

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Жолобка Олександр Віталійович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Рекомбінантні лактоферини мікробного походження

керівник роботи Скроцька Оксана Ігорівна, доцент, к.б.н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 780-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2023

3. Вихідні дані до роботи Лактоферин

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Огляд літератури. Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу. Розділ 3. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних. Розділ 4. Контроль виробництва субстанції. Розділ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ. Розділ 6. Матеріальний баланс на серію лікарського засобу. Розділ 7. Специфікація обладнання (етапи виділення і очищення субстанції та отримання ЛЗ). Розділ 8. Опис технологічної схеми (післяферментаційне виділення і очищення субстанції та отримання ЛЗ). Розділ 9. Опис лікарського засобу згідно АНД.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема ділянок отримання субстанції лактоферину та отримання лікарського засобу – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема ділянок отримання субстанції лактоферину та отримання лікарського засобу – 1 аркуш формату А0.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Огляд літератури	01.11.22–08.11.22	
2	Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	09.11.22–16.11.22	
3	Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних	17.11.22–25.11.22	
4	Контроль виробництва субстанції	26.11.22–04.12.22	
5	Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ	05.12.22–13.12.22	
6	Матеріальний баланс на серію лікарського засобу	14.12.22–22.12.22	
7	Специфікація обладнання (етапи виділення і очищення субстанції та отримання ЛЗ)	23.12.22–31.12.22	
8	Опис технологічної схеми (післяферментаційне виділення і очищення субстанції та отримання ЛЗ)	01.01.23–09.01.23	
9	Опис лікарського засобу згідно АНД	10.01.23–18.01.23	
10	Оформлення пояснювальної записки	19.01.23–03.02.23	
11	Виконання графічної частини роботи	19.01.23–03.02.23	

Здобувач

(підпис)

Керівник роботи

(підпис)

Олександр ЖОЛОбКО

(ім'я та прізвище)

Оксана СКРОЦЬКА

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології отриманню субстанції лактоферину з подальшим виробництвом лікарського засобу. Нині дослідження присвячені отриманню лактоферину та його похідних мікробним шляхом стають все більш актуальними, через виявлені властивості лактоферину (антибактеріальні, антифунгальні та протипухлинні). Так в дослідженнях за допомогою генних модифікацій мікроорганізмів, здатність до синтезу проявляється у представників родів *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Pichia* та *Saccharomyces*. Серед даних представників кращим продуцентом є *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf*, через найменшу умовну вартість синтезованого лактоферину (5,011 грн/г).

Технологічний процес отримання субстанції лактоферину включає: зберігання культуральної рідини, видалення біомаси, доочищення фільтрату, виділення лактоферину, знесолення елюенту, сушіння, подрібнення та зберігання субстанції лактоферину. Технологія отримання лікарського засобу передбачає наявність допоміжних робіт (підготовка вентиляційного повітря, підготовка води питної, підготовка води очищеної, приготування дезінфекційних засобів та допоміжних розчинів) та технологічний процес (приготування лактоферину покритого плівкою, отримання суміші для капсулювання, капсулювання та фасування і маркування).

Кваліфікаційна робота складається з вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (131 найменування), апаратурної та технологічної схеми (1 аркуш формату A0 та 1 аркуш формату A1). Загальний обсяг роботи – 111 сторінок, 4 рисунки та 11 таблиць.

Ключові слова: лактоферин, отримання субстанції лактоферину, *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf*, залізодефіцитна анемія, капсулювання, пероральний лікарський засіб, кишковорозчинні капсули.

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобо О.В.						
Перевір.		Скороцька О.І.					2	111
Консультан						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	2
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	7
1.1. Властивості лактоферинів	7
1.1.1. Антимікробні властивості.....	7
1.1.2. Протипухлинні властивості	10
1.1.2.1. Вплив лактоферину на рак молочної залози.....	10
1.1.2.2. Застосування лактоферину при лейкемії	12
1.1.2.3. Інші відомі взаємодії лактоферину та його похідних на протипухлинні клітини	14
1.2. Біотехнологія рекомбінантних лактоферинів та їх похідних	15
1.2.1. Експресія лактоферинів в мікроорганізмах	16
1.2.2. Похідні лактоферинів.....	21
1.2.2.1. Лактоферицин	21
1.2.2.2. Химерний пептид (лактоферицин-лактоферампін).....	23
РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	26
2.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання, потреби у ЛЗ	26
2.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу	30
2.2.1. Обґрунтування форми випуску ЛЗ	30
2.2.2. Обґрунтування вибору первинної та вторинної упаковки ЛЗ	36
2.3. Обґрунтування вибору біологічного агента для отримання субстанції	37
2.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.....	42
РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми виділення.....	44
3.1. Видалення біомаси	45
3.2. Доочищення фільтрату	47
3.3. Іонообмінне виділення лактоферину	48
3.4. Знесолення елюату	49
3.5. Сушіння лактоферину	50

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобка О.В.						
Перевір.		Скроцька О.І.					3	111
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

3.6. Подрібнення порошкоподібного лактоферину.....	51
3.7. Зберігання субстанції	51
РОЗДІЛ 4. Контроль виробництва субстанції	56
РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лз.....	63
5.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік	63
5.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовки персоналу, дезинфікуючих засобів, вентиляційного повітря).....	67
5.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	69
5.4. Обґрунтування вибору підготовки води	70
5.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання	71
РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс на серію лікарського засобу	74
РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання (етапи виділення і очищення субстанції та отримання лз).....	76
РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми (післяферментаційне виділення і очищення субстанції та отримання лз).....	79
РОЗДІЛ 9. Опис лікарського засобу згідно анд.....	87
ВИСНОВКИ	95
Список використаної літератури	97

ВСТУП

Станом на сьогодні, у світі зростає потреба в виробництві природних речовин, які можуть стати аналогами синтетичних і не будуть поступатись їм у властивостях та, навпаки, будуть проявляти кращі показники, ніж існуючі нині речовини. Так, через свої властивості та природу походження з кожним роком все більше збільшується попит на лактоферин, який нині використовують при виробництві біологічно активних добавок, дитячого харчування, фармацевтичної та косметичної продукції [1].

Лактоферин був вперше ідентифікований в 1939 році як забарвлений у червоний колір білок, який був присутній у коров'ячому молоці. Згодом було встановлено, що даний білок може зв'язувати тривалентне залізо, внаслідок чого він і має червоне забарвлення [2]. Даний білок є членом сімейства трансферинів, основною його функцією в організмі людини є засвоєння, транспортування та зберігання заліза. Однак, це не єдина функція лактоферину, він також має низку перспективних в біофармацевтичному відношенні властивостей, а саме: антибактеріальну, антивірусну, протигрибкову, протипаразитичну, імуномодуляційну, антиоксидантну та регенеративну [2]. Завдяки своїм властивостям лактоферин та його похідні можуть широко застосовуватися в різних галузях, таких як харчова та фармацевтична промисловість та медицина.

Лактоферин виробляється в багатьох секретах ссавців, включаючи молозиво, молоко, сльози, слину [2, 3]. Найбільш висока концентрація лактоферину спостерігається в молозиві людини (приблизно 6-8 мг/мл), в грудному молоці (1-2 мг/мл). В коров'ячому молозиві показники концентрації співпадають з концентрацією ЛФ в грудному молоці людини, а в молоці показники концентрації дуже низькі (0,02-0,35 мг/мл) [4].

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Жолобка О.В.			ВСТУП	Літ.	Арк.
Перевір.		Скороцька О.І.					Аркушів
Консультант							5
Н. Контр.							111
Затверд.		Стабніков В.П.				Кафедра БТМ	

За будовою молекула лактоферину складається з одного поліпептидного ланцюга, довжиною приблизно 700 амінокислотних залишків, за амінокислотою послідовністю структура лактоферина людини та миші мають 70% гомології, людини та корови – 69 % [5]. Незважаючи на те що рецептори людини більш специфічні до лактоферину людини, ніж великої рогатої худоби [6], вони, як зазначалось вище, мають високу гомологію та проявляють подібні властивості, з чого випливає, що лактоферин великої рогатої худоби можна використовувати для організму людини [7].

Сьогодні більша частина лактоферину виробляється за допомогою трансгенних тварин – найчастіше, корів. Виробництво лактоферину з коров'ячого молока є вкрай трудомістким і дорогим. Використання донорського жіночого молока як джерела лактоферину не в усіх країнах дозволено та характеризується великим ризиком вірусної контамінації. З огляду на викладену вище інформацію, нині існує потреба в пошуку інших способів виробництва лактоферину для зменшення собівартості та збільшення промислових масштабів виробництва. Саме тому перспективною є експресія генів лактоферину в мікроорганізмах, адже це дозволить у майбутньому знизити собівартість цього білка внаслідок менших витрат на його виробництво за рахунок високої швидкості росту продуцента на відносно дешевих поживних середовищах.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Властивості лактоферинів

Нині існує збільшення попиту на лактоферин, через широкий спектр властивостей. Даний білок проявляє антибактеріальну, антивірусну, протигрибкову, протипаразитичну, імуномодуляційну, антиоксидантну та регенеративну функції, отже розглянемо більш детально деякі з цих властивостей.

1.1.1. Антимікробні властивості

Згідно даних з статті [8] лактоферини проявляють антимікробні властивості до наступних мікроорганізмів *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* і *Candida albicans*.

Оскільки лікування антибіотиками за останні десятиліття призвело до збільшення кількості резистентних штамів (стійких до антибіотиків), нині існує інтерес для розробки нових методів терапії. Так в роботі [9] було проведено визначення оцінки протимікробної, протівірусної дії бичачого лактоферину та впливу комбінованого використання лактоферину з левофлораксацином проти резистентних штамів *Helicobacter pylori*. В результаті досліджень було встановлено, що бичачий лактоферин *in vitro* проявляє бактерицидний ефект при 40 мг/мл по відношенню до *H. pylori*. При застосуванні в комбінації з левофлораксацином проти штамів *H. pylori*, стійких до левофлораксацину та інших антибіотиків, бичачий лактоферин відновлює ефективність антибіотика.

В 2016 році вченими [10] було розглянуто метод альтернативного лікування інфекції *Helicobacter pylori* за допомогою використання лактоферину з підвищеними біологічними властивостями (покращення властивостей відбувалось за допомогою адсорбування на біоміметичному

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. Огляд літератури			Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобка О.В.								
Перевір.		Скροцька О.І.							7	111
Консультан								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В.П.								

гідроксиапатиті (LF-НА) та поєднанні з безклітинним супернатантом від *Lactobacillus paracasei*). В результаті проведених тестів (*in vivo*, *in vitro*) було продемонстровано кращу ефективність лактоферину, що доставляється біоміметичними наночастинками гідроксиапатиту в поєднанні з безклітинним супернатантом пробіотика *Lactobacillus paracasei* в порівнянні з лактоферином і пробіотиком окремо або в сукупності.

Зважаючи на досліджену властивість лактоферину, а саме відновлення ефективності дії антибіотика по відношенню до резистентних штамів мікроорганізмів в роботі [11] було розглянуто антибактеріальну активність N-кінця лактоферину людини по відношенню до штамів *Klebsiella pneumoniae*. В ході дослідження було встановлено що N-кінець лактоферину є більш ефективним у знищенні штаму *K. pneumoniae*, чутливого до більшості антимікробних засобів (значення MIC при яких штами інгібувались були в діапазоні від 22 до 88 мкг/мл), ніж штам *K. pneumoniae*, який проявляє стійкість до колістину. Також було встановлено, що даний пептид виявляв синергічний ефект із випробуваними антибіотиками (рифампіцин, кларитроміцин, кліндаміцин, гентаміцин, тигециклін) проти резистентних штамів *K. pneumoniae* (отримані значення MIC були меншими ніж при окремому використанні даних речовин). Отже можна зазначити, що використання N-кінця лактоферину у поєднанні з антибіотиками є перспективним шляхом для лікування інфекцій, спричинених штамми MDR-*K. pneumoniae*.

В 2016 році вчені [12] провели дослідження з метою визначення антимікробної активності іммобілізованого лактоферину та лактоферицину, використовуючи для аналізу штами *Pseudomonas aeruginosa* Paer1 та *Staphylococcus aureus* Saur31. Для цього лактоферин та його похідний іммобілізували на скляних поверхнях за допомогою 4-азидобензойної кислоти (АК) або 4-фтор-3-нітрофенілазиду (ФН). В ході досліду було визначено що іммобілізований на склі лактоферин та лактоферицин значно знижували кількість життєздатних бактеріальних клітин, що прилипли до нього

(Лактоферицин викликав зниження адгезії *P. aeruginosa* Paer1 на 92% для АК і 98% для ФН з вмістом мертвих клітин 56,38 % для АК і 62,43 % для ФН, а для *S. aureus* Saur31 рівень адгезії був зменшений на 74% для АК і 65% для ФН, з вмістом мертвих клітин 18,84 % на АК і 0,43 % на ФН. Лактоферин проявляє знижену антимікробну активність, а зниження адгезії становило 40% для *S. aureus* на АК і 88% на ФН з вмістом мертвих клітин 0,55 % на АК і 0,72% на ФН, а для *P. aeruginosa* адгезія – 61% для АК і 98% для ФН з вмістом мертвих клітин 87,25% на АК і 75,98% на ФН)

Враховуючи згадану раніше інформацію про протигрибкові властивості лактоферину, вчені в роботі [13] провели комплексну оцінку протигрибкового спектру активності лактоферину для 22 видів дріжджів і 24 видів цвілевих грибів та оцінили його взаємодію з шістьма широко використовуваними протигрибковими препаратами. В результаті роботи лактоферин проявляв стабільну активність проти всіх видів дріжджів, які досліджували (МІК, від 8 до 64 мкг/мл), при цьому ступінь активності сильно залежала від насичення залізом (активність зразків *holo*-лактоферину (високий вміст заліза) значно знизилася, в результаті в межах діапазону тестування не було виявлено МІК, а для *apo*-лактоферину (низький вміст заліза) активність була знижена але показники МІК не сильно відрізнялись від контролю). Також було встановлено що лактоферин проявляє синергічний ефект з амфотерицином В (ЛФ-АМВ) проти 19 з 22 досліджених видів дріжджів, і на даний ефект не вплинуло насичення залізом. Та за допомогою скануючої електронної мікроскопії було доведено взаємодію лактоферину з поверхнею грибової клітини, в результаті аналізу було виявлено утворення пор, стоншення гіфів і значний колапс клітин у відповідь на синергію ЛФ-АМВ (важливі механізми вірулентності були порушені внесенням ЛФ-АМВ, що значно запобігало утворенню біоплівки у *C. albicans* і *C. Glabrata* та пригнічувало розвиток гіфів у *C. albicans*, а також зменшувало розмір клітин і капсул у *Cryptococcus*. Отже проаналізувавши отримані дані можна дійти до наступного висновку, лактоферин впливає на дріжджі (тобто проявляє протигрибкову властивість), та комбіноване

використання лактоферину з амфотерицином В (яке проявляє синергічний ефект проти важливих дріжджових патогенів) є перспективним протигрибковим препаратом.

1.1.2. Протипухлинні властивості

На сьогоднішній день немає повідомлень про використання лактоферину в клінічній практиці для лікування раку, але зважаючи на його властивості нині проводять велику кількість дослідів пов'язаних з даною тематикою.

Механізми залучення лактоферину до протипухлинної активності можна згрупувати у позаклітинні ефекти, внутрішньоклітинні ефекти та імуностимулюючі. Позаклітинні ефекти пов'язані в основному з взаємодією лактоферину з клітинною мембраною і мембранними рецепторами, тоді як внутрішньоклітинні ефекти пов'язані переважно з апоптозом клітин і зупинкою клітинного циклу [14, 15], а імуностимулюючі пов'язані з активацією імунних клітин для вивільнення пухлинних цитотоксичних ефекторів [16].

1.1.2.1. Вплив лактоферину на рак молочної залози

Враховуючи велику кількість типів пухлинних захворювань розглянемо дослідження які пов'язані з місцем локалізації лактоферину, а саме властивість лактоферину по відношенню до раку молочної залози.

Взаємозв'язок між експресією гена лактоферину та схильністю до раку молочної залози вперше була запропонована в 1989 році *Furmanski* з співавторами [17], вчені виявили, що активність лактоферин-залежної РНКаз, була на нижчих рівні у молоці, отриманому від спорідненої спільноти з високою захворюваністю на рак молочної залози. Також в 2010 році було проведено дослідження яке показало, що промоторні області P1 і P2 гена лактоферину регулюються або повністю пригнічується в кількох лініях ракових клітин. Ця регуляція набагато більш очевидна для дельта-лактоферину, експресія якого або значно знижена (в клітинах BT-20 і MCF-7), або практично відсутня (у клітинах MDA-MB-231, T-47D і HBL 100) в

пухлинних тканинах, хоча дана експресія регулярно виражається в нормальних тканинах [18].

Зважаючи на даний взаємозв'язок лактоферину і раку молочної залози *Iglesias-Figueroa* [14] з співавторами провели дослідження з виявлення потенційної цитотоксичної активності рекомбінантного людського лактоферину, експресованого в *Pichia pastoris*, на клітинах шести ліній раку молочної залози людини. В ході досліду було встановлено що він є ефективним при використанні на неметастатичних і метастатичних клітинах MDA-MB-231 і показник цитотоксичної концентрації 50% (концентрацію лактоферину при якій помирає 50% клітинної популяції) CC_{50} становив 91,4 і 109,46 мкг/мл, відповідно, також спостерігається сприятливе значення індексу селективної цитотоксичності 11,68 і 13,99, відповідно (даний показник використовують для визначення відношення токсичної концентрації зразка до його ефективної біологічно активної концентрації тобто визначення цитотоксичності щодо незлоякісних клітинних ліній, вважається, що значення $SI \geq 10$ належить вибраному потенційному зразку, який можна додатково дослідити [19]). Також в результаті досліджень було встановлено механізм дії лактоферину, за допомогою аналізу диференціального ядерного фарбування з використанням флуоресцентного інтеркалятора ДНК Hoechst та йодиду пропідію було виявлено що рекомбінантний лактоферин спровокував висипання плазматичної мембрани, конденсацію хроматину та зморщення клітин у клітинах MDA-MB-231, що являється всіма трьома морфологічними змінами, пов'язаними з апоптозом. Також, рекомбінантний лактоферин викликав пов'язані з апоптозом морфологічні зміни, порушення організації цитоскелету F-актину, фрагментацію ДНК та зупинку прогресування клітинного циклу на потрібно негативних клітинах MDA-MB-231 раку молочної залози.

Даний ефект також спостерігається і для лактоферинів інших типів. Так у 2010 році було проведено дослідження з впливу бичачого лактоферину на рак молочної залози [15]. В даній роботі досліджували вплив на клітини раку

молочної залози людини HS578T і T47D. В результаті порівняння оброблювальних лактоферином ліній клітин і контролем було встановлено що при концентрації від 125 мкМ лактоферину знижувалась життєздатність клітин HS578T і T47D на 47 і 54% відповідно і збільшувався апоптоз приблизно в 2 рази для обох клітинних ліній. Швидкість розповсюдження знизилася на 40,3 і 63,9% для HS578T і T47D відповідно. (Незважаючи на те що автори не змогли визначити механізм дії лактоферину, в даній роботі було встановлено що лактоферин впливає на важливі етапи розвитку пухлинних клітин молочної залози)

Отже отримані дані вказують на те, що бичачий та людський лактоферин має високу ефективність у боротьбі з пухлиною проліферація при раку молочної залози.

1.1.2.2. Застосування лактоферину при лейкемії

Подібно до того, як лактоферин було успішно протестовано для лікування раку молочної залози, так і його біологічно активні лактоферин-похідні пептиди були успішно використані для лікування інших типів раку, насамперед лейкемії, про що свідчать літературні джерела [20-25].

Лейкемія – це група раку крові, яка зазвичай починається в кістковому мозку і призводить до великої кількості аномальних клітин крові. Дані утворені клітини крові не повністю розвинені і називаються бластними або лейкозними клітинами. Симптоматика включає кровотечу та синці, біль у кістках, втому, лихоманку та підвищений ризик інфекцій [26]. Ці симптоми виникають через брак нормальних клітин крові, досі не відомо точної причини виникнення лейкемії, вчені вважають що на виникнення впливають генетичні фактори та фактори навколишнього середовища.

В даний час лікування різних типів лейкемії, включаючи гострий мієлоїдний лейкоз та гострий лімфоїдний лейкоз, покращує виживаність, однак довгострокові наслідки можуть проявлятися у вигляді серцево-судинних захворювань, що підвищують ризик смерті. Лактоферин може бути гарною альтернативою нині існуючим методам лікування, яка мінімізує

побічні ефекти у пацієнтів, оскільки він індукує апоптоз при лейкемії, що було підтверджено у 2009 році *Lee*. Він з співавторами провів досліди в яких було показано, що відносно висока концентрація людського лактоферину у поєднанні з природним насиченням залізом була достатньою для індукування апоптозу в Т-клітинах лейкемії, але в даному дослідженні не було з'ясовано точного механізму, що лежить в основі регуляції лактоферин-опосередкованої загибелі клітин.

Так в 2010 році *Lee* з співавторами [22] намагаючись з'ясувати механізм лактоферин-індукованого апоптозу, досліджували регульований Bcl-2 (В-клітинна лімфома 2) апоптотичний шлях у лактоферин-індукованого апоптотичного сигнального шляху. В результаті дослідження було визначено, що лактоферин-активованій апоптотичний апарат використовував білки сімейства Bcl-2 як ефекторні молекули, що призвело до загибелі клітин Т-лімфоцитів лейкемії.

Вивчення впливу лактоферину на лейкемію не обмежувалося лише лактоферином та його похідними, на основі отриманих даних вчені почали розглядати пептиди отримані із лактоферинів.

В роботі 2016, було виділено та розглянуто пептид PRF, який являється пептидним фрагментом із 9 амінокислотних залишків отриманий з лактоферину людини, в результаті досліджень було встановлено, що даний фрагмент має протипухлинну активність. Пептид PFR інгібує проліферацію клітин лейкемії MEL і HL-60, викликаючи загибель клітин за відсутності класичних ознак апоптозу, також даний пептид продемонстрував індукцію зупинки клітинного циклу G0/G1 [23].

Враховуючи гарні результати в раніше згаданій роботі *Arias* з співавторами в 2017 році [21], розглянули інший пептид який отриманий з бичачого лактоферину, а саме лактоферицин В, також під час порівняння розглядали пептиди отримані з бичачого та людського N-кінця лактоферину. В ході дослідів було встановлено що короткі пептиди hLF11 та bLF10 не були цитотоксичними для ракових клітин, на відміну від лактоферицину який надає

потужну цитотоксичну дію на клітини Т-лейкемії Jurkat і CCRF-CEM. Крім того, в статі [24] було представлено, що даний пептид може підвищити експресію каспази-3, сприяючи фрагментації ДНК і, отже, шляху апоптозу в лінії клітин лейкемії HL-60.

Наостанок можна відмітити статі [20, 25] в яких зазначається що у немовлят виключне і тривале споживання грудного молока може запобігти ризику розвитку дитячого лейкемії через різні імунопротекторні агенти, присутні в грудному молоці, такі як лактоферин.

Підсумовуючи вище наведені дослідди, можна зазначити, що використання лактоферину та його похідних є одним із перспективних методів боротьби з лейкемією в якості альтернативи нині існуючим методам з меншою кількістю побічних ефектів, але попередньо необхідно провести більшу кількість досліджень та встановити більш точні переваги та недоліки даного способу лікування лейкемії.

