for *Artemisia annua* F1 hybrid production. *PLoS One.* 2013;8:e61989. doi: 10.1371/journal.pone.0061989.

30. Liu C, Zhao Y, Wang Y. Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;74:11–20. doi: 10.1007/s00253-006-0452-0.

31. Wang J, Nie J, Pattanaik S, Yuan L. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. using young inflorescence. *In Vitro Cell Dev Biol.* 2016;52:204–211. doi: 10.1007/s11627-015-9744-3.

32. Banyai W, Kirdmanee C, Mii M, Supaibulwatana K. Overexpression of farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) gene affected artemisinin content and growth of *Artemisia annua* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010;103:255–265. doi: 10.1007/s11240-010-9775-8.

33. Xiang L, Zeng L, Yuan Y, Chen M, Wang F, Liu X, Zeng L, Lan X, Liao Z. Enhancement of artemisinin biosynthesis by overexpressing *dxr*, *cyp71av1* and *cpr* in the plants of *Artemisia annua* L. *Plant Omics J.* 2012;5:503–507.

34. Yuan Y, Liu W, Zhang Q, Xiang L, Liu X, Chen M, Lin Z, Wang Q, Liao Z. Overexpression of artemisinic aldehyde $\Delta 11(13)$ reductase gene-enhanced artemisinin and its relative metabolite biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* L. *Biotechnol Appl Biochem.* 2015;62:17–23. doi: 10.1002/bab.1234

35. Chen Y, Shen Q, Wang Y, Wang T, Wu S, Zhang L, Lu X, Zhang F, Jiang W, Qiu B, Gao E, Sun X, Tang K. The stacked over-expression of FPS, CYP71AV1 and CPR genes leads to the increase of artemisinin level in *Artemisia annua* L. *Plant Biotechnol Rep.* 2013;7:287–295. doi: 10.1007/s11816-012-0262-z.

36. Alam P, Kamaludding Sharaf-Eldin MA, Elkholy SF, Abdin MZ. The effect of over-expression of rate limiting enzymes on the yield of artemisinin in *Artemisia annua*. *Rend Fis Acc Lincei*. 2015;27:311–319. doi: 10.1007/s12210-015-0481-7
37. Zhang L, Jin F, Li F, Li M, Wang Y, Wang G, Sun X, Tang K. Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing. *Biotechnol Appl Biochem*. 2009;52:199–207. doi: 10.1042/BA20080068.
38. Zhang L, Jin F, Li F, Li M, Wang Y, Wang G, Sun X, Tang K. Development of transgenic *Artemisia annua* (Chinese wormwood) plants with an enhanced content of artemisinin, an effective anti-malarial drug, by hairpin-RNA-mediated gene silencing. *Biotechnol Appl Biochem*. 2009;52:199–207. doi: 10.1042/BA20080068.
39. Marienhagen J, Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J Biotechnol*. 2013;163:166–178. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.001.
40. Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol*. 2003;21:796–802. doi: 10.1038/nbt833
41. Newman JD, Marshall J, Chang M, Nowroozi F, Paradise E, Pitera D, Newman KL, Keasling JD. High-level production of amorpha-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95:684–691. doi: 10.1002/bit.21017.
42. Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, Keasling JD. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metab Eng*. 2007;9:193–207. doi: 10.1016/j.ymben.2006.11.002.
43. Tsuruta H, Paddon CJ, Eng D, Lenihan JR, Horning T, Anthony LC, Regentin R, Keasling JD, Renninger NS, Newman JD. High-level production of

amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in *Escherichia coli*. PLoS One. 2009;4:e4489. doi: 10.1371/journal.pone.0004489

44. Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P, Tollbom O, Schelin J, Brodelius M, Brodelius PE. Production of the artemisinin precursor amorpha-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Lett. 2006;28:571–580. doi: 10.1007/s10529-006-0015-6

45. Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, Burd H, Eng D, Paddon CJ, Newman JD, Keasling JD. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. BMC Biotechnol. 2008;8:83. doi: 10.1186/1472-6750-8-83.

46. Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, EngD Woolard FX, Regentin R, Horning T, Tsuruta H, Melis DJ, Owens A, Fickes S, Diola D, Benjamin KR, Keasling JD, Leavell MD, McPhee DJ, Renninger NS, Newman JD, Paddon CJ. Production of amorpha-4,11-diene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109:E111–E118. doi: 10.1073/pnas.1110740109.

47. Paddon CJ, Westfall PJ, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. Nature. 2013;496:528–532. doi: 10.1038/nature12051.

48. Horváth Z, Horosanskaia E, Lee JW, Lorenz H, Gilmore K, Seeberger PH, Seidel-Morgenstern A. Recovery of artemisinin from a complex reaction mixture using continuous chromatography and crystallization. Org Process Res Dev. 2015;19:624–634. doi: 10.1021/acs.oprd.5b00048.

49. Bo-Xuan Zeng, Ming-Dong Yao, Ying Wang Wen-Hai Xiao and Ying-Jin Yuan. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Enhanced Dihydroartemisinic Acid Production // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology – 2020. - V. 8. – p.1-11 doi: 10.3389/fbioe.2020.00152

50. Ciftci ON, Cahyadi J, Guigard SE, Saldaña MDA. Optimization of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. with supercritical carbon dioxide

plus ethanol using response surface methodology. *Electrophoresis*. 2018;39(15):1926-1933.

51. Rodrigues MFF, Sousa IMO, Vardanega R, et al. Techno-economic evaluation of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. Using supercritical carbon dioxide. *Ind Crop Prod*. 2019;132:336-343.

52. Zhang YQ, Prawang P, Li CS, et al. Ultrasonic assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. using monoether-based solvents. *Green Chem*. 2018;20(3):713-723.

53. Silva ED, Borges LL, da Conceicao EC, Bara MTF. Box–Behnken experimental design for extraction of artemisinin from *Artemisia annua* and validation of the assay method. *Braz J Pharmacog*. 2017;27(4):519-524.

54. Pelfrene E, Pinheiro MH, Cavaleri M (2015). "Artemisinin-based combination therapy in the treatment of uncomplicated malaria: review of recent regulatory experience at the European Medicines Agency". *International Health*. 7 (4): 239–46. doi:10.1093/inthealth/ihv017.

55. Li Y (2012). "Qinghaosu (artemisinin): chemistry and pharmacology". *Acta Pharmacologica Sinica*. 33 (9): 1141–6. doi:10.1038/aps.2012.104. PMC 4003104. PMID 22922345.

56. Morris CA, Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Jung D, Shin CS, Fleckenstein L (2011). "Review of the clinical pharmacokinetics of artesunate and its active metabolite dihydroartemisinin following intravenous, intramuscular, oral or rectal administration". *Malaria Journal*. 10 (1): 263. doi:10.1186/1475-2875-10-263

57. James Kirby, Dante W. Romanini, Eric M. Paradise and Jay D. Keasling Engineering triterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* – b-amyrin synthase from *Artemisia annua*. *FEBS Journal* 275 (2008) 1852–1859. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06343.x

58. Nivedita Patra, Ashok K Srivastava Artemisinin production by plant hairy root cultures in gas- and liquid-phase bioreactors *Plant Cell Rep* . 2016 Jan;35(1):143-53. doi: 10.1007/s00299-015-1875-9.

59. Cockram J, Hill C, Burns C, Arro RRJ, Woolley JG, Flockart I, Robinson T, Atkinson CJ, Davies MJ, Dungey N, Greenland AJ, Smith LLMJ, Bentley S. Screening a diverse collection of *Artemisia annua* germplasm accessions for the antimalarial compound, artemisinin. *Plant Gen Res.* 2012;10:152–154. doi: 10.1017/S1479262112000159.

60. Larson TR, Branigan C, Harvey D, Penfield T, Bowles D, Graham IA. A survey of artemisinic and dihydroartemisinic acid contents in glasshouse and global field-grown populations of the artemisinin-producing plant *Artemisia annua* L. *Ind Crops Prod.* 2013;45:1–6. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.12.004.

61. Liu C, Zhao Y, Wang Y. Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;74:11–20. doi: 10.1007/s00253-006-0452-0.