1.1.2.3. Інші відомі взаємодії лактоферину та його похідних на протипухлинні клітини

Розглянувши значну кількість досліджень спрямованих на вплив лактоферину по відношенню до раку молочної залози та лейкемії можна відзначити і роботи які призначені виявленню впливу лактоферину по відношенню до інших типів раку які представлені в малій кількості.

В статі [27] вчені дослідили вплив лактоферину на пухлинні клітини HeLa (рак епітелію людини). В результаті досліджень було встановлено, що бичачий апо-лактоферин (форма лактоферину яка ненасичена залізом) інгібував ріс клітин HeLa, та він індукував апоптоз разом з розщепленням поліполімерази (АДФ-рибоза), активацією каспази⁺. Також можна відмітити помітне підвищення рівня активних форм кисню та значне виснаження GSH, у пухлинних клітин які були оброблені апо-лактоферином.

В 2017 році Li з співавторами провели дослідження спрямовані на визначення впливу лактоферину на пухлини товстої кишки людини HT29 і HCT8 [28]. В ході дослідження дані клітини оброблювали лактоферином і

проводились тести на проліферацію, в результаті даного тесту було встановлено що висока доза лактоферину пригнічує життєдіяльність клітин та було виявлено, що на клітини типу HT29 лактоферин діє краще ніж на НСТ8, але різниця не сильно значна.

Розглянувши декілька статей з виявленням протипухлинних властивостей лактоферину по відношенню до раку шкіри та раку товстої кишки, можна дійти висновку що дослідів спрямованих на дану тематику мало і дійти конкретних висновків неможливо, але можна зазначити що при збільшенні кількості дослідів, та підтвердженні наявних результатів лактоферин може виступати гарним протипухлинним препаратом, через великий спектр протипухлинної дії.

1.2. Біотехнологія рекомбінантних лактоферинів та їх похідних

Нині існує безліч методів для синтезу лактоферину які розглядали науковці в статях (29-54). Умовно їх можна поділити на 3 групи, перша група це методи які пов'язані з використанням рослин для синтезу ЛФ [33-36], друга – використання трансгенно-модифікованих тварин [29-32], третя – використання мікроорганізмів. Враховуючи, що з плином часу використання мікроорганізмів для отримання необхідних сполук стало звичною справою, та в деяких випадках витіснило стандартні методи отримання речовин, перед більш детальним оглядом теми отримання лактоферинів за допомогою мікроорганізмів коротко ознайомимося з більш стандартним методом отримання лактоферину за допомогою тварин та альтернативним до нього отримання ЛФ за допомогою рослин.

Експресія лактоферину в трансгенних тваринах

Беручи до уваги факт що лактоферин виробляється у ссавців, науковці з особливим інтересом ставляться до робіт, присвячених виробництву рекомбінантного лактоферину людини у клітинах молочної залози так званих тварин-біореакторів. Принцип створення сільськогосподарських молочних тварин як біореакторів заснована на введенні в геном тварин генетичних конструкцій, що містять послідовності генів людини, які кодують біологічно

активні білки, та керованих регуляторними елементами одного з генів молока великої рогатої худоби. Фрагмент ДНК людини вводять у яйцеклітину до злиття чоловічих та жіночих ядер. Після злиття ядер клітину поміщають в інкубатор. Після початку поділу запліднену яйцеклітину пересаджують в інший організм – наприклад козу або корову, яка виступає живим інкубатор де плід зростає. В результаті даних маніпуляцій трансгенні тварини здатні синтезувати на високому рівні білок людини в молочній залозі і секретувати його в молоко, яке в свою чергу, стає джерелом виділення білка людини [29-32].

Експресія лактоферину в рослинах

У літературі відомі спроби синтезу лактоферину з використанням рослин [33-36]. Експресія рекомбінантного лактоферину в рослинах почалася ще з 1998 року, використання рослин має ряд переваг перед іншими системами найважливішими серед них є:

- низькі витрати виробництва;
- відсутність патогенів людини або тварин, онкогенних послідовностей ДНК, і ендотоксин.

Отримання таких рослин засноване на природній здатності ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* переносити частину власної ДНК у вигляді Т-області плазміди у рослинні клітини. Спосіб отримання цільового білка включає наступні стадії: 1) побудови вектора, що містить промотор і ген лактоферину, 2) введення вектора в *Agrobacterium*, 3) зараження рослин клітинами *Agrobacterium* 4) виробництво білка-лактоферину з використанням трансформованих клітин рослин.

1.2.1. Експресія лактоферинів в мікроорганізмах

Вперше шляхи експресії рекомбінантного лактоферина в мікроорганізмах почали досліджувати в 1992 році, на міцеліальних грибах *Aspergillus oryzae*, в результаті отриманих даних даний метод використовують і в сьогоденні деякі компанії [2].

Зважаючи на швидкий розвиток технологій генної інженерії та проведення більшої кількості експериментів з даної тематики, за останнє десятиліття в статтях [37-45] наведено більш перспективні методи.

Враховуючи необхідність модифікації мікроорганізмів для можливості експресії рекомбінантних лактоферинів, перспективним є використання в якості продуцента штам *Escherichia coli*, через добре вивчену гентику даного мікроорганізму, доступність векторних еспресійних систем і штамів господарів. Так, в статті [37] вчені розглянули метод експресії лактоферину мишей Куньмін (*KmLF*) та його N-кінця (*KmLFN*) в *Escherichia coli* (згідно з даними з GenBank передбачується що молекула лактоферину містить два кінці C і N, і N-кінець містить активні домени з бактерицидною дією та функцією зв'язування гепарину, тобто умовно можна зазначити що дана сполука відповідає за властивості лактоферину). В ході дослідження було розроблено генно-модифіковані штами *Escherichia coli* pET28-*KmLF* та *Escherichia coli* pET28-*KmLFN*, які в подальшому культивували на дріжджовому екстракті та триптоні з вмістом канаміцину (50 мг/л). При досягненні значенні $OD_{600} = 0,6$, процес культивування індукували внесенням 1 мМ ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду і продовжували культивування ще 4 години, в підсумку було успішно доведено можливість експресії лактоферину мишей Куньмін в *E. coli* BL21(DE3) з найкращими показниками експресії білка та його N-кінця які становили 17 мг/л та 20 мг/л відповідно.

Зважаючи на гарні результати які наведені в статі [37] у 2016 році *Novoselova* з співавторами [38] провели дослідження з експресії гену людського лактоферину. Для експресії використовували штам *E. coli* BL21(DE3), та провели оптимізацію процесу культивування (а саме розглянули вплив температури та вплив часу після індукування процесу на показники концентрації лактоферину). Максимальний вихід лактоферину було досягнуто при культивуванні рекомбінантного штаму *E. coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf* на середовищі Лурія-Бертані з додатковим внесенням в якості джерела вуглецю 30 мл 50% розчину глюкози, впродовж

24 год при 23 °C та з внесенням 1,1 мМ ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду (в якості індуктора) та через 8 годин після внесення індуктора отримують лактоферин з концентрацією 2,9 мг/мл (внесення індуктору відбувається через 24 години культивування). При підвищенні температури культивування до 37 °C лактоферин продукується у вигляді тілець включень, що є небажаним і також зниження температури до 15 °C не призводить до збільшення концентрації лактоферину та встановлено що оптимальним показником періоду після індукції є 8 год, при подальшому збільшені часу показники концентрації не збільшуються.

Також у 2019 році *Kumari* з співавторами [39] провели експресію N-кінців рекомбінантного бичачого лактоферину в *Escherichia coli*. Вчені використовували новий рекомбінантний штам *E. coli* SG13009/rpQE-30-NLf. При використанні умов культивування як і в статті [37] та поживного середовища яке використовували в роботі [38] без додаткового внесення глюкози, концентрація N-кінців бичачого лактоферину значно більша (приблизно в 50 разів) ніж у першій роботі і становить 1 г/л.

Розглянувши вдалу експресію різних лактоферинів в *Escherichia coli*, вчені проводили роботи з експресії рекомбінантних лактоферинів в інших бактеріальних мікроорганізмах. У статті [40] науковці розглянули експресію N-кінців рекомбінантного бичачого лактоферину в *Bacillus subtilis*. В даній роботі визначали оптимальний промотор для вдалої експресії лактоферину, було розроблено 5 генно-модифікованих штамів на основі *Bacillus subtilis* 168, та було встановлено що найкращі показники експресії мРНК і N-кінця проявляє промотор P_{veg} який збільшує показники експресії мРНК і N-кінця лактоферину на 240,2% і 80,3%, відповідно, у інших промоторів показники набагато менші. В подальшому в даній роботі вчені проводили оптимізацію кодонів N-кінця бичачого лактоферину (*bLF-N*), даний процес відбувався для кращого синтезу білку за допомогою вилучення рідкісних кодонів для *B. subtilis* і заміною їх на більш звичні для даного мікроорганізму, після синтезу гену було сконструйовано *B. subtilis/pMA0911-Pveg-mBLF-N*, який при

вироснуванні на середовищі Луріа-Бертані з додатковим внесенням канаміцину (50 мг/л) при 37 °C впродовж 3 год та наступною індукцією при 28 °C впродовж 15 год, синтезує лактоферин з концентрацією 16,5 мг/л.

Враховуючи сферу застосування лактоферину (добавка для дитячого харчування, фармацевтичні продукти та інші.) та дослідження, які демонструють, що комбіноване використання ЛФ з пробіотичними препаратами може запобігати сепсису, *Shigemori* з співавторами в 2017 році [41] провели дослідження з метою експресії лактоферину в *Lactococcus lactis*.

Враховуючи мету експерименту вчені не досліджували кількісний вихід білку і не намагались оптимізувати умови для отримання найкращих показників синтезу лактоферину, але в підсумку під час культивування *Lactococcus lactis* NZ9000 з модифікованою системою експресії генів GFP (системи злиття зеленого флуоресцентного білка, яка дозволяє визначити експресію цільового білка) при 30 °C на середовищі з гідролізатом казеїну, екстрактом яловичини та додатковим внесенням розчину глюкози та подальшою індукцією процесу було встановлено що найкращі показники відносної одиниці флуоресценції спостерігають через 2-3 години після внесення нізину (який виступає в якості індуктору процесу).

Окрім бактерій експресію рекомбінантних лактоферинів проводять і в дріжджах, використання дріжджів для виробництва рекомбінантних білків, а особливо *Pichia pastoris* обумовлено швидким ростом, легкістю генетичних маніпуляцій та здатністю до пост-трансляційної модифікації. Так, у 2015 році в Китаї *Jianbo* з співавторами [42] провели дослідження з експресії лактоферину з молочної залози Тибетської вівці за допомогою еукаріотичного організму-господаря *Pichia pastoris* GS115. В ході роботи вченими було розроблено генно-модифікований штам *P. pastoris*/pPICZaA-LF, який вирощували на поживному середовищі з дріжджовим екстрактом та гліцеролом при 28 °C до досягнення OD₆₀₀ = 2-6, в подальшому клітини ресуспендували до отримання OD₆₀₀ = 1 і проводили культивування на поживному середовищі з дріжджовим екстрактом і метанолом при 28 °C

впродовж 168 год з додатковим внесенням метанолу кожні 24 год (для індукції процесу), найвищі показники синтезу *rLF* проявляються після 120 год культивування і становлять 60 мг/л.

Зважаючи на успішні дослідження з експресії лактоферину в *P. Pastoris* та враховуючи що гомологія бичачого ЛФ та ЛФ Тибетських овець складає 88% в 2016 році *Blanca* з співавт. [43] провели експресію рекомбінантного бичачого лактоферину (*rbLF*) в метилотрофних дріжджах. Для цього використовували ген синтетичного бичачого лактоферину (*sbLF*), який трансформували в *Pichia pastoris* KM71-Н і було отримано модифікований штам *Pichia pastoris* KM71-Н/pJ902*sbLf*. Культивування відбувалось на середовищі як і в минулому дослідження [42], при 30 °С з індукцією процесу за допомогою внесення метанолу кожні 24 год впродовж 72 год (загальний час культивування становить 96 год) в ході культивування було отримано максимальна концентрація 3,5 г/л рекомбінантного бичачого лактоферину.

З огляду на минулі результати наукових праць вчені в 2019 році [44] провели дослід з експресії рекомбінантного бичачого лактоферину в *Pichia pastoris* з метою покращення показників експресії білка. В даній праці було розроблено 7 генно-модифікованих штамів із яких найкращі показники титру рекомбінантного лактоферину (35,6 мг/л) проявляє штам *Pichia pastoris* PJF07 при культивування на середовищі з гліцерином при 30 °С з додаванням метанолу впродовж 84 год.

Для експресії лактоферинів серед дріжджів використовували не лише *Pichia pastoris*. В 2015 році в статті [45] розглянуто метод експресії рекомбінантного людського лактоферину в дріжджах *Saccharomyces cerevisiae*. На основі *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 було розроблено генно-модифікований штам *Saccharomyces cerevisiae* BY4741/pTEF-MF, який в результаті вирощування клітин на дріжджовому екстракті при 30 °С без індукування процесу виробляв 18,6 мг рекомбінантного білка.

Синтез лактоферину мікроорганізмами

Продукт	Тип лактоферину (ЛФ)	Концентрація лактоферину	Джерело
Бактерії			
<i>Escherichia coli</i> pET28-KmLF <i>Escherichia coli</i> pET28-KmLFN	Лактоферин мишей Куньмін N-кінець лактоферину мишей Куньмін	17 мг/л 20 мг/л	[37]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/mpET28a+-lrf	Людський лактоферин	2,9 мг/мл	[38]
<i>Escherichia coli</i> SG13009/rpQE-30-NLf	N-кінець бичачого лактоферину	1 г/л	[39]
<i>Bacillus subtilis</i> /pMA0911- Pveg-mBLF-N	N-кінець бичачого лактоферину	16,5 мг/л	[40]
<i>Lactococcus lactis</i> NZ9000	Лактоферин бичачий	-	[41]
Дріжджі			
<i>Pichia pastoris</i> /pPICZaA-LF	Лактоферин Тибетської вівці	60 мг/л	[42]
<i>Pichia pastoris</i> KM71- H/pJ902sbLf	Бичачий лактоферин	3,5 г/л	[43]
<i>Pichia pastoris</i> PJF07	Бичачий лактоферин	35,6 мг/л	[44]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741/pTEF-MF	Людський лактоферин	18,6 мг/л	[45]

1.2.2. Похідні лактоферинів

Як згадувалось раніше лактоферин в своїй молекулі містить N-кінець який забезпечує його властивості, в результаті протеолізу пепсином в кислих умовах з N-кінця лактоферину утворюється лактоферицин, даний пептид охоплює велику частину функціонального домену білка, і в багатьох випадках він не тільки зберігає активність лактоферину, але і є більш активним. Лактоферицин володіє сильною протимікробною та слабкою противірусною активністю, а також має потужні протипухлинні та імунологічні властивості. Також в N-кінці лактоферину було виділено другий антимікробний пептид який отримав назву лактоферампін, який розташований в N-кінці лактоферину в безпосередній близькості до лактоферицину, отриманий пептид проявляє кандидацидну активність, яка значно вища, ніж активність лактоферину.

1.2.2.1. Лактоферицин

Унаслідок подібності за властивостями лактоферицину до лактоферину виник інтерес до проведення досліджень з експресії даного пептиду в

мікроорганізмах. Так в статті [8] використовували сконструйований штам *P. pastoris* KM71/pHIL- α -LfcinC який культивували при 30 °C впродовж 96 годин з індукцією за допомогою внесення метанолу кожні 24 годин на середовищі як в статті [45]. Показники концентрації в даній роботі не наведені, але було встановлено що даний пептид проявляє антимікробну активність щодо *Escherichia coli* PTCC 1330, *Staphylococcus aureus* PTCC 1112, *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1074, *Bacillus subtilis* PTCC 1023 і *Candida albicans* PTCC 5027.

У 2018 році вчені [46] провели дослідження з експресії рекомбінантного бичачого лактоферицину в *Lactobacillus casei*. В ході дослідження було сконструйовано генно-модифікований штам *AthyA L.casei*-LFEC на основі *Lactobacillus casei* ATCC 393. Подальше культивування отриманого штаму на середовищі з лактозою та глюкозою впродовж 12 год при 37 °C, призвело до отримання лактоферицину з концентрацією 23,37 мкг/мл.

В роботі [47] досліджували експресію лактоферицину в *E. coli*, але отримані результати були далекі від бажаних, отриманий пептид проявляв гірші антимікробні показники і він виявився не лактоферицином а його незначною модифікацією, в подальшому вчені провели експресію даного модифікованого лактоферицину (LfcinB-W10) і оптимізацію процесу. Було створено генно-модифікований штам *E. coli* BL21(DE3)/pGEX-EN-LCM, який вирощували на середовищі Лурєа-Бертані при 37 °C до досягнення значення $OD_{600} = 0,6$, наступною індукцією впродовж 4 год внесенням ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду при 30 °C та ресуспендуванням в буферному розчині, в результаті культивування концентрація LfcinB-W10 становила 300 мг/л.

Враховуючи можливість створення похідних лактоферицину які не поступаються йому в своїх властивостях, в роботі [48] автори експресували гібридний пептид LFT33, який був похідним лактоферицину та танатину в *Escherichia coli*. В ході роботи генно-модифікований штам *E. coli* BL21(DE3)/pET-LFT вирощували на середовищі Лурєа-Бертані з ампіциліном (100 мкг/мл) при 37 °C до досягнення $OD_{600} = 0,6$, в подальшому відбувалась

індукція процесу впродовж 4 год внесенням 0,2 мМ ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду при 30 °С, концентрація гібридного пептиду після індукування становила 0,5 мг/л.

1.2.2.2. Химерний пептид (лактоферицин-лактоферампін)

Враховуючи місце локалізації лактоферицину та лактоферампіну (обидва пептиди знаходяться в N-кінці лактоферицину) та їх властивості, вчені почали проводити дослідження по комбінуванню даних пептидів, з метою розширення їх антимікробних властивостей.

У статі [49] генно-модифікований штам *P. pastoris* XS10 культивували при 28 °С на середовищі з дріжджовим екстрактом та індукуванням процесу впродовж 72 год внесенням 0,5% метанолу. В результаті культивування було встановлено що даний штам синтезує 30 мг/л лактоферицин-лактоферампіну.

В подальшому дослідженні [50] відбулась оптимізація умов виробництва лактоферампін-лактоферицину отриманого за допомогою *P. pastoris* XS10. Культивування відбувалось на середовищі з гліцерином при 30 °С, коли гліцерин повністю використовується починається індукція за допомогою внесення метанолу впродовж 88 год. Після оптимізації умов культивування вихід лактоферампіну-лактоферицину становив 82 мг/л.

В 2020 році Xie з співавторами [51] використали лактобактерій для експресії лактоферицин-лактоферампіну. В роботі науковці сконструювали генно-модифікований штам *Lactobacillus reuteri* CO21 (LR-LFCA) який проявляє набагато нижчі показники синтезу пептиду в порівнянні з попередніми згаданими роботами (100 мкг/л) вирощування відбувалось на середовищі з пептоном та глюкозою при 37 °С впродовж 18 год.

В порівнянні з попередньою роботою доволі схожі результати по концентрації лактоферицин-лактоферампіну вчені отримали в статті [52], в якій вирощували генно-модифікований штам *Lactococcus lactis* AMJ1543 (LL-LFCA), на середовищі з глюкозою та лактозою при 37 °С впродовж 16 год.

Також у статті [53] сконструйований генно-модифікований штам *Lactococcus lactis* (pAMJ399-LFCA/LLMG1363) вирощували при 30 °С

впродовж 16 год на середовищі з лактозою та додатково внесеною глюкозою. В результаті культивування було виявлено флуоресценцію у даного штаму, що свідчить про вдалу експресію пептиду (тобто в подальшому можна використовувати даний мікроорганізм для експресії похідних лактоферинів), але в даній роботі точне визначення концентрації не відбувалось.

У 2018 році вчені [54] провели експресію пептиду в генно-модифікованому штамі *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/ pET22b+ LFcIn+LFampIn+His-tag. Після культивування на середовищі Лурєа-Бертані з ампіциліном при 37 °С до накопичення постійного рівня біомаси і наступною індукцією процесу внесенням 1 мМ ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду та інкубуванням впродовж 6 год після внесення індуктора концентрація пептиду становила 0,42 г/л.

Таблиця 1.2

Синтез похідних лактоферину мікроорганізмами

Продуцент	Похідний лактоферину (ЛФ)	Концентрація похідного	Джерело
<i>Pichia pastoris</i> KM71/pHIL- α -LFcInC	Лактоферицин	- (встановлено можливість експресії)	[8]
<i>AthyA Lactobacillus casei</i> -LFEC	Лактоферицин	23,37 мкг/мл	[46]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pGEX-EN-LCM	LFcInB-W10, (похідний лактоферицину)	300 мг/л	[47]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/pET-LFT	LFT33, (гібридний лактоферицин)	0,5 мг/л	[48]
<i>P. pastoris</i> XS10	Лактоферицин-лактоферампін	30 мг/л	[49]
<i>P. pastoris</i> XS10	Лактоферицин-лактоферампін	82 мг/л	[50]
<i>Lactobacillus reuteri</i> CO21 (LR-LFCA)	Лактоферицин-лактоферампін	100 мкг/л	[51]
<i>Lactococcus lactis</i> AMJ1543 (LL-LFCA)	Лактоферицин-лактоферампін	$\approx$ 100 мкг/л	[52]
<i>Lactococcus lactis</i> (pAMJ399-LFCA/LLMG1363)	Лактоферицин-лактоферампін	- (встановлено можливість експресії)	[53]
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS/ pET22b+ LFcIn+LFampIn+His-tag	Лактоферицин-лактоферампін	0,42 г/л	[54]

Враховуючи вище наведені данні можна зазначити, що в порівнянні з експресією лактоферину технологія експресії його похідних є не надто розвиненою, і на даний момент перспективним є використання лактоферину, але якщо в подальшому вчені будуть збільшувати кількість дослідів та проводити оптимізацію експресії його похідних в мікроорганізмах, через свої властивості вони зможуть витіснити лактоферин (в деяких випадках інгібуюча концентрація похідних лактоферину значно менша ніж у лактоферину).

РОЗДІЛ 2

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

2.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання, потреби у ЛЗ

Лактоферин – це глобулярний глікопротеїн з високою спорідненістю до іонів металів, таких як іони міді, цинку та марганцю, але особливо до іонів заліза [3, 55]. Лактоферин був вперше ідентифікований як залізовв'язуючий білок у 1939 році, але лише з 1960 року, коли його було виділено з коров'ячого молока та очищено, поступово відбувалося встановлення його властивостей і функцій [56]. Згідно встановлених властивостей він відіграє важливу роль у регуляції адсорбції заліза та модуляції імунних відповідей, а також має антимікробну, протівірусну, антиоксидантну, протипухлинну та протизапальну дію [57].

Ранні дослідження були зосереджені на його здатності зв'язувати залізо, яка бере участь у транспортуванні та його метаболізмі. Однак, оскільки були виявлені його антимікробні властивості, новіші дослідження продемонстрували, що він може обмежувати патофізіологічні явища, пов'язані з окислювальним стресом, запаленням та канцерогенезом [58]. На сьогоднішній день лактоферин проявляє великий спектр властивостей в наслідок чого він може використовуватись в різних сферах застосування з різною метою, розглянемо декілька прикладів.

Згідно літературних джерел [59] лактоферин може використовуватися в якості допоміжної терапії при кишкових захворюваннях, прийом лактоферину може мати позитивний вплив на лікування захворювання шлунково-кишкового тракту, відновлюючи кишкову флору та запобігаючи діарейі.

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. Техніко- економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобка О.В.						
Перевір.		Скороцька О.І.					26	111
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Деякі клінічні дослідження довели, що лактоферин послаблює блювоту та діарею та зменшує колонізацію лямблій у дітей, інфікованих ротавірусом [60, 61].

Також в статті [62] було встановлено що лактоферин відновлює гуморальну імунну відповідь у мишей з ослабленим імунітетом. Враховуючи дані імуномодуючі функції, лактоферин може використовуватися як допоміжна терапія у пацієнтів із імунодефіцитом для відновлення Т- і В-клітин [63].

Ще одну цікаву властивість лактоферину було описано в статті [64]. Оскільки лактоферин зменшує продукцію прозапальних факторів і пригнічує передчасне дозрівання шийки матки, його можна використовувати в якості профілактики для запобігання народженню недоношених дітей.

В статті [65] вченими відзначається, що діти, які перебуває на виключно грудному вигодовуванні, не мають дефіциту заліза протягом перших 6 місяців життя, це може бути пов'язано з наявністю лактоферина в грудному молоці. Перевіряючи дану теорію, тобто приймання грудного молока в якому міститься незначна кількість лактоферину призводить до зменшення дефіциту заліза у дітей, в статті [66] було доведено, що при вживанні їжі збагаченої лактоферином, отриманого з молока великої рогатої худоби, пов'язане з підвищенням загального вмісту заліза в організмі та більш ефективним адсорбуванням заліза в кишечнику у немовлят, які знаходяться на виключно грудному вигодовуванні. Також слід зауважити, враховуючи антимікробні властивості лактоферину, його ненасичена залізом форма в молоці завжди витягує залізо з бактерій, що в результаті пригнічує їх ріст і зменшує ймовірність виникнення діареї у немовлят. Через вище наведену інформацію в ряді країн лактоферин почали додавати до дитячих сумішей, наприклад, у Китаї кількість доданого лактоферину коливається від 300-1000 мг/кг, в свою чергу ФАО та ВООЗ рекомендують 500 мг/ кг, як рівень добавки в порошкоподібні дитячі суміші.

Розглянувши літературні джерела в яких наводяться можливі приклади використання лактоферину, можна дійти висновку що в найближчому майбутньому він буде використовуватись в даних цілях, але враховуючи складність його виробництва, очищення, наявність малої кількості підприємств які його виробляють (призводить до більшої вартості продукту), враховуючи метод виробництва (найчастіше для отримання лактоферину використовують генно-модифікованих тварин) та враховуючи малу кількість досліджень і настороженість людей до нових методів лікування, на сьогодні використання лактоферину в даних цілях не має постійного застосування та залишається на рівні досліджень. Тому розглянемо його основну функцію, яка почала вивчатись ще з 1939 року, а саме здатність зв'язувати залізо.

Завдяки схожості з трансферином, який є основною транспортною молекулою заліза в сироватці крові [67], лактоферин володіє здатністю зв'язувати залізо [68], і він може хелатувати два атоми тривалентного заліза (Fe^{3+}) [69]. Лактоферин зв'язує один атом тривалентного заліза в кожній із двох його часток; однак важливою відмінністю є те, що він не виділяє залізо навіть при рН 3,5. Це важливо, оскільки ця властивість перешкоджає використанню заліза в інфікованих тканинах, де рН зазвичай кислий [70].

Лактоферин може зв'язуватись з церулоплазміном, в результаті чого можливе пряме перенесення тривалентного заліза між цими білками (церулоплазмін проявляє мідь-залежну оксидазну активність, яка пов'язана з можливим окисненням Fe^{2+} в Fe^{3+} тому сприяє його транспорту в плазмі разом з трансферином, який може переносити тільки Fe^{3+}). Пряме перенесення тривалентного заліза з церулоплазміну на лактоферин запобігає утворенню потенційно токсичних гідроксильних радикалів [71] і використанню заліза патогенними бактеріями.

Враховуючи властивості лактоферину пов'язані з перенесенням заліза та природнє місце його розташування, вчені провели дослідження з використання лактоферину для лікування від залізодефіцитної анемії [72-74].

Залізодефіцитна анемія (ЗДА) є найпоширенішою хворобою, пов'язаною з вмістом заліза в організмі в усьому світі. ЗДА найчастіше виникає в результаті підвищеної потреби організму в залізі під час вагітності; в результаті виникнення даного захворювання у вагітних наявний великий ризик передчасних пологів, затримки розвитку плода, низької ваги при народженні та погіршення стану здоров'я новонароджених. Вважається, що ці ускладнення вагітності виникають в наслідок підвищеної потреби заліза в організмі, пов'язаної зі збільшенням об'єму крові та розвитком фетоплацентарного комплексу. Для лікування ЗДА регулярно призначаються залізовмісні препарати, найчастіше лікування складається з перорального прийому заліза у вигляді сульфату заліза, який часто не справляє значного впливу на зниження рівня циркулюючого заліза, а також може викликати побічні ефекти [75]

Як зазначалось раніше вчені провели рандомізовані контрольовані дослідження в Італії [72] та Єгипті [73], метою даних досліджень було встановлення можливості використання лактоферину для лікування ЗДА і використання його як альтернативи нині використовуваному сульфату феруму, в результаті даних досліджень було встановлено що використання лактоферину є набагато кращим варіантом, через зменшення кількості побічних ефектів, та значно кращий ефект (показники заліза та феритину в сироватці крові були значно більшими при використанні лактоферину).

Також в роботі [74] оцінювали безпечність та ефективність лактоферину в порівнянні з сульфатом феруму, групи жінок відбирались та поділялись, як і в раніше згаданих джерелах (дві групи одна приймала лактоферин, а друга сульфат феруму), в результаті було встановлено, що гематологічні показники (еритроцити, гемоглобін, загальне сироваткове залізо, сироватковий феритин) були значно вищими у групи яка приймала лактоферин, також у даної групи не було виявлено побічних ефектів в той же час у 16,5 % жінок які приймали сульфат феруму виявлені побічні ефекти. Та відзначається що у групи яка

споживала лактоферин не було викиднів на відміну від 5 викиднів які було зафіксовано у групи з сульфатом феруму.

Підсумовуючи все вище наведене, можна зробити висновок, що за своїми властивостями лактоферин є унікальною речовиною, яка має великий спектр сфер застосування і потребує все більшого вивчення, і враховуючи що вже існує велика кількість досліджень з використання його в якості заміни нині існуючому методу лікування залізодефіцитної анемії, біосинтез лактоферину є перспективним напрямком для промислового виробництва.

2.2 Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

2.2.1 Обґрунтування форми випуску ЛЗ

Після отримання порошкоподібного лактоферину в результаті стадій виділення та очищення цільового продукту, необхідно визначити оптимальну форму лікарського засобу. Обрання форми лікарського засобу в основному відбувається для надання лікарському засобу зручної форми використання та для досягнення необхідного лікувального ефекту.

Лікарські форми мають декілька класифікацій, а саме вони поділяються за кількісними та якісними характеристиками, розглянемо їх більш детально. За кількісною класифікацією вони поділяються на дозовані та недозовані:

- Дозовані: (капсули, таблетки);
- Недозовані: (гель, мазь, сироп, екстракт, еліксир, емульсія, лікарський олівець, відвар).

В якісній класифікації вони поділяють за агрегатним станом:

- Тверді: (таблетки, порошок, капсули, драже, гранули, карамель, лікарський олівець);
- М'які: (мазі, креми, паста, гелі, ТТС, супозиторії);
- Рідкі: (розчини, настоянки, суспензії, емульсії, краплі, сиропи);
- Газоподібні: (аерозолі).

Наш цільовий продукт націлений на використання вагітними жінками для лікування залізодефіцитної анемії, та враховуючи що надлишок заліза

також небажаний нам необхідно використовувати дозовані форми лікарського засобу, а саме капсули або таблетки [72].

Для визначення оптимальної лікарської форми яку ми будемо використовувати необхідно більш детально розглянути процеси їх отримання та визначити переваги та недоліки для нашого препарату [76].

Технологічний процес отримання таблеток може відбуватись методом прямого пресування, або за допомогою грануляції (сухої, вологої), етапи виробництва таблеток за допомогою даних технологій наведено на рис.2.1 та рис.2.2.



Рис.2.1. Етапи виробництва таблеток методом прямого пресування

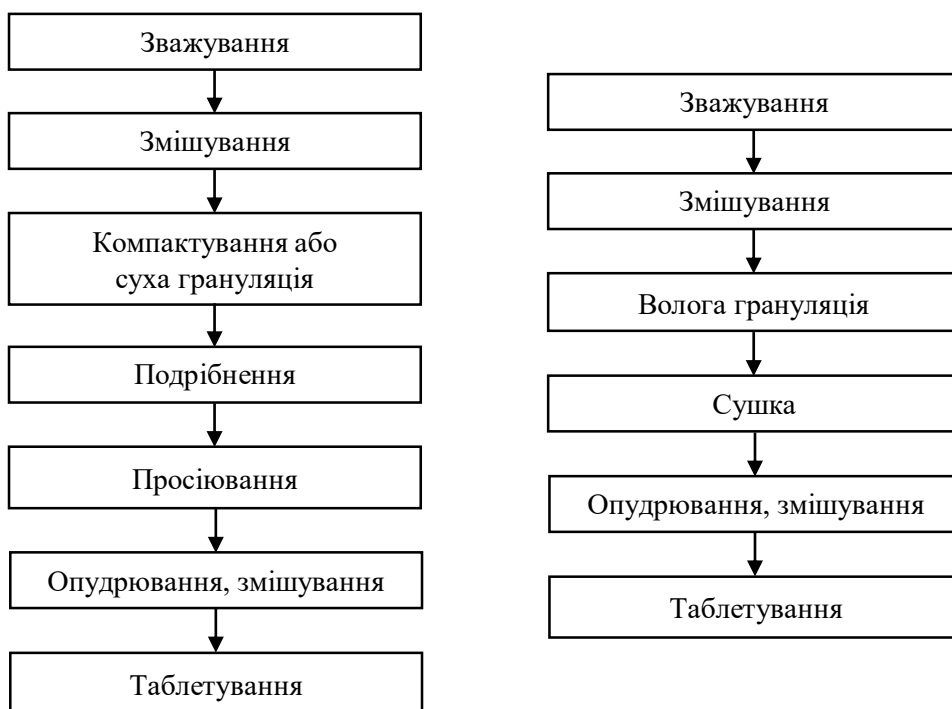


Рис.2.2. Етапи виробництва таблеток за допомогою сухої грануляції та вологої грануляції

Перевагою виробництва таблеток використовуючи пряме пресування є скорочення часу технологічного процесу, зменшення кількості допоміжних речовин, які вводяться до складу таблетки, зменшення трудовитрат,

енергоресурсів, обладнання, виробничої площі та головне це зменшення собівартості таблеток [77]. Не зважаючи на переваги даного методу, нині дуже мала кількість таблеток виробляється цим методом, це пояснюється тим що більшість лікарських речовин не мають необхідних властивостей для успішного формування таблетки. Для використання прямого пресування речовина повинна мати наступні властивості: ізодіаметричну форму кристалів, добру сипкість (плинність) і спресовуваність та низьку адгезійну здатність до прес-інструмента таблеткової машини. Тому в нашому випадку дана технологія не підходить для нашого препарату.

Враховуючи що для кращого формування та запобігання розшарування таблеток необхідно з порошкоподібного матеріалу який складається з різних фракцій та нерівномірної поверхні частинок отримати частинки однакового розміру, необхідно застосувати процес грануляції. Нині грануляція поділяється на суху, вологу, змішану та структурну. Найчастіше використовують суху та вологу тому в подальшому для порівняння розглянемо дані типи грануляції.

При вологій грануляції в масу додають зв'язувальні розчини, що поліпшують зчеплення між частинками. Для того, щоб порошок гранулювався, він повинен бути зволожений до певної міри. Оптимальна кількість зволожувача визначається експериментально. Процес вологої грануляції здійснюють у спеціальних апаратах – грануляторах, принцип роботи яких полягає в продавлюванні змішаної і зволоженої маси через перфоровані пластини або металеві сітки.

Враховуючи що волога грануляція є найбільш використовуваним типом грануляції вона має ряд недоліків:

- тривала дія вологи на лікарські і допоміжні речовини; погіршення здатності до розпадання (швидкості розчинення) таблеток;
- тривалість і трудомісткість процесу;
- необхідність використання спеціального устаткування;
- енергоємність процесу.

Суша грануляція відбувається в тому випадку коли волога грануляція впливає на стабільність та фізико-хімічні характеристики лікарських речовин, а також коли лікарська і допоміжні речовини після проведення процесу вологої грануляції погано стискаються. Суть сухої грануляції полягає в перемішуванні діючих та допоміжних речовин з первинним ущільненням (брикетування або компактування) та подальшим перетворенням на гранули або порошок.

В нашому випадку діюча речовина виступає термолабільною речовиною тому використання вологої грануляції недопустиме так як при сушінні речовина втратить свою активність. Провівши порівнявши найбільш застосовуваних методів виробництва таблеток можна дійти висновку, що в нашому випадку оптимальним варіантом буде використання сухої грануляції для формування однорідних часток з метою отримання готової таблетки яка буде тримати товарну форму до моменту її використання. Для більш точного визначення кінцевої форми лікарського засобу розглянемо що одну лікарську форму, а саме капсули.

Капсули це тверді лікарські засоби які складаються з твердої або м'якої оболонки та мають різну форму.

М'які капсули мають більш товсту оболонку ніж тверді, сферичної форми, складаються з однієї частини та зазвичай в них інкапсулюють в'язкі рідини, олійні розчини, пастоподібні речовини, які не вступають у взаємодію з желатином. В нашому випадку даний тип капсул можна одразу відкинути так як в нас порошкоподібна речовина і її можна засипати в тверді капсули.

Тверді капсули мають оболонку яка складається з двох частин циліндричної форми один кінець якої із закругленням і закритий, а другий – відкритий [78].

На сьогодні капсули займають велику частинку фармацевтичного ринку і це не просто так, вони мають великий ряд переваг всі переваги недоцільно розглядати, тому розглянемо тільки ті які виступають в нашому випадку в якості альтернативи таблеткам тобто наступні фактори:

- стабільність (оболонка з желатину непроникна для летких рідин, газів, кисню повітря
- естетичність (завдяки застосуванню різних барвників, що є важливим психологічним чинником);
- можливість капсулювати препарати в незмінному вигляді з метою виключення вологої грануляції, теплової дії, тиску, як у випадку виробництва таблеток.

Технологічний процес виробництва капсул наведено на рис.2.3.



Рис.2.3. Етапи виробництва капсул

Розглянувши лікарські форми дозованого типу можна дійти висновку що найкращим варіантом в нашому випадку є використання капсул, так як буде відбуватись інкапсулювання порошкоподібного лактоферину без попередньої обробки, що в свою чергу призводить до зменшення етапів виготовлення таблеток і зменшення собівартості продукції.

Визначившись з лікарською формою необхідно визначити в який спосіб ми будемо виготовляти самі капсули та яким методом ми будемо їх обробляти.

Виготовлення твердих капсул відбувається методом занурення, суть якого полягає у виготовленні оболонок капсул за допомогою спеціальних рам зі штифтами (оливами), що нагадують форму капсул. Для виготовлення капсул необхідно попередньо приготувати желатин, закупити обладнання для отримання форми подальшого сушіння та підрізання що б вони мали однаковий розмір, враховуючи що в нашому випадку нам необхідна невелика кількість капсул економічно доцільніше буде закупити готові порожні капсули, перевагою закупівлі капсул в порівнянні з власним приготуванням

буде зменшення виробничого простору, зменшення витрат на закупівлю обладнання, зменшення енерговитрат та зменшення часу виробництва.

Останнім етапом приготування лікарської форми є оброблення її з метою доставлення лікарського засобу до місця призначення, так як і капсули і таблетки оброблюються раніше даний етап не розглядався. Ми використовуємо лактоферин для лікування залізодифіцитної анемії тобто умовно для внесення в організм заліза з подальшим його засвоєнням, засвоєння організмом заліза відбувається ентероцитами тонкої кишки, також нам відомо що лактоферин вивільняє залізо при рН нижче 3 [79], а враховуючи що рівень рН в шлунку знаходиться на рівні 1,5 – 2 нам необхідно доставити лактоферин в капсулі до кишечника, це можна зробити за допомогою кишковорозчинних капсул.

Отримання кишковорозчинних капсул може здійснюватися декількома способами [80]:

1. введення так званих затверджувачів до складу маси для отримання оболонки капсул (можуть застосовуватися деякі альдегіди, альгінат натрію, інші речовини);
2. обробка оболонок готових і заповнених капсул певними речовинами для надання їй більшої твердості (наприклад формальдегідом) з метою продовження часу розпадання капсули, щоб вона встигла потрапити в тонкий кишковик неушкодженою;
3. нанесення плівкових покриттів на готову і заповнену капсулу. Для покриття капсул використовують спеціальні склади, основними компонентами яких найчастіше є шелак, похідна целюлоза (наприклад прості або складні ефіри), поліметакрилати, сополімери (стиролу і малеїнової кислоти, вінілацетату і капронової кислоти та ін.) природний віск, альгінат натрію і інші;
4. надання кишковорозчинних властивостей самому наповнювачеві — кишковорозчинні плівкові покриття наносяться безпосередньо на гранули або мікрокапсули.

Найбільш використовуваний на сьогодні є метод при якому на готову капсулу наносять індиферентні для організму людини акрилові полімери (Eudragit декількох марок) методика нанесення покриття наступна: готову капсулу наполовину занурюють в розчин, достають, висушують та в подальшому перевертають і повторюють попередні операції. Враховуючи що ми будемо закуповувати капсули для зменшення собівартості продукції можна закупити образи кишковорозчинні капсули і знехтувати наступними процесами з метою зменшення собівартості продукції, так як покриття капсул власноруч призведе до додаткових енергозатрат, додаткового часу виробництва та економічних витрат на закупівлю обладнання та сировини для покриття капсули.

Підсумовуючи все вище неведене, оптимальною формою лікарського засобу для лактоферину є використання капсул з кишковорозчинними властивостями.

2.2.2. Обґрунтування вибору первинної та вторинної упаковки ЛЗ

Після отримання готового лікарського засобу наступною стадією є пакування його в первинну упаковку. Первинна упаковка це індивідуальна упаковка, яка безпосередньо контактує з лікарським засобом та сприяє збереженню його основних властивостей, вона буває різних форм типів та з різних матеріалів, розглядати всі типи первинної упаковки не є доцільним тому розглянемо найчастіше вживані для твердих лікарських засобів, а саме капсул (до таких відносять жорсткий тип пакування та напівжорсткий) [81].

Жорсткий тип пакування це контейнери та флакони зі скла, полімеру. Підходять для пакування твердих ліків. Це найнадійніший варіант фасування, що не боїться транспортування і зберігання в практично будь-яких умовах. Верхня частина твердих упаковок закривається кришками з механізмом закручування або на засувках. Капсули не запаковуються окремо, що дозволяє досягти компактного зберігання великих партій.

Напівжорстке виробляється із пластику, картону, фольги. Напівжорстка упаковка являє собою блістери з окремими комірками для кожної капсули.

Картонні або пластикові задні частини щільні, додатково захищаються шаром фольги. Їх легко надірвати, щоб дістати потрібне дозування ліків. Лицьова частина блістерів з прозорого пластика, за нею відстежується кількість прийнятих таблеток.

Розглядаючи дані види пакування можна зазначити що вибір буде надаватися типу який буде вміщувати найбільшу кількість капсул через зменшення економічних затрат на первинну та подальшу вторинну упаковку, та враховуючи що термін споживання є великим, тобто необхідно постійно споживати по 2 капсули в день протягом декількох місяців. Використовуючи блістери буде незручно для споживача, так як в блістерну упаковку поміститься препарату максимум на 10 днів, а в банки за рахунок відсутності окремого пакування кожної капсули можна розмістити більшу кількість лікарського засобу і мінімальний термін на який можна забезпечити споживання препарату становить приблизно місяць (60 капсул в банці). Також слід врахувати інформацію зазначену раніше, що банки виробляються з різних матеріалів, таких як скло та полімери, найоптимальнішим варіантом буде використання полімерних матеріалів так як вони будуть дешевше та більш зручніші для споживачів, банка з скла буде важча та є ризик розбиття її при транспортуванні, з полімерними матеріалами такого ризику немає і вони легші, в якості полімерного матеріалу можна обрати поліетилентерефталат.

Для захисту первинної упаковки від пошкодження використовують вторинне пакування, зазвичай воно виробляється з картону або полімерних матеріалів, та на вторинному препараті зазначається вся необхідна інформація яка прописана в Наказі МОЗ України № 536 від 11.09.2007 р.

Враховуючи що ми використовуємо банки з поліетилентерефталату, використання полімерних матеріалів для вторинного пакування не є доцільним, через більшу вартість в порівнянні з картоном, отже вторинне пакування буде використовуватись з картону, буде формуватися пакування по розмірам банки що б в картону коробку легко поміщалась банка з капсулами.

2.3. Обґрунтування вибору біологічного агента для отримання субстанції

Розглянувши в першому розділі перспективних продуцентів лактоферину, серед відомих на сьогодні, можна зазначити що найкращими серед них є бактерії роду *Escherichia coli* та метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris*. для подальшого вибору оптимального біологічного агента розглянемо продуцентів які наведені в таблиці 2.1.

Escherichia coli BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf* – даний штам синтезує в високих концентраціях людський лактоферин (2,9 г/л), та має невеликий час культивування (32 год) [38].

Escherichia coli SG13009/rpQE-30-NLf – отриманий штам володіє найменшим часом культивування (30 год) та проявляє нижчі показники концентрації N-кінців лактоферину (1 г/л) в порівнянні з попереднім продуцентом [39].

Pichia pastoris/pPICZaA-LF – синтезує найменшу кількість лактоферину в порівнянні з іншими продуцентами (0,06 г/л) та має найбільший час культивування 168 год [42].

Pichia pastoris KM71-H/pJ902*sbLf* – має найбільший показник концентрації лактоферину (3,5 г/л), але недоліком є час культивування дріжджів, який приблизно в 3 рази більший ніж у бактерій (96 год) [43].

Таблиця 2.1

Обґрунтування вибору біологічного агента

Продуцент	Склад поживного середовища, г/л	Концентрація лактоферину, г/л	Час культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Література
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/mpET28a+ <i>-lrf</i>	Дріжджовий екстракт – 5; Триптон – 10; NaCl – 5; 7,5 мл 50% розчину глюкози (0,00375 г/л глюкози); Канаміцин – 25 мг/л	2,9	32 (24 год вирощування біомаси + 8 год індукування)	Культивують в реакторі об'ємом 5 л, при 37 °C та постійному перемішуванні 250 об/хв, при досягненні значення OD ₆₀₀ = 0,6 починається індукування процесу впродовж 8 год температура зменшується до 23 °C та внесенням 1,1 мМ ізопропіл-β-тіогалактопіранозиду	[38]
<i>Escherichia coli</i> SG13009/rpQE-30-NLf	Дріжджовий екстракт – 5; Триптон – 10; NaCl – 5; Ампіцилін – 100 мг/л Канаміцин – 50 мг/л	1	30 (24 год вирощування біомаси + 6 год індукування)	Культивують при 37 °C та постійному перемішуванні 180 об/хв, при досягненні значення OD ₆₀₀ = 0,6 починається індукування процесу впродовж 6 год температура становить 37 °C та внесенням 1,0 мМ ізопропіл-β-тіогалактопіранозид	[39]
<i>Pichia pastoris</i> KM71-H/pJ902 <i>sbLf</i>	Дріжджовий екстракт – 10; Метанол – 5; KH ₂ PO ₄ – 13,6; Пептон – 20; Дріжджова азотна база – 13,4; Біотин – 0,4 мг/л Зеоцин – 175 мг/л	3,5	96	Вирощують при 30 °C та постійному перемішуванні, індукування відбувається внесенням кожні 24 год розчину метанолу 5 %	[43]
<i>Pichia pastoris</i> /pPICZaA-LF	Дріжджовий екстракт – 10; Метанол – 5; Пептон – 20; Дріжджова азотна база – 13,4; Біотин – 0,4 мг/л	0,06	168	Вирощують при 28 °C та постійному перемішуванні 220 об/хв, індукування відбувається внесенням кожні 24 год розчину метанолу 0,5 %	[42]

Розглянувши дані з таблиці 2.1, можна дійти до висновку що використання штаму *Pichia pastoris*/pPICZaA-LF не є доцільним через найвищий час культивування (168) та найменшу концентрацію отриманого лактоферину (0,06 г/л). Для визначення найкращого продуцента серед інших мікроорганізмів даних в таблиці 2.1 не достатньо, тому розглянемо вартість поживного середовища для даних мікроорганізмів та розрахуємо умовну вартість цільового продукту (табл. 2.2, табл. 2.3).