62. Marienhagen J, Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J Biotechnol.* 2013;163:166–178. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.001.

63. Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P, Tollbom O, Schelin J, Brodelius M, Brodelius PE. Production of the artemisinin precursor amorpha-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 2006;28:571–580. doi: 10.1007/s10529-006-0015-6

64. Основні аспекти лікування та профілактики інвазивних захворювань підліткового віку [Електронний ресурс] / М. Р. Матушак, О. М. Горошко, О. І. Захарчук, В. І. Федюк, Л. В. Костишин, М. А. Ежнед, І. М. Сахацька, Н. В. Михайлюк // *Клінічна та експериментальна патологія.* - 2020. - Т. 19, № 3. - С. 72-78.

65. Препарати від глистів [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://zr.in.ua/catalog/preparaty-ot-glistov> .

66. Лич І.В. Промислова технологія лікарських засобів [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студ. освітнього ступеня бакалавр спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. та заоч. форм навч. / І.В. Лич. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.

67. Медичне та фармацевтичне товарознавство : підручник для студентів вищ. навч. закладів / І. І. Баранова, С. М. Коваленко, Ю. О. Безпала, Т. В. Дядюн, С. О. Мамедова. — Х. : НФаУ : Оригінал, 2016. — 304 с.

68. Ямнюк О. К. Сучасні види упаковки готових лікарських засобів / О. К. Ямнюк ; наук. кер. С. М. Гурєєва // Наукові розробки молоді на сучасному етапі: тези доповідей XVII Всеукраїнської наукової конференції молодих вчених та студентів (26-27 квітня 2018 р., Київ). - Київ : КНУТД, 2018. - Т. 1 : Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення. - С. 521-523.

69. Медичне та фармацевтичне товарознавство : підручник для студентів вищ. навч. закладів / І. І. Баранова, С. М. Коваленко, Ю. О. Безпала, Т. В. Дядюн, С. О. Мамедова. — Х. : НФаУ : Оригінал, 2016. — 304 с.

70. Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., ... Banat, I. M. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *Journal of Basic Microbiology*, – 2017. - V.57(5), P.364-375. doi:10.1002/jobm.201600658

71. Nivedita Patra, Ashok K Srivastava Artemisinin production by plant hairy root cultures in gas- and liquid-phase bioreactors *Plant Cell Rep* . 2016 Jan;35(1):143-53. doi: 10.1007/s00299-015-1875-9.

72. James Kirby, Dante W. Romanini, Eric M. Paradise and Jay D. Keasling Engineering triterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* – b-amylin synthase from *Artemisia annua*. *FEBS Journal* 275 (2008) 1852–1859. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06343.x

73. Біотехнологія. Методичні рекомендації до виконання в дистанційному режимі контрольних і тестових завдань з дисциплін «Біотехнологія», «Основи промислової біотехнології» студентами спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / С.М. Лисицька; М-во освіти і науки України, Нац. техн. ун-т «Дніпровська політехніка» – Дніпро : НТУ «ДП», 2021. – 43 с.

74. Методичні вказівки до практичних занять з дисципліни «Основи проектування» для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»/ Укладач: Гуляєв В.М. - Кам'янське: ДДТУ, 2019 р. – 71 с.

75. Конспект лекцій з дисципліни „Загальна біотехнологія” для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти за освітньо-професійною програмою «Біотехнології та біоінженерія» зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія/ Укл.: старший викладач Філімоненко О.Ю. – Кам'янське, ДДТУ, 2019.– 158 с.

76. Конспект лекцій до розділу «Екстракція» з курсу “Процеси та апарати хімічних виробництв” для студентів III-IV курсів усіх спеціальностей / Укл.: С.О. Опарін, О.С. Смирнова. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2011. – 32 с.

77. Філімонова І.А. Процеси та апарати харчових виробництв: Навч.-мет. посібник для самостійної роботи студентів / І.А.Філімонова // – Умань: видавничо-поліграфічний центр «Візаві», 2014. – 105 с.

78. What is Hexane Solvent? [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.maratek.com/blog/what-is-hexane-solvent> .

79. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв [Електронний ресурс]: Навч. посібник. – К.:НУХТ, 2022. –373 с.

80. Опорний конспект лекцій з дисципліни «Методи розділення та концентрування в аналітичній хімії» [Текст] / Ф.О. Чмиленко, Л.П. Жук, Т.С. Чмиленко. – Д.: РВВ ДНУ, 2012. – 28 с.

81. Методичні вказівки до виконання курсового проекту на тему "Розрахунок однокорпусної випарної установки" з курсу “Основні процеси та апарати хімічної технології” для студентів IV – V курсів усіх спеціальностей і форм навчання / Укл.: Т.Ю. Гіріч, В.М. Задорожній, Т.П. Єльцова. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2009. – 36 с.

82. Моделювання процесів мембранного розділення: навчальний посібник [Електронний ресурс]: навч. посіб. для студ. спеціальності 133 «Галузеве машинобудування», спеціалізації «Інжиніринг, комп'ютерне моделювання та проектування обладнання хімічних і нафтопереробних виробництв» / КПІ ім. Ігоря Сікорського; уклад.: С.В. Гулієнко. – Електронні текстові данні (1 файл: 3,17 Мбайт). – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 166 с.

83. Конспект лекцій з курсу "Основні процеси та апарати хімічної технології". Розділ "КРИСТАЛІЗАЦІЯ" для студентів усіх спеціальностей / Укл.: Т.Ю. Гіріч, Т.П. Єльцова, П.В. Рябік. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2010. – 26 с.

84. Практикум з органічної хімії : метод. вказівки з органічної хімії для студентів II, III курсів ф-ту хімії та фармації (денного та заочного відділень) / В. В. Ведута, Н. Ф. Федько, О. В. Шевченко. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2019. – 80 с.

85. Конспект лекцій з дисципліни «Сучасні технології сушіння та випалювання матеріалів» для здобувачів вищої освіти другого (магістерського) рівня зі спеціальності 144 Теплоенергетика / Укл. доцент Долгополов І.С. - Кам'янське, ДДТУ, 2018. - 75с.

86. Ткаченко С. Й., Співак О. Ю. Сушильні процеси та установки. Навчальний посібник. - Вінниця: ВНТУ, 2007. - 76 с.

87. Аналізатор вологості KERN MLB 50-3N [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.investlab.com.ua/vlagomery/analizator-vlazhnosti-kern-mlb-50-3n/> .

88. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. — Т. 1. — 1128 с.

89. І.В. Лич, М.М. Антонюк. Промислова технологія лікарських засобів: лабораторний практикум для студентів напрям6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання. — К.: НУХТ, 2011. — 111 с.

90. Автоматична Блістерна Лінія DPP-120 [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://chumaki.in.ua/ua/p1025311551-avtomatichna-blisterna-liniya.html>.

91. Лебединець В. О. Підготовка персоналу підприємства з виробництва лікарських засобів при впровадженні та в умовах функціонування системи управління якістю / В. О. Лебединець // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2014. – № 1(33). – С. 28-35.

92. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.

93. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 14 грудня 2001 року № 502 «Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів».

94. Поводзинський В.М. Основи проектування: Конспект лекцій для студ. спец. 6.092900 “Промислова біотехнологія” та 6.092902 “Біотехнологія біологічно активних речовин”, напряму 0929 “Біотехнологія” ден. форми навч. – К.: НУХТ, 2005.

95. НАКАЗ. 18.05.2013 N 398. Про внесення змін до наказу Міністерства охорони здоров'я України від 16 лютого 2009 року N 95.

96. Контроль якості фармацевтичної води та управління ризиками водопідготовки під час виробництва моноклональних антитіл. Фармацевтична галузь/ Pharmaceutical Industry review, 2022 №4 (93) жовтень. [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://promoboz.com/journal/2022/4-93-october/kontrol-yakosti-farmatsevtychnoyi-vody-ta-upravlinnya-ryzykamy-vodopidgotovky-pid-chas-vyrobnytstva-monoklonalnyh-antytil/> .