Таблиця 2.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-lrf*, *Escherichia coli* SG13009/rpQE-30-NLf та *Pichia pastoris* KM71-H/pJ902*sbLf*

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації (1-11)*
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/mpET28a+ <i>-lrf</i>	Дріжджовий екстракт – 5	2 244	11,22	1
	Триптон – 10	270	2,7	2
	NaCl – 5	40	0,2	4
	Глюкоза – 0,00375	60	0,002	6
	Канаміцин – 25 мг/л	16,59 (грн/г)	0,41	5
	Вартість 1 л середовища – 14,532 грн			
<i>Escherichia coli</i> SG13009/rpQE-30-NLf	Дріжджовий екстракт – 5	2 244	11,22	1
	Триптон – 10	270	2,7	2
	NaCl – 5	40	0,2	4
	Ампіцилін – 100 мг/л	12,10 (грн/г)	1,21	7
	Канаміцин – 50 мг/л	16,59 (грн/г)	0,83	5
	Вартість 1 л середовища – 16,16 грн			
<i>Pichia pastoris</i> KM71-H/pJ902 <i>sbLf</i>	Дріжджовий екстракт – 10	2 244	22,44	1
	Метанол - 5	160	0,8	8
	КН ₂ РO ₄ – 13,6	70	0,952	9
	Пептон – 20	270	5,4	3
	Біотин – 0,4 мг/л	6 264 (грн/г)	2,506	10
	Дріжджова азотна база – 13,4	235,44	3,154	11
	Вартість 1 л середовища – 35,256 грн			

Примітка: * Вартість компонентів станом на жовтень 2021 рік:

1. http://agar.com.ua/Yeast_Extract_250
2. <https://russian.alibaba.com/product-detail/peptone-tryptone-of-soy-fish-bone-beef-cas-91079-38-8-62449891397.html?spm=a2700.8699010.29.11.67806e4aX2L3bw>

3. <https://russian.alibaba.com/product-detail/factory-supply-99-soy-peptone-beef-bone-peptone-powder-1600229453432.html?spm=a2700.details.maylikeexp.1.7bd865fe68XwUE>
4. <https://prom.ua/ua/p5216502-natrij-hloristyj.html>
5. <https://liki24.com/p/kanamicin-por-dr-ra-d-1-g-fl-kievmedpreparat-oao/>
6. https://snabhim.com.ua/uk-ua/glyukoza?gclid=CjwKCAiAh_GNBhAHEiwAjOh3ZIYk07mv_reDmXnnrBXRSt1WSNB4ZF4qok4XZS8J5_HyuFZGttWyoxoCSusQAvD_BwE
7. <https://liki24.com/p/ampicillin-por-dr-ra-d-1-g-fl-kievmedpreparat-oao/>
8. <https://prom.ua/ua/p1495556457-metanol-chda-999.html?&primelead=NC4y>
9. <https://prom.ua/ua/p1480505382-monokalijfosfat-kalij-fosfornokislyj.html?&primelead=MS4xMg>
10. https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sigma/b4639?gclid=CjwKCAiAh_GNBhAHEiwAjOh3ZCPKIGSJc4jLI1bGUH2wkM0WiBC4H1FOJxxHD0reBzBk6qVtBF_4RRoCjoEQAvD_BwE
11. <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/SIGMA/Y1250>

Таблиця 2.3

Умовна вартість 1 г цільового продукту лактоферину при культивуванні *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf*, *Escherichia coli* SG13009/rpQE-30-NLf та *Pichia pastoris* KM71-H/pJ902*sbLf*

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація лактоферину, г/л	Умовна вартість 1 г лактоферину, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного лактоферину за годину, г/год
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)/mpET28a+ <i>-ltf</i>	14,532	2,9	5,011	32	0,09
<i>Escherichia coli</i> SG13009/rpQE-30-NLf	16,16	1,0	16,16	30	0,033
<i>Pichia pastoris</i> KM71-H/pJ902 <i>sbLf</i>	35,256	3,5	10,073	96	0,036

Провівши більш детальне порівняння продуцентів лактоферину, а саме визначивши вартість поживного середовища і в подальшому розрахувавши умовну вартість 1 г цільового продукту, можна дійти до висновку що найгірші показник проявляє штам *Escherichia coli* SG13009/rpQE-30-NLf, який за годину синтезує найменшу кількість лактоферину та має найбільшу умовну вартість 1 г цільового продукту, що приблизно на 6 грн та 11 грн більше ніж у *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf* та *Pichia pastoris* KM71-H/pJ902*sbLf*,

відповідно (отже використання даного штаму є недоцільним). Серед двох продуцентів які залишились можна відзначити *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf*, так як даний продуцент проявляє найкращі показники кількості утвореного лактоферину за годину (0,9) що майже в 3 рази більше ніж *Pichia pastoris* KM71-H/pJ902*sbLf*, та майже в два рази має меншу умовну вартість 1 г лактоферину (5,011 грн). Отже в результаті порівняння продуцентів лактоферину найкращим біологічним агентом серед обраних мікроорганізмів є *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf*.

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

Згідно статистичних даних МОЗ України з наданої допомоги вагітним, роділлям та породіллям які стосуються анемії за 2020 р, кількість захворілих осіб становить 46 744 [82].

Так як немає точного дозування та точного терміну застосування даного препарату для всіх людей, тобто термін і дозування встановлюється індивідуально, кількість і термін прийому лактоферину будемо використовувати як наведено в дослідженнях [71, 75], дозування лактоферину становило 100 мг двічі на день, термін прийому препарату становив від 6-8 го тижня до народження дитини, тобто в середньому кількість спожитого лактоферину однією жінкою становить:

$$100 \text{ мг} \times 2 \times (40 - (6+8)/2) \times 7 = 46\,200 \text{ мг або } 46,2 \text{ г лактоферину}$$

Враховуючи більшу вартість препарату в порівнянні з стандартним сульфатом феруму, за кількість жінок (які будуть використовувати нашу речовину для лікування ЗДА) приймемо 5 % від загальної кількості які хворіють анемією.

$$46\,744 \times 5\% = 2\,337$$

Для забезпечення даної кількості хворих необхідно лактоферину, г:

$$2\,337 \times 46,2 = 107\,969,4 \text{ г}$$

Дану кількість лактоферину можна отримати при культивуванні *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf*, який продукує 2,9 г/л лактоферину за 32 годин. Тому для отримання 107 969,4 г ЛФ необхідна наступна кількість культуральної рідини:

$$A = \frac{107\,969,4}{2,9} = 37\,230,8 \text{ л}$$

Враховуючи сумарні втрати цільового продукту при виділенні (30%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$B = \frac{37\,230,8}{1-(0,3)} = 53\,186,8 \text{ л}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини яку необхідно отримати за цикл ферментації. Приймаємо кількість робочих трудоднів ($T_{рд}$) = 150, тоді кількість продукту на добу (V_d) становитиме:

$$V_d = \frac{C}{T_{рд}} = \frac{53\,186,8}{150} = 354,57$$

Кількість продукту за цикл ($V_{пц}$) буде становити:

$$V_{пц} = \frac{K_1 * V_d * T_{цф}}{24} = \frac{1,1 * 354,57 * 39}{24} = 633,7 \text{ л/цикл}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера, який включає тривалість виробничого біосинтезу (32 год) та час підготовки ферментера до роботи (7 год). K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій $K_1 = 1,3$. Підготовка ферментера включає: миття та огляд (1,5 год), перевірка на герметичність (0,5 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год), охолодження (0,5 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

633,7 л культуральної рідини ($V_{пц}$) можна отримати у ферментері, геометричний об'єм якого має становити:

$$V_r = \frac{V_{пц}}{K_{зап}} = \frac{633,7}{0,65} = 975,06 \text{ л}$$

$K_{зап} = 0,65$ – коефіцієнт заповнення ферментера.

Найближчий за геометричним об'ємом ферментер $V_r = 1 \text{ м}^3$.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{зап} = \frac{V_{пц}}{V_r} = \frac{633,7}{1000} = 0,63$.

РОЗДІЛ 3

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИДІЛЕННЯ

Для виділення та очищення лактоферину, нині, використовують декілька методів, тому розглянемо більш детально їх для вибору оптимальної технології.

В статті [83] описується методика виділення та очищення лактоферину за допомогою катіонообмінної хроматографії, в даній технології отримання очищеного лактоферину використовують наступні стадії:

- Центрифугування;
- Мікрофільтрація;
- Ультрафільтрація (100 кДа);
- Ультрафільтрація (10 кДа);
- Катіонообмінна хроматографія;
- Ультрафільтрація (10 кДа);
- Ліофілізація.

В результаті проходження всіх стадій отримують продукт з чистотою 94,2 % та вихід лактоферину становить 82,4 %, недоліком даного процесу є використання ліофільного методу сушіння, який займає більшу частину процесу отримання субстанції.

В статті [84] описується методика отримання лактоферину в якій необхідно пройти наступні етапи:

- Мікрофільтрація (0,22 мкм);
- Ультрафільтрація (30 кДа);
- Адсорбція з розширеним шаром [85];
- Десорбція за допомогою натрію хлориду;
- Сушіння.

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору технологічної схеми виділення	Літ.		Арк.	Аркушів		
Розроб.		Жолобка О.В.						44	111		
Перевір.		Скροцька О.І.									
Консультан											
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В.П.									
							Кафедра БТМ				

Використовуючи дану технологію можна досягти найкращих результатів виходу продукту (87 %), але чистота продукту є найменшою (92,7 %), що в нашому випадку не задовольняє наші потреби.

Також можна відзначити технологію отримання лактоферину в якій чистота продукту складає 96,6 % [86], для досягнення даної чистоти продукту необхідно зробити наступні етапи:

- Центрифугування або фільтрація;
- Ультрафільтрація;
- Пропускання через катіонообмінну колону;
- Елюювання за допомогою 0,8 М натрію хлориду;
- Концентрування;
- Сушіння;

До недоліку даної технології можна віднести відсоток виходу продукту, який є невисоким (68,3 %), але враховуючи найвищий показник чистоти продукту дана технологія є найкращим варіантом для нас. Отже, розглянувши раніше перераховані методи можна дійти висновку що для виділення та очищення лактоферину необхідно пройти наступні стадії:

1. Видалення біомаси;
2. Доочищення фільтрату;
3. Іонообмінне виділення лактоферину;
4. Знесолення елюату;
5. Сушіння.

3.1. Видалення біомаси

Лактоферин є екзометаболітом, тобто він виділяється з клітини мікроорганізму в культуральну рідину, отже для стадій виділення та очищення цільового продукту необхідно відділити біомасу культури, для інтенсифікації подальших стадій виділення та очищення.

Об'єм культуральної рідини який ми отримуємо в результаті ферментаційного циклу становить 633,7 л, концентрація біомаси становить 12,8 г/л, отже приблизний об'єм який необхідно відділити становить:

$$633,7 \times 12,8 = 8,11 \text{ кг},$$

це теоретична вага сухої біомаси, тому слід врахувати вологість приймемо 85 %,

$$8,11 / 0,15 = 54,1 \text{ кг}$$

На сьогодні для видалення біомаси використовують фільтрацію, сепарування та центрифугування, розглянемо дані процеси та визначимо який з даних процесів краще підходить під наші потреби.

Перевагами процесу сепарування є можливість автоматизації процесу, компактність обладнання та відсутність фільтраційних мембран які можуть забиватись та зменшувати швидкість процесу. Процес сепарування зазвичай використовується для відокремлення великих за розміром клітин, але враховуючи, що отримання лактоферину відбувається за допомогою *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf*, а даний біологічний агент за своїми біолого-фізіологічними показниками має невеликий розмір клітин (2 мкм довжина, 0,25-1 мкм діаметр) та враховуючи недоліки процесу даного (великі витрати енергії) можна зробити висновок що при використанні сепараторів ми не зможемо повноцінно отримати бажаний результат.

Наступним методом відокремлення біомаси від культуральної рідини є центрифугування, даний метод найчастіше використовують для руйнування клітин продуцента з метою вивільнення продукту в розчин та осадження зруйнованих клітин, недоліками даного процесу є висока витрата енергії, відносна мала робоча поверхня процесу та висока вартість обладнання. Враховуючи перераховані недоліки можна зробити висновок що використання даного методу буде недоцільно, так як нам небажано руйнувати клітину біологічного агента, та необхідно обробити велику кількість культуральної рідини.

Серед найчастіше вживаних методів відділення біомаси залишився метод фільтрування, перевагою даного процесу є велика робоча площа, можливість підбору необхідних пор, простота обслуговування обладнання. До основних недоліків відносять можливість забивання пор які призведуть до

зменшення швидкості процесу, та використання обладнання що працює під тиском.

Підсумовуючи вище перераховані методи відділення біомаси, можна зробити висновок що в нашому випадку оптимальним варіантом буде використання мембранного фільтр пресу. Так як нам необхідно буде в подальшому доочистити фільтрат від високомолекулярних часток, необхідно після мембранного фільтр-пресу встановити мікрофільтраційну установку, для зменшення навантаження на ультрафільтраційні установки, та зменшити ризик забивання її пор.

Отже, процес видалення біомаси з культуральної рідини буде виглядати наступним чином, культуральну рідину після ферментаційного циклу направляють на мембранний фільтр-прес під тиском 0,4 МПа, отриманий фільтрат направляють в мікрофільтраційну установку де відбувається проходження розчину крізь пори розміром 0,22 мкм при тиску 0,5 МПа.

3.2. Доочищення фільтрату

Після стадії видалення біомаси в фільтраті знаходяться високомолекулярні речовини, які необхідно видалити для полегшення подальшого процесу виділення лактоферину. Так для відокремлення невеликих за розміром частин використовують баромембрані процеси, а саме мікрофільтрацію та ультрафільтрацію, враховуючи що мікрофільтраційна установка використовувалась на попередній стадії та високомолекулярні речовини потребують меншого діаметру пор ніж ми можемо використати в мікрофільтраційній установці, нам слід використати ультрафільтраційну установку.

В ультрафільтраційні установці використовують мембрани з різними діаметрами пор, вибір проводять в залежності від речовини яку необхідно відділити та її характеристик. Нам на даній стадії необхідно, що б в розчині після ультрафільтраційної установки залишився лактоферин і можливо невелика кількість високомолекулярних домішок, враховуючи розмір лактоферину який складає 70-80 кДа, найкращим варіантом буде

використання фільтраційної мембрани з відсіканням 50 кДа, таким чином ми зможемо залишити нашу речовину в концентраті та одночасно сконцентрувати розчин, що інтенсифікую подальший процес виділення лактоферину на іонообмінній смолі.

3.3. Іонообмінне виділення лактоферину

З отриманого концентрату після стадії доочищення фільтрату, необхідно виділити лактоферин, так як лактоферин відноситься до білків його можна виділити за допомогою висолювання або іонообмінного виділення. Але на сьогодні метод висолювання не використовують для виділення лактоферину через набагато простіший метод іонообмінного виділення (при використуванні висолювання в подальшому необхідно задіяти більшу кількість етапів очищення речовини).

Так враховуючи ізoeлектричну точку лактоферину (8,0) необхідно обрати смолу яка матиме менший рівень рН для гарного адсорбування молекули лактоферину.

Серед нині відомих смол оптимальним варіантом для адсорбування лактоферину є CM Sepharose FF, дана смола являється слабким катіонообмінником, який є стабільною при великому діапазоні значення рН (від 2 до 14). Як наведено в статтях [83-84, 86] для виділення лактоферину дана смола підходить ідеально, тому для іонообмінного виділення лактоферину будемо використовувати дану смолу. Перед пропусканням концентрату через смолу, необхідно підвищити рівень рН концентрату до позначки 6,8 (за допомогою внесення 1 М гідроксиду натрію), підвищивши рівень рН розчину на смолі будуть адсорбуватись білки з ізoeлектричною точкою вище 6,8, що необхідно для відсікання білків з меншим показником.

Після адсорбування білків на смолі, необхідно виділити лактоферин, тобто десорбувати його з смоли, як наводиться в статтях для десорбції використовують розчин хлориду натрію, при різних концентраціях, так в статтях [83, 84], використовують 1 М та 2 М розчин хлориду натрію, в результаті чого отримують лактоферин з значно гіршою чистотою, через

десорбцію не лише лактоферину а й інших білків які могли залишитись на даному етапі очищення. А в статті [86] відбувається промивання двома різними розчинами хлориду натрію, так спочатку промивають 0,27 М розчином хлориду натрію, за допомогою чого виділяються слабо адсорбовані білки, а потім вже для виділення лактоферину використовують 0,85 М розчин хлоридом натрію.

Отже, процес виділення лактоферину з концентрату буде відбуватись наступним чином, в іонообмінну колону заповнену смолою подають концентрат, під час проходження концентрату крізь смолу лактоферин буде адсорбуватись в смолі, після того як весь концентрат пропустять крізь смолу, смолу промивають очищеною водою, для змиття забруднення що не адсорбувалось в смолі та залишилось на ній. Після промивання водою, відбувається елюювання слабо адсорбованих білків промиванням 0,27 М хлоридом натрію і вже потім елюють 0,85 М хлоридом натрію для десорбції лактоферину.

3.4. Знесолення елюату

Після елюювання лактоферину з смоли, ми отримуємо велику кількість елюату в якому знаходиться лактоферин та 0,85 М розчин натрію хлориду, для кінцевого очищення лактоферину необхідно прибрати залишкову сіль з елюату. Так як концентрація солі в розчині невелика та розміри молекул лактоферину (приблизно 80 кДа) і натрію хлориду (приблизно 60 Да) значно відрізняються, можна використати два методи ультрафільтрацію або ексклюзійну хроматографію. Серед даних методів більш доцільно обрати ексклюзійну хроматографію, через менші затрати ресурсів в порівнянні з ультрафільтрацією та подальшою дифільтрацією.

Процес знесолення за допомогою ексклюзійної хроматографії базується на розділенні речовин за розміром молекул, менші молекули будуть проходити крізь пори смоли довше так як вони будуть затримуватись в порах, в той час як молекула лактоферину більша за діаметр пор смоли і вона не буде затримуватись в порах і швидше буде виходити.

Згідно даних статті [87] в якості смоли доцільно обрати Sephadex G-25, так як діапазон фракціонування даної смоли становить до 5 кДа, а як згадувалося раніше розмір молекули лактоферину майже в 16 разів більше, отже не буде затримуватись в порах смоли.

Розглянувши приклад використання даної смоли та її характеристика [87, 88], для розділення нашого об'єму необхідно використати в 2,8 рази більше об'єм смоли також враховуючи що смола збільшується приблизно в 5 разів (з 1 г розбухає до 4-6 мл) необхідно використати $58 \times 2,8 / 5 = 32,5$ кг, через велику вартість даної смоли доцільно розділити даний процес приблизно на 20 циклів що по часу буде становити приблизно 5 год, тоді нам необхідно 1,63 кг Sephadex G-25.

Підсумовуючи після процесу елюювання, елюат направляють в збірник де відбувається його зберігання, частину даного розчину направляють в колонку яка заповнена Sephadex G-25 для знесолення, для пришвидшення процесу під час знесолення в колонку подають очищену воду, через певний час на виході з колонки ми отримуємо лактоферин і направляємо даний розчин в збірник (для зберігання). Розчин збирається до того моменту поки не буде виявлено хлорид натрію, після виявлення хлориду натрію весь подальший розчин направляють в інший збірник.

Для інтенсифікації подальшого процесу сушіння знесолений розчин слід подати на ультрафільтраційну установку для концентрування розчину в 4 рази, так як в даному розчині знаходиться невелика кількість лактоферину та в рази більша кількість води.

3.5. Сушіння лактоферину

Після стадії знесолення необхідно прибрати залишкову вологу для отримання готової субстанції. Для сушіння в промисловості використовують розпилювальні сушарки, вакуум-сушильні шафи та сублімаційний метод сушіння.

Серед перерахованих варіантів ми будемо використовувати вакуум-сушильну шафу, через простоту використання та через невеликий об'єм

речовини, яку необхідно висушити, розпилювальна сушарка нам не підходить через великі габарити, великі енерговитрати та недоцільність використання для малого об'єму сушіння, сублімаційна в свою чергу через великий час процесу сушіння та більші економічні витрати.

3.6. Подрібнення порошкоподібного лактоферину

Наступним етапом є подрібнення висушеного лактоферину, для зручніших подальших перетворень. Зазвичай для даного результату використовують дробарки, наприклад дезінтегратор, валкові або молоткові. Серед даних типів оберемо молотковий тип дробарок так як він є найбільш простим типом дробарок та часто використовується в малотоннажних виробництвах та на виході завжди отримується порошкоподібний продукт з однаковою дисперсністю частинок через наявність сит, дезінтегратори не підходять через велике пилоутворення що є небажаним та для подолання якого потрібно буде встановлення додаткового обладнання, а валкові через великий розмір отриманих частинок на виході дробарки.

Підсумовуючи для отримання порошкоподібного лактоферину, після сушіння в вакуум-сушильній шафі, ми подрібнюємо продукт з допомогою молоткової дробарки в якій на виході встановлені сита розміром 150 мкм, в результаті отримуємо однорідний порошкоподібний продукт, з розміром частинок менше 150 мкм.

3.7. Зберігання субстанції

Заключною стадією виділення та очищення лактоферину є його зберігання. Після стадії подрібнення порошкоподібний лактоферин помішають в пересувну ємність, з якої відбирають проби для проведення контролю за показниками якості та в подальшому ємність закривають кришкою та наносять маркування з датою виробництва. Після проходження тестувань, якщо отримана субстанція відповідає необхідним показникам її направляють на склад де зберігають до стадій виробництва лікарського засобу, зберігання відбувається за кімнатних температур.

Вихідні данні

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації - $V_{\text{кр}} = 633,7$ л;
2. Концентрація біомаси у КР = 12,8 г/л;
3. Концентрація цільового продукту у КР = 2,9 г/л;
4. Втрати на стадіях виділення та очищення цільового продукту складають 31,17% ($633,7 \text{ л} \times 2,9 \text{ г/л} = 1\,837,73 \text{ г} - 31,17 \% = \underline{1,265 \text{ кг}}$)

Таблиця 3.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоків на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати рідини л (%), / ЛФ (%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 6 Зберігання культуральної рідини						
1	ТП 6.1. Зберігання культуральної рідини	КР	633,7 л			Збірник об'ємом 1 м³
ТП 7 Видалення біомаси						
2	ТП 7.1. Фільтрування КР	КР	633,7 л			Мембранний фільтр прес з об'ємом камери 2,1 м³
		Біомаса	54,1 кг (633,7 × 12,8 / 0,15 (вологість 85%))			
		Відфільтрована КР	579,6 (633,7 – 54,1)	29 (5 %) / 0,183 кг (0,63 %)	550,6 л (579,6 – 29)	
3	ТП 7.2. Мікрофільтрація	Відфільтрована КР	550,6			Мікрофільтраційна установка з об'ємом камери 0,53 м³
		Осад	5,5 (550,6 × 1%)			
		Фільтрат	545,1 (550,6 – 5,5)	27,3 (5 %) / 0,172 кг (0,63 %)	517,8 л (545,1 – 27,3)	
ТП 8 Доочищення фільтрату						
4	ТП 8.1. Ультрафільтрація	Фільтрат	517,8			Ультрафільтраційна установка продуктивність 0,5 м³/год (з фільтрувальними касетами 50 кДа)
		Концентрат	181,2 (517,8 × 35 %)	18,1 л (10%) / 0,1146 кг (0,63 %)	163,1 л (181,2 – 18,1)	
		Пермеат	336,6 л (517,8 – 181,2)			

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4	5	6	7
ТП 9 Виділення лактоферину						
5	ТП 9.1. Іонообмінне виділення лактоферину	1 М NaOH	50 мл	-		
		Концентрат	163,1 л			
		CM Sepharose Fast Flow (10 л розчину до 1 л смоли за годину)	16 л (163,1/10)	-		Обмінна колона об'ємом 100 л
		Деіонізована вода (для промивання смоли 4 л на 1 л смоли)	64 л (16 × 4)	-		
		0,27 М NaCl (розчин для елюювання зайвих білків 4 л на 1 л смоли за годину)	64 л (16 × 4)	-		
		0,85 М NaCl (розчин для елюювання лактоферину 4 л на 1 л смоли за годину)	64 л (16 × 4)			
		Елюат	64 л	6,4 л (10%) / 0,04 кг (0,63 %)	57,6 л (64 – 6,4)	Збірник об'ємом 100 л

Закінчення табл. 3.1

1	2	3	4	5	6	7
ТП 10 Знесолення елюату						
6	ТП 10.1. Ексклюзивна хроматографія	Елюат	57,6 л	-	-	
		Вода очищена	115 л			
		Sephadex G-25 (1,63 кг)	8,2 л			Обмінна колона об'ємом 15 л
		Знесолений розчин	96 л	9,6 л (10 %) / 0,06 кг (0,63 %)	86,4 л (100 – 9,6)	Збірник об'ємом 100 л
		Розчин натрію хлориду			76,6	Збірник об'ємом 100 л
7	ТП 10.2. Концентрування знесоленого розчину	Знесолений розчин	86,4 л			Ультрафільтраційна установка продуктивність 0,5 м³/год (з фільтрувальними касетами 50 кДа)
		Концентрат	21,6 л (86,4 × 25 %)	0,54 л (2,5 %) / 0,0031 кг (0,57 %)	21,06 л (21,6 – 0,54)	
		Пермеат	64,8 (86,4 – 21,6)			
ТП 11 Сушіння						
8	ТП 11.1. Сушіння концентрату	Концентрат	21,06 л	-	-	Вакуум-сушильна шафа об'ємом 33 л
		Висушений лактоферин (вміст вологи 0,5 %)	1,2714 кг (1,265 / 0,995)			
ТП 12 Подрібнення						
9	ТП 12.1. Подрібнення лактоферину	Висушений лактоферин	1,2714 кг	-	-	Дробарка продуктивність 20 кг/год
		Порошок лактоферину		0,0064 (0,5 %) / 0,03 г (0,47 %)	1,265 кг (1,2714 – 0,0064)	Переносна ємність об'ємом 5 кг
ТП 13 Зберігання субстанції						
10	ТП 13.1. Зберігання субстанції лактоферину	Порошкоподібний лактоферин			1,265 кг	Переносна ємність об'ємом 5 кг

РОЗДІЛ 4

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ

Субстанцію лактоферину перевіряють за показниками: опис, ідентифікація, втрата маси при висушуванні, загальна зола, важкі метали, мікробіологічна чистота, кількісне визначення (табл. 4.1) [89].

Таблиця 4.1

Контроль якості субстанції лактоферину

<i>Показник якості</i>	<i>Нормативне значення</i>	<i>Методика контролю</i>
Опис	Порошок білого кольору.	За п. 1 методів контролю, візуально
Ідентифікація	Час утримання розчину зразка має відповідати часу утримання <i>стандартного розчину</i> , що використовується у випробуванні Кількісне визначення .	За п. 2 методів контролю
Втрата маси при висушуванні	Не більше 0,5 %	За п. 3 методів контролю, ДФУ 2.2.32
Загальна зола	Не більше 0,1 %	За п. 4 методів контролю, ДФУ 2.4.16
Важкі метали	Не більше 0,001 %	За п.5 методів контролю, ДФУ 2.4.8
Мікробіологічна чистота	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^2 КУО/г; загальне число дріжджів і цвілевих грибів: не більше 10^1 КУО/г; відсутність <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> і <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	За п. 6 методів контролю, згідно з ДФУ 2.6.12, 2.6.13
Кількісне визначення	Вміст лактоферину має бути в межах 99,0–101,0 %	За п. 7 методів контролю

Методи контролю

1. Опис

Порошок білого кольору. Визначають візуально.

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жолобо О.В.			РОЗДІЛ 4. Контроль виробництва субстанції	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скороцька О.І.					56	111
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

2. Ідентифікація

Ідентифікацію лактоферину здійснюють за часом утримання розчину зразка, який має відповідати часу утримання *стандартного розчину*, що використовується у випробуванні **Кількісне визначення**.

3. Втрата маси при висушуванні (ДФУ 2.2.32)

Наважку лактоферину масою 1 г поміщають у попередньо висушений зважений бюкс і висушують в ексикаторі над фосфор(V) оксидом у вакуумі (1,5-2,5 кПа) за температури 80 °С до постійної маси. Втрата маси при висушуванні не має перевищувати 0,5 %.

4. Загальна зола (ДФУ 2.4.16)

Фарфоровий, кварцовий або платиновий тигель нагрівають при червоному жару протягом 30 хв, охолоджують в ексикаторі і зважують. Наважку лактоферину масою 1,00 г поміщають у тигель і рівномірно розподіляють по дну. Висушують за температури 100-105 °С протягом 1 год і потім спалюють до постійної маси у муфельній печі за температури 575-625 °С, охолоджуючи тигель в ексикаторі після кожного спалювання. Протягом усієї процедури в тиглі не повинно з'являтися полум'я. Якщо після тривалого спалювання зола все ще містить темні частки, вміст тигля кількісно переносять гарячою водою на беззольний фільтр і спалюють залишок на фільтрі разом з фільтрувальним папером. Фільтрат об'єднують із золою, обережно випарюють до сухого залишку і спалюють до постійної маси. Вміст загальної золи не має перевищувати 0,1 %.

5. Важкі метали (ДФУ 2.4.8)

Наважку лактоферину масою 1 г помішають у мірну колбу об'ємом 100 мл, додають воду очищену до мітки, перемішують до розчинення. З отриманого розчину відбирають аліквоту об'ємом 12 мл, змішують її з 2 мл буферного розчину рН 3,5 Р і перемішують. Одержану суміш додають до 1,2 мл реактиву тіоацетаміду Р і негайно перемішують. Паралельно за тих самих умов готують еталон, використовуючи замість 12 мл випробовуваного розчину суміш 10 мл еталонного розчину свинцю (1 ppm або 2 ppm Pb) Р і 2

мл випробовуваного розчину. Також готують холостий розчин, використовуючи суміш 10 мл води очищеної і 2 мл випробовуваного розчину. Порівняно з холостим розчином еталон повинен мати світло-коричневе забарвлення. Через 2 хв коричневе забарвлення випробовуваного розчину має бути не інтенсивнішим за забарвлення еталона. Вміст важких металів не має перевищувати 0,001 %.

6. Мікробіологічна чистота (ДФУ 2.6.12, ДФУ 2.6.13)

Контролюється загальне число аеробних мікроорганізмів, загальне число дріжджів і цвілевих грибів, відсутність *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*. Наважку лактоферину масою 10 г поміщають у флакон місткістю 250 мл, доводять до 100 мл (розведення 1:10) буферним розчином з натрію хлоридом і пептоном (рН 7,0) та перемішують до розчинення. Для визначення загального числа аеробних мікроорганізмів по 1 мл розчину висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 методом двошарового висівання. Для визначення загального числа дріжджів і цвілевих грибів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №2 методом двошарового висівання. Посіви на середовищі №1 інкубують за 30–35 °С, а посіви з середовищем №2 – за 20–25 °С протягом 5 діб, якщо вірогідні результати не будуть отримані за коротший час. Для виявлення окремих видів мікроорганізмів по 10 мл розчину вносять у рідкі поживні середовища: №3 (для росту *Escherichia coli*) та №8 (для росту *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*). Посіви інкубують за 30–35 °С протягом 18–24 год, після чого роблять пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5, а з середовища №8 – на середовища №9 та №10. Посіви інкубують за 35–37 °С протягом 24–48 год. За наявності росту мікроорганізмів проводять їх ідентифікацію згідно з вимогами ДФУ 2.6.13. Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів не має перевищувати 10^2 КУО/г, загальне число дріжджів і цвілевих грибів має бути не більше 10^1 КУО/г; у препараті не повинно бути *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*.

Пропис необхідних для аналізу поживних середовищ:

Густе поживне середовище №1 (м'ясо-пептонний агар)

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— натрію хлорид	5,0 г
— глюкоза	1,0 г
— агар мікробіологічний	13,0 г
— м'ясна вода (1:2)	1000 мл

рН після стерилізації 7,1 – 7,5

Густе поживне середовище №2 (агар Сабуро)

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— глюкоза	40,0 г
— агар мікробіологічний	13,0 г
— вода очищена	1000 мл

рН після стерилізації 5,4 – 5,8

Рідке поживне середовище №3 (середовище збагачення для бактерій род. Enterobacteriaceae)

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— динатрію гідрофосфат	7,5 г
— калію дигідрофосфат	2,5 г
— глюкоза	10,0 г
— феноловий червоний*	0,08 г
— малахітовий зелений**	0,015 г
— м'ясна вода (1:2)	1000 мл

рН після стерилізації 7,1 – 7,5

*Феноловий червоний (1%-ий розчин):

- | | |
|----------------------------------|-----------|
| • Фенолового червоного | 1 г |
| • Розчину гідроксиду натрію 0,1М | 28,2 мл |
| • Води дистильованої | до 100 мл |

**Малахітовий зелений (0,5%-ий розчин):

- Малахітового зеленого 0,5 г
- Води дистильованої до 100 мл

Густе поживне середовище №4 (агар Ендо)

— поживний агар сухий	26,5 г
— ЕКДА	1,22 г
— динатрію гідрофосфат	0,48 г
— натрію сульфат безводний	0,83 г
— натрію карбонат	0,03 г
— лактоза	10,7 г
— фуксин основний	0,23 г
— вода очищена	1000 мл
рН після стерилізації	7,1 – 7,5

Густе поживне середовище №5 (вісмутсульфіт агар)

— панкреатичний гідролізат м'яса	10,1 г
— динатрію гідрофосфат безводний	3,68 г
— натрію хлорид	2,6 г
— натрію карбонат	0,65 г
— вісмуту цитрат	2,38 г
— заліза (II) амонію сульфат	0,97 г
— D-глюкоза	3,9 г
— агар мікробіологічний	15,0 г
— діамантовий зелений	0,028 г
— вода очищена	до 1000 мл
рН після стерилізації	7,4 – 7,8

*Рідке поживне середовище №8 (для вирощування *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*)*

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— натрію хлорид	5,0 г
— дикалію гідрофосфат	2,5 г

— вода очищена	1000 мл
pH після стерилізації	7,1 – 7,5

Густе поживне середовище №9 (для виявлення пігменту піоціаніну)

— пептон ферментативний сухий	20,0 г
— магнію хлорид безводний	1,4 г
— калію сульфат безводний	10,0 г
— гліцерин	10,0 г
— агар мікробіологічний	15,0 г
— вода очищена	1000 мл
pH після стерилізації	7,0 – 7,4

*Густе поживне середовище №10 (для ідентифікації *Staphylococcus aureus*)*

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— натрію хлорид	75,0 г
— маніт	10,0 г
— феноловий червоний	0,025 г
— агар мікробіологічний	15,0 г
— вода очищена	1000 мл
pH після стерилізації	7,2 – 7,6

7. Кількісне визначення. Визначення здійснюють методом зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії [90]. Необхідні для аналізу складові:

Рухлома фаза: розчин 0,1 % трифторооцтової кислоти у суміші води з ацетонітрилом (95:5 об/об) – рухлива фаза А, розчин 0,1 % трифторооцтової кислоти у суміші води з ацетонітрилом (5:95 об/об) – рухлива фаза Б.

Стандартний розчин: розчин стандартного зразка (*Lactoferrin (from bovine milk)*[91]) з концентрацією лактоферину 50 мкг/мл. Процес приготування розчину: 2 мг лактоферину вносять у мірну колбу об'ємом 10 мл, додають 5 мл води очищеної, суміш перемішують до розчинення. Далі об'єм розчину доводять до мітки водою очищеною, відбирають аліквоту

об'ємом 0,25 мл у градуйовану пробірку, після чого об'єм розчину доводять до 1 мл додаванням розчину рухливої фази А.

Випробовуваний розчин: розчин випробовуваного зразка з концентрацією лактоферину 50 мкг/мл. Наважку лактоферину масою 100 мг вносять у мірну колбу об'ємом 500 мл, додають 250 мл води очищеної, суміш перемішують до розчинення. Далі об'єм розчину доводять до мітки водою очищеною, відбирають аліквоту об'ємом 12,5 мл у мірну колбу об'ємом 50 мл, після чого об'єм розчину доводять до мітки додаванням розчину рухливої фази А.

Колонка: Jupiter 5u C₁₈ 300R (250*4,6 мм) зі стаціонарною фазою C₁₈ (5 мкм).

Умови проведення аналізу: швидкість руху елюента – 0,5 мл/хв, температура в колонці – 37 °С, об'єм інжекції – 50 мкл. Елюювання здійснювали так: перша хвилина – елюювання з використанням 35 %-го розчину рухливої фази Б, наступні 19 хв – 60 %-м розчином рухливої фази Б.

Детектор: УФ-детектор G1315B (210 нм).

Вміст лактоферину повинен перебувати в межах 99,0–101,0 % від номінального значення.

РОЗДІЛ 5

ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

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

За один ферментаційний цикл ми отримуємо 633,7 л культуральної рідини, після стадій виділення та очищення культуральної рідини з одного ферментаційного циклу, ми отримуємо 1,265 кг лактоферину.

Розрахувавши річну потребу лактоферину, яка становить 107 969,4 г ми обирали курс лікування який складається з прийому 100 мг лактоферину двічі на день впродовж 33 тижнів. З розрахунку річної потреби ми визначили, що приблизно 2 337 жінок будуть використовувати наш препарат, також враховуючи що дана кількість жінок буде використовувати його не в один проміжок часу, необхідно розподілити кількість препарату на ринку рівномірно для забезпечення використання на цілий рік, згідно даних Державної статистики України неможливо визначити кількість захворювань за місяцями, тому проведемо розрахунок по народженим дітям

Так в статистику новонароджених враховують дітей, які народилися за кордоном та дітей, які народилися не в лікарні, тому необхідно співставити кількість зареєстрованих пологів з кількістю народжених дітей

За статистичними даними новонароджених за 2020 рік було 293,457 дитини, також ми маємо данні що було зареєстровано 3,723 багатоплідних пологів (це означає що в основному народилося 2 дитини за одні пологи, або в дуже рідких випадках 3) за 2020 рік не зроблено уточнення які кількість дітей відноситься до даної категорії, тому дізнаємося відсоткове співвідношення на попередньому році.

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лз	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобка О.В.						
Перевір.		Скороцька О.І.					63	111
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Так в 2019 року було зареєстровано 4170 багатоплідних пологів з них пологів в яких народилися двійнята було 4135, а трійнят 35 [92] тобто за відсотковим співвідношенням з усіх зареєстрованих багатоплідних пологів 0,84 % будуть трійнята, отже в 2020 році з 3723 багатоплідних пологів, 31 випадок народження трійнят та 3692 двійнят. Отже, приблизна кількість жінок, які народжували буде становити:

$$293\,457 - 3692 - 31 * 2 = 289\,703 \text{ жінки}$$

За 2020 рік було прийнято пологів в лікарні 281 349 співставимо кількість народжених з кількістю зареєстрованих пологів:

$$281\,349 / 289\,703 * 100 = 97,12 \%$$

Розрахуємо кількість народжених за місяцями:

Кількість народжених	Проміжок часу	Місяць	Народжених за місяць	Посилання (1-12)
27,928	Січень	1	27,928	1
51,085	Січень-Лютий	2	23,157	2
70,494	Січень-Березень	3	19,409	3
92,339	Січень-Квітень	4	21,845	4
115,968	Січень-Травень	5	23,629	5
139,134	Січень-Червень	6	23,166	6
168,751	Січень-Липень	7	29,617	7
193,138	Січень-Серпень	8	24,387	8
220,657	Січень-Вересень	9	27,519	9
247,278	Січень-Жовтень	10	26,621	10
268,899	Січень-Листопад	11	21,621	11
293,457	Січень-Грудень	12	24,558	12

1. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg_u.xls
2. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg0220_u.xls
3. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg0320_u.xls
4. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg0420_u.xls
5. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg0520_ue.xls
6. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg0620_ue.xls
7. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg0720_ue.xls
8. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg0820_ue.xls
9. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg0920_ue.xls
10. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg1020_ue.xls
11. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg1120_ue.xls
12. https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/ds/kjp_reg/xls/kjp_reg1220_ue.xls

Проведемо кореляцію між загальною кількістю народжених та кількість зареєстрованих пологів (яка становить 97,12 %), а також одразу проведемо

перерахунок який відсоток буде мати захворювання, (згідно даних допомоги роділлям та породіллям в 2020 році кількість захворювання на анемію становить 46 744, усього пологів було прийнято в тому ж 2020 році 281 349, тобто відсоток захворювання становить $46\,744 / 281\,349 * 100 = 16,61 \%$)

Місяць	Народжених за місяць	Кількість прийнятих пологів (перерахунок народжених з кількістю зареєстрованими 97,12 %)	Кількість захворювань на анемію (16,61 %)
1	27 928	27 123	4 505
2	23 157	22 489	3 735
3	19 409	18 849	3 131
4	21 845	21 215	3 524
5	23 629	22 948	3 812
6	23 166	22 498	3 737
7	29 617	28 763	4 778
8	24 387	23 684	3 934
9	27 519	26 725	4 439
10	26 621	25 853	4 294
11	21 621	20 997	3 488
12	24 558	23 850	3 961

Також проведемо визначення по місяцям використання жінками, як було обрано під час проведення техніко-економічного обґрунтування кількість використання становить 5 % від кількості захворювання, дані наведені в рис.5.1.

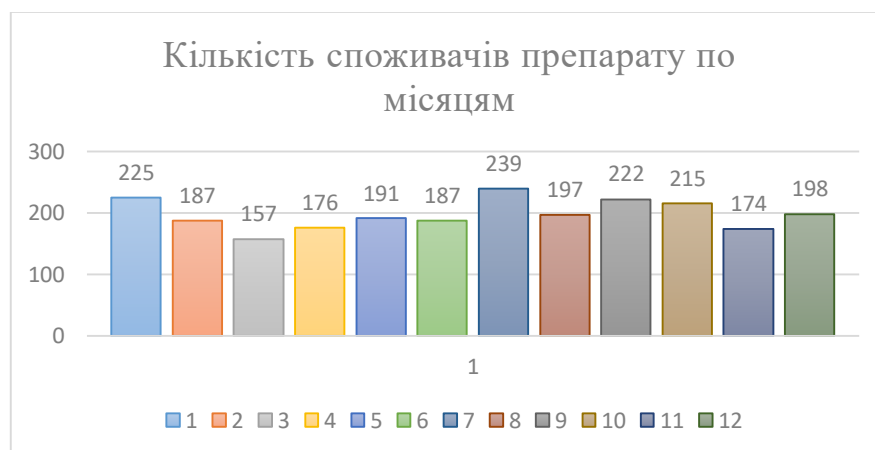


Рис.5.1. Графічне зображення теоретичної кількості споживачів лікарського засобу

Згідно графічних даних наведених на рис.5.1 найбільша кількість пацієнток припадає на липень та становить 239 жінок та січень 225 жінок,

враховуючи що курс лікування становить 33 тижні приблизно 7 місяців, коли закінчиться споживання жінками з першого місяця жінки почнуть приймати препарат на 7 місяці і великого навантаження на виробництво не буде.

Курс лікування становить 33 тижні для забезпечення повного проходження курсу для 225 жінок потрібно наступна кількість препарату:

$$225 \times 33 \times 7 \times 2 \times 0,1 \text{ г} = 10\,395 \text{ г} = 10,395 \text{ кг лактоферину}$$

З одного ферментаційного циклу та подальшого процесу очищення, як зазначалось раніше ми отримуємо 1,265 кг лактоферину, тоді для отримання такої кількості діючої речовини нам необхідно провести:

$$10,395 / 1,265 = 8,2 \text{ цикла,}$$

Прийmemo 8 циклів так як споживання буде відбуватись поступово, і в подальшому можна буде виробити необхідну кількість препарату з іншої серії. Враховуючи, що в нашому випадку кількість ферментаційних циклів для забезпечення річної потреби становить 85 циклів/рік, для зручності подальших розрахунків прийmemo, що одна серія препарату буде вироблятися з діючої речовини отриманої в результаті 5 ферментаційних циклів та подальших стадій очищення та виділення, тобто одна серія буде містити:

$$5 \times 1,265 \text{ кг} = 6,325 \text{ кг лактоферину}$$

Враховуючи що ферментаційний цикл становить приблизно 40 год, для синтезу даної кількості речовини необхідно $5 \text{ циклів} \times 40 \text{ год} = 200 \text{ год}$ та врахуємо час затрачений на виділення та очищення з останнього ферментаційного циклу, який не перебільшує часу ферментації (приймемо 40 год з запасом) $200 \text{ год} + 40 \text{ год} = 240 \text{ год}$, так як заводи працюють в декілька змін (умовно можна сказати цілий день) для отримання діючої речовини на одну серії піде приблизно 10 днів, тоді за 1 місяць, можна випустити 3 партії препарату.

Випускаючи по 3 партії в місяць ми зможемо забезпечити потребу в нашому препараті приблизно за пів року, випустивши 17 партій препарату, що є гарним показником, так як іншу частину року ми або зможемо збільшити

наші виробничі потужності проаналізувавши попит на наш продукт, або виробляти інший препарат.

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

Випуск лактоферину буде відбуватись в твердій лікарській формі, а саме в капсулі, а прийом препарату перорально, отже можна зробити висновок що препарат відноситься до нестерильних лікарських засобів. Так як виробництво даного препарату не є таким вибагливим по відношенню до стерильності оптимальним варіантом буде виробництво у приміщеннях класів чистоти С і D. Так допоміжні роботи які будуть стосуватись приготування компонентів, отримання наважок, підготовка первинної упаковки, буде відбуватись в класі чистоти D, в той час як процес гранулювання, змішування компонентів та капсулювання буде відбуватись в класі чистоти С.

Визначившись з класами чистоти виробничих приміщень, необхідно визначити загальні вимоги для персоналу, тобто визначити правила поведінки для людей яких потрібно дотримуватись для зменшення ризику сторонньої контамінації.

Так згідно належної виробничої практики весь персонал який знаходиться на виробництві та діяльність якого може вплинути на якість продукції повинен проходити навчання з дисципліни та дотримуватися гігієнічним вимогам.

До гігієнічних вимог можна віднести наступні пункти:

- Не вживати їжу, воду не палити, а також зберігати їжу, напої, тютюнові вироби або особисті лікарські засоби у виробничих зонах;
- При вході в виробничі зони одягати захисний одяг;
- При наявності у співробітника інфекційних захворювань або відкритих ран на відкритих ділянках тіла не брати участь у виробництві лікарського засобу;
- Вміти використовувати засобів для миття рук;

- Уникати прямого контакту руками з відкритою продукцією та будь-якою частиною обладнання, що контактує з продукцією.

Під час переодягання в захисний одяг верхній одяг заносити та зберігати в класі чистоти С та D не можна, відповідно до класу чистоти, співробітник повинен дотримуватись використання наступного одягу:

- Клас D: волосся і борода (за наявності) мають бути закриті. Слід носити звичайний захисний костюм і відповідне взуття або бахіли.
- Клас С: волосся, а також борода і вуса (за їх наявності) мають бути закриті. Необхідно носити комбінезон або брючний костюм, що щільно прилягає на зап'ястках і має високий комір, а також відповідне взуття або бахіли. Від них практично не мають відокремлюватися волокна або часточки.

Під час фармацевтичного виробництва важливим етапом, яким не можна нехтувати, є санітарна обробка виробництва, зважаючи що процес виробництва складає приблизно півроку необхідно використовувати два дезінфікуючих засоби (через кожні 10-14 днів відбувається чергування дезінфікуючих засобів) для запобігання розвитку стійких штамів мікроорганізмів. Зберігання дезінфікуючих засобів відбувається в попередньо очищених контейнерах та протягом установлених термінів.

Ознайомившись з державним реєстром дезінфекційних засобів [93], оптимальними варіантами для санітарної обробки підприємства буде, дезінфекційний засіб "ДЕЗОлайт" який також володіє мийними властивостями, основними діючими речовинами даного засобу є дидецилдиметиламоній хлорид 7,0 – 8,0 % та алкілдиметилбензиламоній хлорид 6,0 – 7,0 %, а також засіб мийний з дезінфікуючим ефектом «КлінДез 401», основною діючою речовиною даного засобу є натрій гіпохлорит- 50,0%, вміст активного хлору 5,0%-9,0%.

Ще одним головним етапом виробництва, це підготовка вентиляційного повітря для виробничих приміщень. Для класів чистоти С та D використовують не одно направлений повітряний потік, температура повітря

та вологість підтримується системами кондиціонування повітря, також при можливості використовуються рециркуляція повітря.

Відбір повітря відбувається з навколишнього середовища враховуючи можливі джерела аерозольних та газоподібних забруднень (автотранспорт, газоподібні викиди) відбір буде відбуватись в найвищій точці виробництва + додаткові декілька метрів. Очищення повітря повинно бути ступінчатим, необхідно обладнати систему додатковим обладнанням для зменшення рівня шуму та вібрації, автоматично регулювати температуру (25 °C) та вологість (W=30-50 %).

Так як ми використовуємо виробничі приміщення класу чистоти C та D, необхідно передбачити триступінчасту систему очищення повітря та використовувати фільтри для забезпечення необхідних умов чистоти, так для класу чистоти C на рівнях очищення необхідно використовувати наступні фільтри:

- 1 рівень - не нижче класу G 4
- 2 рівень - не нижче класу F 7
- 3 рівень - не нижче класу H 12

А для виробничих приміщеннях класу чистоти D, під час очищення повітря необхідно пропустити через наступні фільтри:

- 1 рівень - не нижче класу G 3
- 2 рівень - не нижче класу F 6
- 3 рівень - не нижче класу H 11

5.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Обравши форму лікарського засобу та зважаючи на довготривалий курс лікування, фасування капсул лактоферину буде відбуватись в баночки по 60 шт, так як дана тара буде закуповуватись у компаній, які спеціалізуються на вироблені тари для фасування та пакування (закупівля тари набагато простіша ніж власне виробництво), як зазначено в настанові: Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2015 [94], тару в яку пакується лікарський засіб слід попередньо підготувати, отже

закуплену тару слід промити та висушити перед розміщенням в неї готового лікарського засобу. Для відокремлення механічних забруднень, баночки промивають водопровідною водою зовні та усередині, кришки якими закриваються баночки також промивають декілька разів водою, промивання баночок та кришок відбувається за температури 55 °С. Після ополіскування первинної упаковки її компоненти поміщають у сушильну шафу де відбувається сушіння при 55 °С.

5.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Вода є складовою частиною ключових елементів забезпечення якості фармацевтичної продукції. Вона може використовуватись для миття обладнання, тари промивання первинної упаковки, може слугувати в якості допоміжної речовини або використовуватись для підготовки препарату до використання, а також в процесі виробництва, та синтезу готового продукту.

В основному вода на фармацевтичних виробництвах поділяється від її призначення, так згідно СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації [95] вода ділиться на:

1. Вода питна;
2. Вода очищена;
3. Вода високоочищена;
4. Вода для ін'єкцій.

Так як у нас нестерильний лікарський засіб, а під час приготування кінцевого продукту воду не використовують, нам необхідно передбачити підготовку води питної та води очищеної.

Для отримання питної води, необхідно провести наступні етапи:

- Забір водопровідної води;
- Направлення води на фільтраційну установку для видалення механічних забруднень;
- Отриману воду з попереднього етапу направляють на ультрафільтраційну установку для видалення менших механічних домішок, колоїдних домішок, частин органічних забруднень, а

також видалення бактерій та інших мікроорганізмів, розміри яких перевищують соті частки мікрону.

Для приготування дезінфікуючих засобів необхідно використовувати воду очищену, тому для отримання очищеної води з питною водою необхідно провести наступні стадії:

- Питну воду направляють на іонообміну колону для пом'якшення води, видаленням катіонів кальцію та магнію заміною на катіони натрію та водню.
- Після іонообмінного обміну катіонів, воду направляють в установку зворотного осмосу для демінералізації яка відбувається за рахунок затримання розчинених домішок які наявні в воді на мембрані.
- Заключним етапом є електродеіонізація, на даній стадії відбувається фінішна демінералізація води.

5.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Нині є декілька технологій формування лікарського засобу лактоферину у формі капсул, для більш точного визначення, яка з даних технологій є найбільш оптимальною, розглянемо їх більш детально.

Враховуючи факт що при виборі лікарської форми (капсули) ми встановили, що лактоферин засвоюється в кишківнику через що необхідно забезпечити надходження діючої речовини в кишечник, і найпростішим варіантом для досягнення даної мети є закупівля кишковорозчинних капсул, процес отримання лікарського засобу буде складатись з:

Формування наважок

Об'єднання компонентів

Капсулювання в попередньо закуплені кишковорозчинні капсули

Фасування та пакування

До переваг можна віднести простоту процесу, тобто непотрібно проводити додаткових операцій для забезпечення кишковорозчинних властивостей капсули, до недоліків можна віднести вартість капсул, яка значно вище в порівнянні з простою капсулою.

До другого варіанту можна віднести покриття сформованої капсули спеціальним розчином, який надає капсулі кишковорозчинні властивості, серед найбільш відомих та найбільш використовуваних речовин, які застосовуються для контролю доставки пероральних ліків, є Eudragit [96]. Перевагами даної технології є відповідність будь-якому цільовому профілю вивільнення діючої речовини, за допомогою комбінування декількох типів полімеру. Процес отримання готового лікарського засобу буде виглядати наступним чином: капсули після стадій капсулювання необхідно занурити на половину в розчинений полімер на декілька хвилин, після занурення очікують поки полімер застигне, після застигання полімеру другу частину капсули занурюють на декілька хвилин та очікують поки полімер застигне. Після формування полімерного покриття капсули направляють на стадії фасування та пакування готового лікарського засобу.

Недоліком даної технології є необхідність закупівлі додаткового обладнання та полімеру, що призведе до збільшення собівартості препарату.

Третім варіантом є власноручне створення капсул за технологією описаною в статті [97], в якій було розроблено нову оболонку капсули, за допомогою поліелектролітних комплексів. Так капсула виробляється на основі хітозану, натрію сульфатцелюлози та натрію поліфосфату. Згідно результатів досліджень, які вчені отримали при визначенні властивостей отриманих капсул, можна дійти висновку що використання даного комплексу для контролю доставки лактоферину в кишківник є гарним варіантом через регулярні та стійкі профілі вивільнення у симульованій кишковій рідині діючої речовини, а також через високий показник ефективності інкапсуляції (70,7 %). До недоліків даної технології можна віднести необхідність придбання додаткового обладнання та час який витрачається на створення капсул, отже використовувати дану технологію є нераціонально.

Останнім відомим на сьогодні варіантом є використання технології яка описана в патенті [98], суть якої полягає в створенні плівкового покриття навколо молекул лактоферину, за допомогою жирів, які продовжують термін

доставки діючої речовини, враховуючи що в даній технології для створення плівкового покриття використовується пальмова олія, , цей метод є найоптимальнішим, через найменшу вартість створення готового лікарського засобу.

Переглянувши технології отримання капсульованого кишковорозчинного лактоферину та визначившись з оптимальним варіантом, для отримання готового препарату нам необхідно провести наступні стадії:

- Зважування наважки очищеного лактоферину та внесення в гранулятор;
- Внесення в гранулятор до лактоферину пальмової олії та проведення процесу грануляції, при перемішуванні (300 об/хв).
- Після гранулювання отриману суміш направляють в реактор де відбувається нагрівання внесенням глухої пари в сорочку реактора до температури 70 °C протягом 20 хв, та наступного охолодження, для створення плівкового покриття навколо молекули лактоферину;
- В реактор до отриманої суміші вносять 10-кратну кількість мікрокристалічної целюлози та в два рази меншу вагу натрійкарбоксиметилцелюлози, після внесення наважок суміш перемішують до рівномірного розподілу;
- Капсулювання в попередньо закуплені капсули по 1,2 г з вмістом лактоферину в капсулі 0,1 г;
- Фасування та пакування.

Для даної технології потрібно передбачити наявність наступного обладнання:

- Гранулятор для формування гранул лактоферину з пальмовою олією;
- реактор-змішувач об'ємом 100 л (6,32 кг лактоферину + 5 % пальмової олії (316 мл) + 66,2 кг мікрокристалічної целюлози + 3,31 кг натрійкарбоксиметилцелюлози) для змішування компонентів;
- Автоматична машина для наповнення капсул.
- Автоматичний лічильник капсул для фасування готових капсул в банки

РОЗДІЛ 6

МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС НА СЕРІЮ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Матеріальний баланс на серію лактоферину в капсулах наведено в табл.6.1.

Таблиця 6.1

Матеріальний баланс на серію лікарського засобу

Завантажено за цикл			Одержано за цикл		
1. Стадія формування наважки діючої речовини					
№	Компонент	кг	№	Компонент	кг
1	Очищений лактоферин	6,325	1	Наважка лактоферину	6,32
2	Втрати, %	0,05	2	Втрати	0,005
Разом		6,325	Разом		6,325
2. Стадія отримання лактоферину покритого плівковою					
1	Наважка лактоферину	6,32	1	Композиція лактоферину	6,62
2	Пальмова олія	0,316			
3	Втрати, %	0,31	2	Втрати, кг	0,016
Разом		6,636	Разом		6,636
3. Стадія формування наважок допоміжних речовин					
1	Мікрокристалічна целюлоза	66,2	1	Наважка мікрокристалічної целюлози	66,2
2	Натрійкарбокси-метилцелюлоза	3,31	2	Наважка натрійкарбокси-метилцелюлози	3,31
Разом		69,51	Разом		69,51

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жолобка О.В.			РОЗДІЛ 6. Матеріальний баланс на серію лікарського засобу	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скороцька О.І.					74	111
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

4. Стадія об'єднання компонентів					
1	Композиція лактоферину	6,62	1	Об'єднані компоненти	76,13
2	Наважка мікрокристалічної целюлози	66,2			
3	Наважка натрійкарбокси-метилцелюлози	3,31			
Разом		76,13	Разом		76,13
5. Стадія капсулювання					
1	Об'єднані компоненти	76,13	1	Капсульований лактоферин	86,38
2	Капсули, 1 капсула 163 мг	10,34			
3	Втрати, %	0,1	2	Втрати, кг	0,09
Разом		86,47	Разом		86,47
6. Стадія фасування					
1	Капсули лактоферину	86,38	1	Фасовані капсули	86,29
2	Втрати, %	0,1	2	Втрати, кг	0,09
Разом		86,38	Разом		86,38

РОЗДІЛ 7

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ (ЕТАПИ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ОТРИМАННЯ ЛЗ)

Таблиця 7.1

Специфікація обладнання ділянок післяферментаційного виділення і очищення та отримання лікарського засобу

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Повітрязабірник обладнаний металевою решіткою для вилучення забруднюючих частинок
Ф-2	Фільтр грубого очищення	1	Панельний фільтр грубого очищення, з класом фільтрації G4, габарити 490*490*92 мм [99]
В-3	Вентилятор	1	Промисловий вентилятор з продуктивністю 600 м³/год, рівень шуму – 32 дБ, діаметр – 160 мм [100]
К-4	Система кондиціонування HVAC	1	Блок HVAC, модель - WRF12ZA, рівень шуму - 67 дБ, продуктивність - 2,3 м³/год, габарити 1410*1100*1095 мм [101].
Ф-5	Фільтр тонкого очищення	1	Панельний фільтр тонкого очищення, з класом фільтрації F7, габарити 400*220*48 мм [102]
Ф-6 Ф-17	Індивідуальний фільтр для класу чистоти D	2	Фільтр HEPA, з класом фільтрації H11, габарити 305*610*78 мм [103].
МФ-7	Мікрофільтраційна установка	1	Мікрофільтраційна установка BTS-CMS-MF1, продуктивність -16м3/год [104]
УФ-8	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка УФ300 з продуктивністю 300 л/год [105]
З-9 З-16	Збірник для зберігання води питної / води очищеної	2	Збірник сталевий емальований з номінальним об'ємом 10 м3, довжина – 2600 мм, ширина – 2600 мм, висота – 4020 мм [106].
ІК-10 ІК-12	Іонообмінна колонка	2	Пілотні скляні іонообмінні колони, допустима температура 4-40 °С, висота 850 мм, внутрішній діаметр 300 мм, допустимий диск 0,3-1 МПа[107].
Н-11 Н-13 Н-23	Насос відцентровий	3	Відцентровий насос МЕТАВО Р 2000 G; Продуктивність 2000 л/год [108]

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Жолобка О.В.			РОЗДІЛ 7. Специфікація обладнання (етапи виділення і очищення субстанції та отримання лз)	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.І.					76	111
Консультант						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
УЗО-14	Установка зворотного осмосу	1	Система зворотного осмосу Nereh KISSRO240-S, з продуктивністю 400 л/год, габарити 345*280*1240 мм [109].
УЕД-15	Установка електродеіонізації	1	Установка електродеіонізації DOW EDI-31012, продуктивність 1,5 м3/год, габарити 1200*1000*1950 мм [110]
3-18 3-20	Збірник для приготування дезінфекційного засобу	2	Збірник сталевий емальований з номінальним об'ємом 25 л, довжина – 520 мм, ширина – 450 мм, висота – 500 мм [106].
Д-19 Д-21	Дозатор рідин	2	Дозатор рідин, встановлюється на труби діаметром 6-50 мм [111]
Р-22	Реактор для зберігання культуральної рідини	1	Об'єм апарату – 1,0 м3; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.», висота – 2180 мм, діаметр – 1300. [106]
МФП-24	Мембранний фільтр-прес	1	Мембранний фільтр-прес ЧМ 150/30 – 1200х1200. Висота – 2600 мм, діаметр - 2800; об'єм камери – 2,08 м3 [112].
МУ-25	Мікрофільтраційна установка	1	Мікрофільтраційна установка XL8, висота – 2300 мм, ширина – 1200 мм, довжина – 3300 мм; об'єм камери – 530 л [113]
УФ-26	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка SMT-500. Продуктивність 0,5 м3/год, робочий тиск 0,1-0,3 МПа та встановлення ультрафільтраційної касети з відсіканням 50 кДа. [114]
Р-27	Реактор для зберігання концентрату	1	Об'єм апарату – 400 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; висота – 1640 мм, діаметр – 1190. [106]
Н-28 Н-30 Н-32 Н-34 Н-38 Н-36	Насос відцентровий	6	Відцентровий насос Grundfos CR 1S-4 A-A-A-E-HQQE. Продуктивність 900 л/год. [115]
Р-29 Р-31	Реактор для приготування розчину гідроксиду натрію	2	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; висота – 1600 мм, діаметр – 950. [106]
ІК-33	Іонообмінна колонка	1	Іонообмінна колонка BPG 450/1000, максимальний об'єм заповнення 115 л, висота – 1900 мм, діаметр – 800 мм [116]
3-35 3-39 3-40	Збірник для зберігання елюату	3	Об'єм апарату – 100 л; матеріал – нержавіюча сталь 316L; виконаний на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.»; висота – 1550 мм, діаметр – 900. [106]

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ІК-37	Іонообмінна колонка	1	Іонообмінна колона BPG 100/500, максимальний об'єм заповнення 15 л, висота – 1270 мм, діаметр – 480 мм [116]
ВСШ-41	Вакуум-сушильна шафа	1	Вакуум-сушильна шафа СВ-30. Об'єм камери 33 л, ширина – 500 мм, висота – 600 мм, довжина – 697 мм [117]
Др-42	Дробарка для подрібнення	1	Дробарка лабораторна молоткова Perten Instruments LM 120 з діаметром отворів сита 0,5 мм, продуктивність 20 кг/год, висота – 545 мм, ширина – 460 мм, довжина – 240 мм [118]
ПС-43 ПС-47 ПС-49	Пересувна ємність для зберігання порошкоподібного лактоферину	3	Фармацевтичний бін, виготовлений на замовлення в «Agierre» [119]
Ф-44	Індивідуальний фільтр для класу чистоти С	1	Фільтр HEPA, з класом фільтрації H12, габарити 610*610*292 мм [120].
ГР-45	Гранулятор	1	Гранулятор модель GM-60, продуктивність 20 кг/год, кількість обертів – 46 об/хв, габарити 460*550*570 мм [121]
Р-46	Реактор-змішувач для змішування компонентів ЛЗ	1	Реактор-змішувач з номінальним об'ємом 100 л, з частотою обертання мішалки – 75 об/хв, довжина – 1000 мм, ширина – 930 мм, висота – 2800 мм [122].
Зм-48	Змішувач V-подібний	1	V-подібний змішувач V-200, об'ємом 200 л, з макимальним завантаженням 80 л з частотою обертання мішалки – 15 об/хв, довжина – 2000 мм, ширина – 850 мм, висота – 1460 мм [123].
АМН-50	Автоматична машина з наповнення капсул	1	Автоматична машина для наповнення капсул NJP 800, продуктивність 800 капсул/хв, габарити 1080*1240*1930 мм [124]
МПК-51	Машина для підрахунку капсул	1	Машина для підрахунку капсул на 8 смуг, потужність – 0,6 кВт, габарити 1200*1200*1400 мм [125]
АММ-52	Автоматична маркувальна машина	1	Автоматична Етикетувальна машина ALM-200, продуктивність 20-160 шт/хв [126]

РОЗДІЛ 8

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ (ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНЕ ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ОТРИМАННЯ ЛЗ)

Технологічна схема етапів післяферментаційного виділення і очищення субстанції та отримання лікарського засобу лактоферину включає як допоміжні роботи (підготовка вентиляційного повітря, підготовка води питної, підготовка води очищеної, приготування дезінфекційного засобу та приготування допоміжних розчинів) так і технологічний процес (зберігання культуральної рідини, видалення біомаси, доочищення фільтрату, виділення лактоферину, знесолення елюенту, сушіння, подрібнення, зберігання субстанції лактоферину, приготування лікарського засобу, фасування і маркування та знешкодження відходів). Технологічну схему отримання субстанції та подальше виробництво лікарського засобу лактоферину наведено в графічній частині проекту.

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1. Забір повітря

Забір атмосферного повітря відбувається за допомогою вентилятора (В-3) через повітрезабірник (ПЗ-1) який встановлено на даху будівлі (на висоті 15 м).

ДР 1.2. Попереднє очищення

При заборі атмосферного повітря воно проходить через фільтр грубого очищення (Ф-2), де відбувається видалення великих механічних часток бруду та пилу, після проходження фільтру ступінь очищення повітря становить – 90 %

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 8. Опис технологічної схеми (післяферментаційне виділення і очищення субстанції та отримання лз)	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Жолобка О.В.					79	111
Перевір.		Скроцька О.І.				Кафедра БТМ		
Консультант								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

ДР 1.3. Кондиціонування повітря

Після проходження фільтра грубого очищення, повітря направляється в систему кондиціонування HVAC (К-4), де поступово відбуваються наступні етапи: нагрів повітря до 200 °С, потім охолодження до 15 °С з краплевиділенням, підігрів з зволоженням парою, кінцеві показники повітря на виході з системи 34 °С та вологість 40 %.

ДР 1.4. Тонке очищення повітря

Повітря після проходження системи кондиціонування направляють на фільтр тонкої очистки (Ф-5), після проходження якого ступінь очищення повітря становить – 90 %.

ДР 1.5. Очищення повітря в індивідуальних фільтрах

Заключний етап очищення повітря це подача в індивідуальні фільтри які встановлені перед виробничим приміщенням, перед приміщеннями класу D встановлюється фільтр HEPA – H11 (Ф-6, Ф-17), а перед приміщеннями класу C фільтр HEPA – H12 (Ф-42), ступінь очищення повітря становить 95 та 99,5 %, відповідно.

ДР 2. Підготовка води питної

ДР 2.1. Очищення водопровідної води

Водопровідну воду направляють на мікрофільтраційну установку (МФ-7), в модулі якої відбувається поділ розчину з діаметром пор 0,22 мкм за 0,5 МПа. Профільтровану воду, для кращого очищення направляють на ультрафільтраційну установку (УФ-8), в модулі якої відбувається поділ розчину з відсіканням молекулярної маси 10 кДа при тиску 0,5 МПа. Отриману воду спрямовують у збірники (З-9), для подальшого використання на виробництві.

ДР 3. Підготовка води очищеної

ДР 3.1. Пом'якшення води

Питну воду з збірника направляють в іонообмінну колону (ІК-10), яка заповнена сильнокислотним катіонітом SR1L-Na, для видалення катіонів кальцію та натрію, та в подальшому воду направляють на другу іонообмінну

колону (ІК-12), яка заповнена сильноосновним аніоном А520Е-СІ, для видалення нітратів.

ДР 3.2. Демінералізація води

Після проходження іонообмінних колон воду направляють в установку зворотного осмосу (УЗО-14) де відбувається очищення води від речовин розміром більше 0,1 кДа при тиску 0,6 МПа, отриманий пермеат направляють на подальші стадії очищення води.

ДР 3.3. Електродеіонізація води

Отриманий пермеат після зворотного осмосу подають в установку електродеіонізації (УЕД-15), заповненої аніоно- катіонообмінними смолами, після очищення воду направляють в збірник (З-16), де відбувається перевірка на відповідність чистоті та подальше зберігання.

ДР 4. Приготування дезінфекційних засобів

ДР 4.1. Приготування дезінфекційного засобу «ДЕЗОлайт»

В збірник (З-18) об'ємом 25 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-19) вносять 9,95 л води очищеної (від ДР 3.3), вносять 50 мл раніше купленого розчину «ДЕЗОлайт» та вмикають перемішувач (50 об/хв), приготування розчину відбувається при кімнатній температурі. Після перемішування розчин зберігають в збірнику не більше 28 днів, з моменту приготування [127].

ДР 4.2. Приготування дезінфекційного засобу «КлінДез 401»

В збірник (З-20) об'ємом 25 л за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-21) вносять 9,9 л води очищеної (від ДР 3.3), вносять 180 мл раніше купленого розчину «КлінДез 401» та вмикають перемішувач (50 об/хв), приготування розчину відбувається при кімнатній температурі. Після перемішування розчин зберігають в збірнику не більше 3 днів, з моменту приготування [128].

ДР 5. Приготування допоміжних розчинів

ДР 5.1. Приготування 1 М натрію гідроксиду

Для підкислення елюату перед іонообмінним виділення необхідно збільшити рівень рН до нейтрально, тому слід приготувати 50 мл 1 М розчин гідроксиду натрію. На технічних вагах формують наважку кристалічного гідроксиду натрію масою 2 г та поміщають в колбу об'ємом 100 мл та вносять 50 мл питної води. Отриманий розчин перемішують до повного розчинення компонента та подають на стадію іонообмінного виділення (до ТП 9.1).

ДР 5.2. Приготування 0,27 М натрію хлориду

Для десорбції непотрібних білків з смоли перед десорбцією лактоферину використовують 64 л 0,27 М розчин натрію хлориду, для приготування даного розчину на технічних вагах формують наважку хлориду натрію масою 1 кг. Отриману наважку завантажують в реактор об'ємом 100 л (Р-29) та вносять 63 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для повного розчинення солі. Після приготування розчину, його зберігають до використання на стадії іонообмінного виділення (до ТП 9.1).

ДР 5.3. Приготування 0,85 М натрію хлориду

Для десорбції лактоферину з смоли використовують 64 л 0,85 М розчин натрію хлориду, для приготування даного розчину на технічних вагах формують наважку хлориду натрію масою 3,2 кг. Отриману наважку завантажують в реактор об'ємом 100 л (Р-31) та вносять 60,8 л води питної, вмикають перемішуючий пристрій (50 об/хв) для повного розчинення солі. Після приготування розчину, його зберігають до використання на стадії іонообмінного виділення (до ТП 9.1).

ТП 6. Зберігання культуральної рідини

ТП 6.1. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину після виробничого біосинтезу за допомогою перистальтичного насоса подають в реактор-змішувач (Р-22) об'ємом 1 м³, де відбувається зберігання при температурі 20 °С до початку стадій виділення та очищення.

ТП 7. Видалення біомаси

ТП 7.1. Фільтрування КР

Культуральну рідину (від ТП 6.1) за допомогою відцентрового насосу (Н-23) подають до фільтр-преса (ФП-24). Процес проводять за 0,4 МПа. Профільтрований розчин надходить до наступної стадії виділення, біомасу направляють на знешкодження.

ТП 7.2. Мікрофільтрація

Фільтрат (від ТП 7.1) подається на мікрофільтраційну установку (МФП-25). В модулі мікрофільтраційної установки відбувається поділ розчину з діаметром пор 0,22 мкм за 0,5 МПа. Отриманий пермеат подається на наступну стадію виділення.

ТП 8. Доочищення фільтрату

ТП 8.1. Ультрафільтрація

Пермеат (від ТП 7.2) подається на ультрафільтраційну установку (УФ-26), для доочищення від високомолекулярних білків, які наявні в розчині. В модулі ультрафільтраційної установки відбувається поділ розчину з відсіканням молекулярної маси 50 кДа при 0,1-0,15 МПа. Отриманий концентрат надходить в реактор (Р-27) де відбувається зберігання до використання в наступному етапі.

ТП 9. Виділення лактоферину

ТП 9.1. Іонообмінна екстракція лактоферину

В іонообмінну колону (ІК-33), вносять 16 л слабокислої катіонообмінної смоли CM Sepharose Fast Flow. До концентрату (від ТП 8.1) в реактор (Р-27) вносять 0,05 л 1 М NaOH (від ДР 5.1) для збільшення рівня рН до 6,8. Після врегулювання рівня рН розчин в кількості 163,1 л за допомогою насоса (Н-28) подають в іонообмінну колону (що дорівнює швидкості 10 л концентрату на 1 л смоли за годину). Після завантаження концентрату в колону, відбувається промивання смоли водою очищеною, вода в кількості 64 л (4 л водін на 1 л смоли) подається до колони. Потім до іонообмінної колони з реактора (Р-29) насосом (Н-30) подають 64 л 0,27 М NaCl (від ДР 5.2) для елюювання слабо зв'язаних зайвих білків, після десорбції зайвих компонентів відбувається елюювання за допомогою 0,85 М NaCl (від ДР 5.3) з реактора (Р-31) за

допомогою насосу (Н-32), для десорбції лактоферину з смоли (що дорівнює швидкості 4 л елюенту на 1 л смоли за годину).

Отриманий елюат подають в збірник об'ємом 100 л (З-35), з якого відбувається подача на наступну стадію очищення.

ТП 10. Знесолення елюату

ТП 10.1. Ексклюзійна хроматографія

В іонообмінну колону (ІК-37), вносять 1,63 кг Sephadex G-25 та додають 10 л води очищеної, після розбухання смоли в колону за допомогою насоса (Н-36) вносять 3 л елюату з збірника (З-35) (від ТП 9.1), та поступово подають воду очищену в двократному об'ємі. На виході з колонки розчин поступає в збірник об'ємом 200 л (З-40), коли іонний датчик натрію хлориду показує наявність солі розчин починають подавати в збірник об'ємом 100 л (З-39). Знесолення одного завантаження відбувається протягом 15 хв. Після знесолення всього елюату отриманий розчин з збірника подають на наступну стадію.

ТП 10.2. Концентрування знесолоного розчину

Знесолений розчин (від ТП 10.1) з збірника (З-40) подається на ультрафільтраційну установку (УФ-26), для концентрування в 4 рази. В модулі ультрафільтраційної установки відбувається поділ розчину з відсіканням молекулярної маси 50 кДа при 0,1-0,15 МПа. Після концентрування розчин направляють в збірник (З-40), де відбувається зберігання до використання на наступній стадії

ТП 11. Сушіння

ТП 11.1. Сушіння концентрату

Одержаний концентрат (від ТП 10.2) сушать у вакуум-сушарці (ВСШ-41). Сушіння відбувається за температури 70 °С до вмісту води 0,5 %. В результаті отримують висушений порошок лактоферину, який відправляють на подальше подрібнення.

ТП 12. Подрібнення

ТП 12.1. Подрібнення лактоферину

Висушений порошок (від ТП 11.2) подрібнюють на молотковій дробарці (Др-42). Після подрібнення порошок просіюють на ситі з отворами 150 мкм, вивантажують на пересувну ємність і відправляють на наступну стадію.

ТП 13. Зберігання субстанції

ТП 13.1. Зберігання субстанції лактоферину

Для зберігання лактоферину його поміщають в пересувну ємність об'ємом 2 л (ПЄ-43), відбирають проби для проведення контролю. Після відбору проб ємність закривають кришкою та наносять маркування з датою виробництва. Після проходження тестувань, якщо отримана субстанція відповідає необхідним показникам її направляють на склад де зберігають до стадій виробництва лікарського засобу

ТП 14. Приготування лікарського засобу

ТП 14.1. Приготування лактоферину покритого плівкою

На технічних вагах формують наважку очищеного лактоферину масою 6,32 кг (наважка сформована з 5 послідовних циклів отримання субстанції), та поміщають в гранулятор (ГР-45), та додають 0,316 кг пальмової олії, після сухого гранулювання, компоненти поміщають в реактор-змішувач об'ємом 100 л (Р-46), та подають в сорочку реактора глуху пару для досягнення температури 70 °С. Після 20 хв нагрівання, отриману суміш охолоджують до моменту застигання пальмової олії. Після охолодження лактоферин поміщають в пересувну ємність (ПЄ-47), яку направляють на наступну стадію.

ТП 14.2. Отримання суміші для капсулювання

В V-подібний змішувач об'ємом 200 л (Зм-48) з пересувної ємності (ПЄ-47) вносять лактоферин та поміщають наважки мікрокристалічної целюлози масою 66,2 кг та натрійкарбоксиметилцелюлози масою 3,31 кг сформовані за допомогою технічних ваг. Після внесення компонентів, вмикають перемішувач (15 об/хв), для рівномірного розподілу компонентів, після змішування суміш поміщають в бін (ПЄ-49), бін закривають та маркують датою змішування.

ТП 14.3. Капсулювання

Бін з об'єднаними компонентами (від ТП 14.2) переміщують до приміщення де відбувається капсулювання препарату, бін встановлюється над автоматичною машиною для наповнення капсул (АМН-50) в яку порошок поступово надходить в процесі капсулювання. Продуктивність 800 капсул/хв, наповнені капсули подаються на наступну стадію.

ПМВ 15. Фасування і маркування

ПМВ 15.1. Фасування в первинну упаковку

Наповнені капсули (від ТП 14.3) по конвеєрній стрічці поступають в машину для підрахунку капсул (МПК-51), яка відраховує задане значення капсул (60) та поміщає їх в первинну упаковку (банку), яка далі рухається по стрічці конвеєру, під час якого банка закривається кришкою.

ПМВ 15.2. Фасування в вторинну упаковку

Отримана банка з капсулами проходить по стрічці конвеєру та маркується за допомогою автоматичної маркувальної машини (АММ-52), після маркування банки направляються далі по стрічці та поміщаються в картонні коробки. Після повного заповнення картонної коробки банками, її закривають та наносять маркування, з назвою продукту номером серії та часом виготовлення. Закриті картонні коробки направляють на склад для карантинного зберігання.

ЗВ 16. Знешкодження відходів

ЗВ 16.1. Знешкодження рідких відходів

Пермеат (від ТП 8.1) та промивна вода (від ТП 9.1) утилізують, направляючи на очисні споруди.

ЗВ 16.2. Знешкодження твердих відходів

Біомаса яка залишається після фільтрування культуральної рідини (від ТП 7.1) та осад (від ТП 7.2) направляється на утилізацію.

РОЗДІЛ 9

ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД

Наведена нижче інформація ґрунтується на описі препаратів [129] і [130].

Склад

діюча речовина: лактоферин – 100 мг;

допоміжні речовини:

- мікрокристалічної целюлози;
- натрійкарбоксиметилцелюлози.

Форма випуску

Тверді желатинові капсули, вкриті кишковорозчинною оболонкою; 60 капсул у банці.

Властивості

Лактоферин (залізовмісний білок) є вкрай важливим елементом вродженого імунітету кожного з нас. Ще з перших днів життя ми отримуємо його з молозива та грудного молока. Також він міститься в слині, слюзах, лейкоцитах, крові, підшлунковій залозі, слизі стравоходу, шлунка, бронхів і кишківника. Ця речовина володіє потужними протимікробними, протигрибковими, противірусними та протипухлинними властивостями. Зв'язуючись із вірусними та інфекційними частинками, блокує їх потрапляння в клітини. Зменшує активність заліза, виявляючи свої антиоксидантні властивості. Бере участь у синтезі білків ДНК, допомагаючи побудові нових клітин.

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. Опис лікарського засобу згідно АНД				Літ.	Арк.	Аркушів		
Розроб.		Жолобка О.В.									87	111	
Перевір.		Скροцька О.І.							Кафедра БТМ				
Консультант													
Н. Контр.													
Затверд.		Стабніков В.П.											

Рекомендації щодо застосування

Препарат рекомендується застосовувати за:

- дефіциту заліза і фолієвої кислоти, залізодефіцитної анемії у вагітних, підвищеної потреби в залізі (вагітність, лактація, період інтенсивного росту і статевого дозрівання, особливо у дівчаток);
- недостатнього надходження заліза разом з їжею або порушення його всмоктування.

Спосіб застосування

Рекомендується вживати дорослим і дітям старше 12 років по 1 капсулі двічі на день під час їжі. Не слід перевищувати рекомендовану добову норму. Перед застосуванням необхідно проконсультуватися з лікарем.

Протипоказання

Індивідуальна непереносимість окремих компонентів продукту.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами

Дослідження щодо взаємодії з іншими лікарськими засобами не проводилися.

Застереження

У період вагітності або годування груддю препарат слід застосовувати тільки за рекомендацією лікаря.

Термін придатності

2 роки з дати виготовлення.

Умови зберігання

Зберігати в упаковці виробника, в сухому, захищеному від світла місці за температури не вище 25 °С.

Не є лікарським засобом.

Показники якості препарату та методики їх контролю наведено в таблиці 11.1 згідно з ДФУ:

Контроль якості капсул лактоферину

Показник якості	Нормативне значення	Методика контролю
Опис	Тверді капсули білого кольору. Вміст капсул: порошок білого кольору.	За п. 1 АНД, візуально
Ідентифікація	Час утримання розчину зразка має відповідати часу утримання <i>стандартного розчину</i> , що використовується у випробуванні Кількісне визначення .	За п. 2 АНД
Кількісне визначення	Вміст лактоферину має бути в межах 90–110 % від номінального	За п. 3 АНД
Однорідність маси для одиниці дозованого препарату	Не більше двох індивідуальних мас капсул відхиляються від середньої маси більш, ніж на 10 %; жодна індивідуальна маса не має відхилятися від середньої маси на більш, ніж 20 %	За п. 4 АНД, ДФУ 2.9.5
Розпадання	Перші 6 капсул повинні повністю розпастися за 20 хв, або загалом 16 із 18 капсул повинні розпастися	За п. 5 АНД, ДФУ 2.9.1
Мікробіологічна чистота	Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 10^2 КУО/г; загальне число дріжджів і цвілевих грибів: не більше 10^1 КУО/г; відсутність <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> і <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	За п. 6 АНД, згідно з ДФУ 2.6.12, 2.6.13

1. Опис. Тверді капсули білого кольору. Вміст капсул: порошок білого кольору. Визначають візуально.

2. Ідентифікація. Ідентифікацію лактоферину здійснюють за часом утримання розчину зразка, який має відповідати часу утримання *стандартного розчину*, що використовується у випробуванні **Кількісне визначення**.

3. Кількісне визначення. Визначення здійснюють методом зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії [131]. Необхідні для аналізу складові:

Рухлива фаза: розчин 0,1 % трифторооцтової кислоти у суміші води з ацетонітрилом (95:5 об/об) – рухлива фаза А, розчин 0,1 % трифторооцтової кислоти у суміші води з ацетонітрилом (5:95 об/об) – рухлива фаза Б.

Стандартний розчин: розчин стандартного зразка (*Lactoferrin (from bovine milk)* [91]) з концентрацією лактоферину 50 мкг/мл. Процес приготування розчину: 2 мг лактоферину вносять у мірну колбу об'ємом 10 мл, додають 5 мл води очищеної, суміш перемішують до розчинення. Далі об'єм розчину доводять до мітки водою очищеною, відбирають аліквоту об'ємом 0,25 мл у градуйовану пробірку, після чого об'єм розчину доводять до 1 мл додаванням розчину рухливої фази А.

Випробовуваний розчин: розчин випробовуваного зразка з концентрацією лактоферину 50 мкг/мл. Вміст однієї капсули вносять у мірну колбу об'ємом 500 мл, додають 250 мл води очищеної, суміш перемішують до розчинення. Далі об'єм розчину доводять до мітки водою очищеною, відбирають аліквоту об'ємом 12,5 мл у мірну колбу об'ємом 50 мл, після чого об'єм розчину доводять до мітки додаванням розчину рухливої фази А.

Колонка: Jupiter 5u C₁₈ 300R (250*4,6 мм) зі стаціонарною фазою C₁₈ (5 мкм).

Умови проведення аналізу: швидкість руху елюента – 0,5 мл/хв, температура в колонці – 37 °С, об'єм інжекції – 50 мкл. Елюювання здійснювали так: перша хвилина – елюювання з використанням 35 %-го розчину рухливої фази Б, наступні 19 хв – 60 %-м розчином рухливої фази Б.

Детектор: УФ-детектор G1315B (210 нм).

Вміст лактоферину повинен перебувати в межах 90,0–110,0 % від номінального значення.

4. Однорідність маси для одиниці дозованого препарату (ДФУ 2.9.5)

Відбирають 20 капсул, зважують кожну окремо і розраховують середню масу. Препарат витримав випробування, якщо не більше двох індивідуальних мас відхиляються від середньої маси більш, ніж 10 %. При цьому жодна індивідуальна маса не має відхилитися від середньої маси на більш, ніж 20 %.

5. Розпадання (ДФУ 2.9.1)

Визначення розпадання капсул проводять на лабораторному ідентифікаторі процесу розпадання. Загалом для досліду відбирають 18 капсул, поміщують по одній в кожну трубку приладу, прикріплюють до верхнього диска сітку із нержавіючої сталі з розміром отворів 2 мм і поміщають у посудину з водою за температури $37\pm 2^{\circ}\text{C}$. Вмикають прилад і проводять визначення упродовж 20 хв. Всі капсули повинні повністю розпастися. Вважають, що зразки розпалися, якщо на сітці: немає залишку; є залишок, який складається з м'якої маси, що не має відчутно твердого ядра, яке не змочується; є лише фрагменти оболонки, які прилипили до нижньої поверхні диска. Якщо з перших 6 протестованих капсул не всі повністю розпалися, випробування продовжують на 12 капсулах, що залишилися. Не менше, ніж 16 із 18 капсул повинні розпастися повністю.

6. Мікробіологічна чистота (ДФУ 2.6.12, ДФУ 2.6.13)

Контролюється загальне число аеробних мікроорганізмів, загальне число дріжджів і цвілевих грибів, відсутність *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*. Зразок лікарського засобу у кількості 10 г (100 капсул) поміщають у флакон місткістю 250 мл, доводять до 100 мл (розведення 1:10) буферним розчином з натрієм хлоридом і пептоном (рН 7,0) та перемішують до розчинення. Для визначення загального числа аеробних мікроорганізмів по 1 мл розчину висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №1 методом двошарового висівання. Для визначення загального числа дріжджів і цвілевих грибів по 1 мл зависі висівають не менш, ніж на дві чашки Петрі з густим поживним середовищем №2 методом двошарового висівання. Посіви на середовищі №1 інкубують за 30–35 °С, а посіви з середовищем №2 – за 20–25 °С протягом 5 діб, якщо

вірогідні результати не будуть отримані за короткий час. Для виявлення окремих видів мікроорганізмів по 10 мл розчину вносять у рідкі поживні середовища: №3 (для росту *Escherichia coli*) та №8 (для росту *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*). Посіви інкубують за 30–35 °С протягом 18–24 год, після чого роблять пересіви з середовища №3 на густі середовища №4 та №5, а з середовища №8 – на середовища №9 та №10. Посіви інкубують за 35–37 °С протягом 24–48 год. За наявності росту мікроорганізмів проводять їх ідентифікацію згідно з вимогами ДФУ 2.6.13. Загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів не має перевищувати 10^2 КУО/г, загальне число дріжджів і цвілевих грибів має бути не більше 10^1 КУО/г; у препараті не повинно бути *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*.

Пропис необхідних для аналізу поживних середовищ:

Густе поживне середовище №1 (м'ясо-пептонний агар)

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— натрію хлорид	5,0 г
— глюкоза	1,0 г
— агар мікробіологічний	13,0 г
— м'ясна вода (1:2)	1000 мл

рН після стерилізації 7,1 – 7,5

Густе поживне середовище №2 (агар Сабуро)

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— глюкоза	40,0 г
— агар мікробіологічний	13,0 г
— вода очищена	1000 мл

рН після стерилізації 5,4 – 5,8

Рідке поживне середовище №3 (середовище збагачення для бактерій род. Enterobacteriaceae)

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— динатрію гідрофосфат	7,5 г
— калію дигідрофосфат	2,5 г

— глюкоза	10,0 г
— феноловий червоний*	0,08 г
— малахітовий зелений**	0,015 г
— м'ясна вода (1:2)	1000 мл

pH після стерилізації 7,1 – 7,5

*Феноловий червоний (1%-ий розчин):

• Фенолового червоного	1 г
• Розчину гідроксиду натрію 0,1М	28,2 мл
• Води дистильованої	до 100 мл

**Малахітовий зелений (0,5%-ий розчин):

• Малахітового зеленого	0,5 г
• Води дистильованої	до 100 мл

Густе поживне середовище №4 (агар Ендо)

— поживний агар сухий	26,5 г
— ЕКДА	1,22 г
— динатрію гідрофосфат	0,48 г
— натрію сульфат безводний	0,83 г
— натрію карбонат	0,03 г
— лактоза	10,7 г
— фуксин основний	0,23 г
— вода очищена	1000 мл

pH після стерилізації 7,1 – 7,5

Густе поживне середовище №5 (вісмутсульфат агар)

— панкреатичний гідролізат м'яса	10,1 г
— динатрію гідрофосфат безводний	3,68 г
— натрію хлорид	2,6 г
— натрію карбонат	0,65 г
— вісмуту цитрат	2,38 г
— заліза (II) амонію сульфат	0,97 г

— D-глюкоза	3,9 г
— агар мікробіологічний	15,0 г
— діамантовий зелений	0,028 г
— вода очищена	до 1000 мл

рН після стерилізації 7,4 – 7,8

*Рідке поживне середовище №8 (для вирощування *Pseudomonas aeruginosa* і *Staphylococcus aureus*)*

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— натрію хлорид	5,0 г
— дикалію гідрофосфат	2,5 г
— вода очищена	1000 мл

рН після стерилізації 7,1 – 7,5

Густе поживне середовище №9 (для виявлення пігменту піоціаніну)

— пептон ферментативний сухий	20,0 г
— магнію хлорид безводний	1,4 г
— калію сульфат безводний	10,0 г
— гліцерин	10,0 г
— агар мікробіологічний	15,0 г
— вода очищена	1000 мл

рН після стерилізації 7,0 – 7,4

*Густе поживне середовище №10 (для ідентифікації *Staphylococcus aureus*)*

— пептон ферментативний сухий	10,0 г
— натрію хлорид	75,0 г
— маніт	10,0 г
— феноловий червоний	0,025 г
— агар мікробіологічний	15,0 г
— вода очищена	1000 мл

рН після стерилізації 7,2 – 7,6

ВИСНОВКИ

Під час огляду сучасної літери яка присвячено отриманню рекомбінантних лактоферинів мікробного походження було визначено, що нині в якості продуцентів найчастіше використовують мікроорганізми родів *Escherichia*, *Pichia* та *Lactococcus*, серед даних представників вчені надають перевагу вивченню експресії лактоферину в *Escherichia coli*, через добре вивчену генетику даного мікроорганізму, доступність векторних еспресійних систем і штамів господарів.

Так само у процесі огляду літератури було розглянуто властивості рекомбінантних лактоферинів, а саме найбільшу увагу було приділено огляду антимікробних та протипухлинних властивостей. В результаті з оглянутих статей можна дійти висновку, що використання лактоферину в якості антимікробного засобу можливе лише в комбінації з іншими антимікробними препаратами для боротьби проти резистентних штамів, так як лактоферин в поєднанні з іншими антибіотиками відновлює ефективність антибіотиків по відношенню до резистентних штамів. Лактоферин може виступати гарним протипухлинним засобом, особливо при лікуванні раку молочної залози та лейкоїї, але через малу кількість досліджень нині його не використовують в клінічній практиці.

Під час огляду можливих сфер застосування лактоферину, було визначено цільове застосування даної речовини, а саме використання лактоферину для лікування залізодефіцитної анемії у вагітних жінок, через велику кількість клінічних дослідів присвячених даному використанню, та демонстрацію кращих кінцевих результатів в порівнянні з лікуванням стандартними клінічними препаратами, як для жінки, так і для новонароджених. Заразом було визначено річну потребу субстанції яка складає приблизно 108 кг лактоферину в рік.

					НУХТ БТЕК 02.02.05 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата					
Розроб.		Жолобка О.В.			ВИСНОВКИ		Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Скроцька О.І.						95	111
Консультант							Кафедра БТМ		
Н. Контр.									
Затверд.		Стабніков В.П.							

На основі даних літературного огляду було обрано декілька перспективних продуцентів лактоферину, серед яких було визначено оптимального біологічного агента для біотехнологічного синтезу, а саме *Escherichia coli* BL21(DE3)/mpET28a+*-ltf*, через найменшу умовну вартість 1 г лактоферину (5,011 грн/г) та найбільшу кількість синтезованого лактоферину за годину (0,09 г/год). Даний продуцент синтезує 2,9 г лактоферину впродовж 32 год культивування, при рості на поживному середовищі з глюкозою, дріжджовим екстрактом та триптоном.

Розглянувши сучасні методи виділення та очищення субстанції лактоферину, було обрано метод, який складається з наступних послідовних етапів: видалення біомаси, доочищення фільтрату, іонообмінне виділення лактоферину, знесолення елюату, сушіння, подрібнення та зберігання. Даний метод був обраний, через найбільший показник чистоти отриманого продукту (майже 97 %) з врахування основних фізико-хімічних властивостей лактоферину.

Після отримання готової субстанції було розглянуто можливі форми випуску лікарського засобу та зважаючи на цільове призначення було обрано тверду лікарську форму, а саме капсули.

На основі обраних технологій отримання субстанції та лікарського засобу було розроблено технологічну та апаратурну схему отримання лікарського засобу, яка включає в себе стадії від зберігання культуральної рідини після ферментаційного синтезу до зберігання фасованого та маркованого готового до реалізації лікарського засобу.

Список використаної літератури

1. Hao L., Shan Q. Lactoferrin: major physiological functions and applications. *Current Protein & Peptide Science*. 2018, 20: 139-144. doi:10.2174/138920371966618051415
2. Vogel H. J. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochemistry and Cell Biology*. 2012, 90(3): 233–244. doi:10.1139/o2012-016
3. Redwan E.M.; Uversky, V.N. Potential lactoferrin activity against pathogenic viruses. *C. R. Biol.* 2014, 337: 581-595
4. Giansanti F., Panella, G. Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*. 2016, 9(4) : 61. doi:10.3390/ph9040061
5. Baker H. M., Baker E. N. Lactoferrin and Iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals*. 2004, 17(3): 209–216. doi:10.1023/b:biom.0000027694.402
6. Suzuki Y. A., Lopez V. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005, 62(22): 2560–2575. doi:10.1007/s00018-005-5371-1
7. Rosa L., Cutone A., Lepanto. Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, 18(9): 1985. doi:10.3390/ijms18091985
8. Chahardooli M., Niazi A., Aram F. & Sohrabi S. M. Expression of recombinant Arabian camel lactoferricin-related peptide in *Pichia pastoris* and its antimicrobial identification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015, 96(2): 569–575. doi:10.1002/jsfa.7125
9. Ciccaglione A. F., Di Giulio M., Di Lodovico S. Bovine lactoferrin enhances the efficacy of levofloxacin-based triple therapy as first-line treatment of *Helicobacter pylori* infection: an in vitro and in vivo study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019, 74(4): 1069–1077. doi:10.1093/jac/dky510
10. Fulgione A., Nocerino N., Iannaccone M. Lactoferrin Adsorbed onto Biomimetic Hydroxyapatite Nanocrystals Controlling - In Vivo - the *Helicobacter*

pylori Infection. *Plos One*. 2016, 11(7): e0158646.
doi:10.1371/journal.pone.0158646

11. Morici P., Florio W., Rizzato C., Ghelardi E. Synergistic activity of synthetic N-terminal peptide of human lactoferrin in combination with various antibiotics against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017, 36(10): 1739–1748.
doi:10.1007/s10096-017-2987-7

12. Chen R., Cole N., Dutta D. Antimicrobial activity of immobilized lactoferrin and lactoferricin. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2016, 105(8): 2612–2617. doi:10.1002/jbm.b.33804

13. Fernandes K. E., Weeks K., & Carter D. A. Lactoferrin is broadly active against yeasts and highly synergistic with amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020, 64(5): e02284-19. doi:10.1128/aac.02284-19

14. Iglesias-Figueroa B. F., Siqueiros-Cendón T. S. Recombinant human lactoferrin induces apoptosis, disruption of F-actin structure and cell cycle arrest with selective cytotoxicity on human triple negative breast cancer cells. *Apoptosis*. 2019, 24(7-8): 562-577. doi:10.1007/s10495-019-01539-7

15. Duarte D. C., Nicolau A., Teixeira J. A. The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. *Journal of Dairy Science*. 2011, 94(1): 66–76. doi:10.3168/jds.2010-3629

16. Iigo M., Alexander D., Long N., Xu, J., F. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. *Biochimie*. 2009, 91(1): 86–101. doi:10.1016/j.biochi.2008.06.012

17. Furmanski P. Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. *Journal of Experimental Medicine*. 1989, 170(2): 415–429. doi:10.1084/jem.170.2.415

18. Hoedt E., Hardiville S., Mariller C. Discrimination and evaluation of lactoferrin and delta-lactoferrin gene expression levels in cancer cells and under inflammatory stimuli using TaqMan real-time PCR. *Biometals*. 2010, 23: 441–452

doi: 10.1007/s10534-010-9305-5

19. Indrayanto G., Putra G. S., & Suhud, F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 2021, 46: 273-307.

doi:10.1016/bs.podrm.2020.07.005

20. Amitay E.L., Keinan-Boker L. Breastfeeding and Childhood Leukemia Incidence. *JAMA Pediatrics*. 2015, 169(6): e151025.

doi:10.1001/jamapediatrics.2015.1025

21. Arias M., Hilchie A. L., Haney E. F. Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides. *Biochemistry and Cell Biology*. 2017, 95(1), 91–98. doi:10.1139/bcb-2016-0175

22. Lee S.-H., Hwang H.-M. E2F1-directed activation of Bcl-2 is correlated with lactoferrin-induced apoptosis in Jurkat leukemia T lymphocytes. *BioMetals*. 2010, 23(3): 507–514. doi:10.1007/s10534-010-9341-1

23. Lu Y., Zhang T.-F., Shi Y., Zhou H.-W. PFR peptide, one of the antimicrobial peptides identified from the derivatives of lactoferrin, induces necrosis in leukemia cells. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). doi:10.1038/srep20823

24. Onishi J., Roy M. K., Juneja L. R. A lactoferrin-derived peptide with cationic residues concentrated in a region of its helical structure induces necrotic cell death in a leukemic cell line (HL-60). *Journal of Peptide Science*. 2008, 14(9): 1032–1038. doi:10.1002/psc.1039

25. Whitehead T. P., Metayer C., Wiemels J. L. Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2016, 46(10): 317–352. doi:10.1016/j.cppeds.2016.08.004

26. Электронный ресурс // [Режим доступа]: <https://web.archive.org/web/20140706152110/http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/leukemia/page2/AllPages>

27. Luzi C., Brisdelli F., Iorio R. Apoptotic effects of bovine apo-lactoferrin on HeLa tumor cells. *Cell Biochemistry and Function*. 2017, 35(1): 33–41. doi:10.1002/cbf.3242

28. Li H.-Y., Li M., Luo C. Lactoferrin Exerts Antitumor Effects by Inhibiting Angiogenesis in a HT29 Human Colon Tumor Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65(48): 10464–10472. doi:10.1021/acs.jafc.7b03390
29. Cooper C. A., Maga E. A. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Research*. 2015, 24(4): 605–614. doi:10.1007/s11248-015-9885-5
30. Yu H., Chen J., Sun W. The dominant expression of functional human lactoferrin in transgenic cloned goats using a hybrid lactoferrin expression construct. *Journal of Biotechnology*. 2012, 161(3): 198–205. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.035
31. Wang M., Sun Z. Large-scale production of recombinant human lactoferrin from high-expression, marker-free transgenic cloned cows. *Sci Rep*. 2017, 7: 10733. doi: 10.1038/s41598-017-11462-z
32. Semak I., Budzevich A. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin. *Transgenic Research*. 2019, 28: 465–478 doi:10.1007/s11248-019-00165-y
33. Stefanova G., Slavov S., Gecheff K., Vlahova M., Atanasov A. Expression of recombinant human lactoferrin in transgenic alfalfa plants. *Biologia Plantarum*. 2013, 57(3): 457–464. doi: 10.1007/s10535-013-0305-5
34. Pang X., Tong Y., Xue W., Yang Y.-F., Chen X. et al. Expression and characterization of recombinant human lactoferrin in edible alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2019, 83(5): 851–859. doi: 10.1080/09168451.2019.1569498
35. Chahardoli M., Fazeli A., Ghabooli M. Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2017, 123: 414–421. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.12.037

36. Koo J., Park D., Kim H. Expression of bovine lactoferrin N-lobe by the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013, 28(4): 379–387. doi: 10.4490/algae.2013.28.4.379
37. Wang J., Tian Z., Teng D. Cloning, expression and characterization of Kunming mice lactoferrin and its N-lobe. *BioMetals*. 2010, 23(3): 523–530. doi:10.1007/s10534-010-9294-4
38. Novoselovaa M., Prosekovic A. Technological options for the production of Lactoferrin. *Foods and Raw Materials*. 2016, 4(1): 90–101. doi: 10.21179/2308-4057-2016-1-90-101.
39. Kumari N., Kumar A. Evaluation of therapeutic potential of recombinant buffalo lactoferrin N-lobe expressed in *E. coli*. *Animal Biotechnology*. 2019, 1–7. doi:10.1080/10495398.2019.1570224.
40. Jin L., Zhang R.-Z. Improving Expression of Bovine Lactoferrin N-lobe by Promoter Optimization and Codon Engineering in *Bacillus subtilis* and its Antibacterial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019, 67: 9749–9756. doi:10.1021/acs.jafc.9b02350.
41. Shigemori S., Namai F. Genetically modified *Lactococcus lactis* producing a green fluorescent protein–bovine lactoferrin fusion protein suppresses proinflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Journal of Dairy Science*. 2017, 100(9): 7007–7015. doi:10.3168/jds.2017-12872.
42. Li J., Zhu W., Luo M. Molecular cloning, expression and purification of lactoferrin from Tibetan sheep mammary gland using a yeast expression system. *Protein Expression and Purification*. 2015, 109: 35–39. doi:10.1016/j.pep.2015.01.008.
43. Iglesias-Figueroa B., Valdiviezo-Godina N. High-Level Expression of Recombinant Bovine Lactoferrin in *Pichia pastoris* with Antimicrobial Activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17(6): 902. doi:10.3390/ijms17060902.

44. Sun J., Jiang J., Zhai X. Coexpression of Kex2 Endoproteinase and Hac1 Transcription Factor to Improve the Secretory Expression of Bovine Lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2019, 24: 934–94. doi:10.1007/s12257-019-0176-5.
45. Ho C. L., Hwang I. Y. Matrix-immobilized yeast for large-scale production of recombinant human lactoferrin. *MedChemComm*. 2015, 6(3): 486–491. doi:10.1039/c4md00537f.
46. Zhou H., Li X., Wang Z. Construction and characterization of thymidine auxotrophic (Δ thyA) recombinant *Lactobacillus casei* expressing bovine lactoferricin. *BMC Veterinary Research*. 2018, 14(1). doi:10.1186/s12917-018-1516-y
47. Feng X., Liu C., Guo J. Expression and Purification of an Antimicrobial Peptide, Bovine Lactoferricin Derivative LfcinB-W10 in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*. 2009, 60(3): 179–184. doi:10.1007/s00284-009-9522-8
48. Feng, X., Liu, C., Guo, J. Recombinant expression, purification, and antimicrobial activity of a novel hybrid antimicrobial peptide LFT33. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 95(5): 1191–1198. doi:10.1007/s00253-011-3816-z
49. Tang X.-S., Tang Z.-R., Wang S.-P., Feng Z.-M. Expression, Purification, and Antibacterial Activity of Bovine Lactoferrampin–Lactoferricin in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011, 166(3): 640–651. doi:10.1007/s12010-011-9455-0
50. Tang, X.-S., Shao, H., Li, T.-J. Dietary Supplementation with Bovine Lactoferrampin–Lactoferricin Produced by *Pichia pastoris* Fed-batch Fermentation Affects Intestinal Microflora in Weaned Piglets. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, 168(4): 887–898. doi:10.1007/s12010-012-9827-0
51. Xie W., Song L. A bovine lactoferricin-lactoferrampin-encoding *Lactobacillus reuteri* CO21 regulates the intestinal mucosal immunity and enhances the protection of piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 challenge. *Gut Microbes*. 2021 Jan-Dec;13(1):1956281. doi: 10.1080/19490976.2021.1956281

52. Song L., Qiao X., Zhao D., Xie W. Effects of *Lactococcus lactis* MG 1363 producing fusion proteins of bovine lactoferricin-lactoferrampin on growth, intestinal morphology and immune function in weaned piglet. *Journal of Applied Microbiology*. 2019. doi:10.1111/jam.14339
53. Song L., Xie W., Liu Z., Guo D. Oral delivery of a *Lactococcus lactis* strain secreting bovine lactoferricin–lactoferrampin alleviates the development of acute colitis in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. doi:10.1007/s00253-019-09898-6
54. Tanhaiean A., Azghandi M., Razmyar J. Recombinant production of a chimeric antimicrobial peptide in *E. coli* and assessment of its activity against some avian clinically isolated pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2018, 122: 73–78. doi:10.1016/j.micpath.2018.06.012
55. Levay P.F., Viljoen M. Lactoferrin: A general review. *Haematologica*. 1995, 80: 252-267.
56. Rastogi N., Singh A., Singh, P. K. Structure of iron saturated C-lobe of bovine lactoferrin at pH 6.8 indicates a weakening of iron coordination. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2016, 84(5): 591–599. doi:10.1002/prot.25004
57. Brock J. H. Lactoferrin – 50 years on. *Biochemistry and Cell Biology*. 2012, 90(3): 245–251. doi:10.1139/o2012-018
58. Mayeur S., Spahis S., Pouliot Y. Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016, 24(14): 813–836. doi:10.1089/ars.2015.6458
59. Ochoa T. J., Pezo A. Clinical studies of lactoferrin in children¹This article is part of a Special Issue entitled Lactoferrin and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*. 2012, 90(3): 457–467. doi:10.1139/o11-087
60. King J. C., Cummings G. E. A Double-Blind, Placebo-Controlled, Pilot Study of Bovine Lactoferrin Supplementation in Bottle-fed Infants. *Journal of*

Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2007, 44(2): 245–251. doi:10.1097/01.mpg.0000243435.54958.68

61. Ochoa T. J., Chea-Woo E. Impact of Lactoferrin Supplementation on Growth and Prevalence of *Giardia* Colonization in Children. *Clinical Infectious Diseases*. 2008, 46(12): 1881–1883. doi:10.1086/588476

62. Artym J., Zimecki M. Orally administered lactoferrin restores humoral immune response in immunocompromised mice. *Immunology Letters*. 2003, 89(1): 9–15. doi:10.1016/s0165-2478(03)00102-0

63. Yen C.-C., Shen C.-J., Hsu W.-H. Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against *Escherichia coli* infection. *BioMetals*. 2011, 24(4): 585–594. doi:10.1007/s10534-011-9423-8.

64. Ochoa T. J., Sizonenko S. V. Lactoferrin and prematurity: a promising milk protein? *Biochemistry and Cell Biology*. 2017, 95(1): 22–30. doi:10.1139/bcb-2016-0066

65. Ziegler E. E. Consumption of cow's milk as a cause of iron deficiency in infants and toddlers. *Nutrition Reviews*. 2011, 69: 37–42. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00431.x

66. Ke C., Lan Z., Hua L. Iron metabolism in infants: influence of bovine lactoferrin from iron-fortified formula. *Nutrition*. 2015, 31(2): 304–309. doi:10.1016/j.nut.2014.07.006

67. Anderberg RJ, Meek RL. Serum amyloid A and inflammation in diabetic kidney disease and podocytes. *Lab Invest*. 2015, 95: 250–62. doi: 10.1038/labinvest.2014.163

68. Brock JH. Lactoferrin—50 years on. *Biochem Cell Biol*. 2012, 90: 245–51. doi: 10.1139/o2012-018

69. Lepanto MS, Rosa L. Lactoferrin in aseptic and septic inflammation. *Molecules*. 2019, 24: 1323. doi: 10.3390/molecules24071323

70. Ganz T. Iron and infection. *Int J Hematol*. 2018, 107: 7–15. doi: 10.1007/s12185-017-2366-2

71. Kell DB, Pretorius E. No effects without causes. The iron dysregulation and dormant microbes hypothesis for chronic, inflammatory diseases: evidence and consequences. *Biol Rev.* 2018, 93: 1518–57. doi: 10.1111/brv.12407

72. Lepanto M. S., Rosa L. Efficacy of Lactoferrin Oral Administration in the Treatment of Anemia and Anemia of Inflammation in Pregnant and Non-pregnant Women: An Interventional Study. *Frontiers in Immunology.* 2018, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02123

73. Darwish A. M., Fouly H. A. Lactoferrin plus health education versus total dose infusion (TDI) of low-molecular weight (LMW) iron dextran for treating iron deficiency anemia (IDA) in pregnancy: a randomized controlled trial. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 2018, 1–7. doi:10.1080/14767058.2018.1429396

74. Paesano R., Pacifici E., Benedetti S. Safety and efficacy of lactoferrin versus ferrous sulphate in curing iron deficiency and iron deficiency anaemia in hereditary thrombophilia pregnant women: an interventional study. *BioMetals.* 2014, 27(5): 999–1006. doi:10.1007/s10534-014-9723-x

75. Paesano, R., Berlutti, F. Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron deficiency and iron deficiency anemia in pregnant women. *BioMetals.* 2010, 23(3): 411–417. doi:10.1007/s10534-010-9335-z

76. Рубан О.А. ПРАКТИКУМ З ПРОМИСЛОВОЇ ТЕХНОЛОГІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ СТУДЕНТІВ СПЕЦІАЛЬНОСТІ «ФАРМАЦІЯ». Харків: НФаУ, 2015. – 374 с. [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://ztl.nuph.edu.ua/pdf/PTLZ/Praktikum_PTLZ_ua.pdf

77. Чуєшов В. І., Хохлова Л. М. Технологія ліків промислового виробництва: Підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III—IV рівнів акредитації. Харків: Вид-во НФаУ, Золоті сторінки, 2003. — 720с.

78. Рубан О.А., Хохлова Л.М. Сучасні фармацевтичні технології навчальний посібник до лабораторних занять магістрантів денної, вечірньої та заочної форми навчання спеціальності 8.110201 “Фармація”. Харків: Вид-во

НФаУ, 2015. – 249 с. [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://ztl.nuph.edu.ua/pdf/SFT/Practicum_SFT_ua.pdf

79. Artym J., Zimecki M., Kruzel M. L. Lactoferrin for Prevention and Treatment of Anemia and Inflammation in Pregnant Women: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2021, 9(8): 898. doi: 10.3390/biomedicines9080898

80. Поводзинський В. М., Шибєцький В.Ю. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій для студентів спеціальності 133 “Галузеве машинобудування» спеціалізація «Обладнання фармацевтичних та біотехнологічних виробництв». Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251с.

81. Пакування та маркування готових лікарських засобів [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://tovaroved.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/06/GLZ.pdf>

82. Статистичні данні системи МОЗ [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://medstat.gov.ua/im/upload/2020z.zip>

83. Lu R. R., Xu S. Y., Wang Z. Isolation of lactoferrin from bovine colostrum by ultrafiltration coupled with strong cation exchange chromatography on a production scale. *Journal of Membrane Science*. 2007, 297(1-2): 152–161. doi:10.1016/j.memsci.2007.03.039

84. Silva Maciel K., Soares Santos L., Cristina Ferreira Bonomo R. Purification of lactoferrin from sweet whey using ultrafiltration followed by expanded bed chromatography. *Separation and Purification Technology*. 2020, 117324. doi:10.1016/j.seppur.2020.117324

85. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Expanded_Bed_Absorption/PHARMACI_P_IntroEBA.pdf

86. Wu M., Xu Y. Isolation and purification of lactoferrin and immunoglobulin G from bovine colostrum with serial cation-anion exchange chromatography. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009, 14(2): 155–160. doi:10.1007/s12257-008-0159-4

87. Hahn R., Schulz P., Schaupp C. Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998, 795(2): 277–287. doi:10.1016/s0021-9673(97)01030-3

88. Sephadex™ G-25 resins and preppacked formats [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.2771> https://www.scientificlabs.co.uk/handlers/libraryFiles.ashx?filename=Technical_Data_Sheets_2_28918006_B.pdf

89 . Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: PIPEГ, 2001. — 556 с.

90. Improved RP-HPLC method for determination of bovine lactoferrin and its proteolytic degradation in simulated gastrointestinal fluids [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.2771>

91. Lactoferrin (from bovine milk) [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/cerillian/l047>

92. БАГАТОПЛІДНА НАРОДЖУВАНІСТЬ В УКРАЇНІ: ДЕМОГРАФІЧНИЙ ВИМІР [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://www.dse.org.ua/arhcrive/43/3.pdf>

93. Державний реєстр дезінфекційних засобів 2021 рік [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://data.gov.ua/dataset/1dddc0e9-25d8-4b9a-aec6-d31a5af44437/resource/698b11a0-4e82-4053-b498-b94cbe6e4e81/download/2021-reiestr-dezzasobiv-1-331.xlsx>

94. СТАНДАРТ НАСТАНОВА ВИМОГИ ДО ВИГОТОВЛЕННЯ НЕСТЕРИЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ В УМОВАХ АПТЕК СТ-Н МОЗУ 42-4.5:2015 [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://law.liga.com.ua/b_text.php?type=3&id=855369&base=1

95. СТ-Н МОЗУ 42-3.7:2013 Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації [Електроний ресурс]. Режим доступу:

<https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-7-2013/>

96. EUDRAGIT® FUNCTIONAL POLYMERS FOR ORAL SOLID DOSAGE FORMS [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://healthcare.evonik.com/en/drugdelivery/oral-drug-delivery/oral-excipients/eudragit-portfolio>

97. Wu Q.-X., Zhang Q.-L. Characterization of novel lactoferrin loaded capsules prepared with polyelectrolyte complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, 455(1-2): 124–131. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.048

98. Pat. JPWO2005025609A1 Japanese. Lactoferrin material composition / 河野. Publ. 08.11.2007.

<https://patents.google.com/patent/JPWO2005025609A1/en?q=Lactoferrin+capsules&oq=Lactoferrin+capsules>

99. Панельні повітряні фільтри для грубого очищення [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/>

100. Промышленный вентилятор Soler&Palau Cheminair 600 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://vencon.ua/products/soler-palau-cheminair-600>

101. HVAC UNIT [Електроний ресурс]. Режим доступу: http://www.shenglin-tech.com/products/HVAC_Unit/848.html

102. Панельний фільтр тонкої очистки Jablotron F7 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/jablotron-f7-filter/>

103. HEPA фильтр 305*610*78 H11 ФяС [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/hepa-filtr-30561078-h11-fias>

104. Мікрофільтраційна установка на керамічних мембранах BTS-CMS-MF1 [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://bts.net.ua/ua/membrane_filter/membrane_system/m-krof-ltrac-yna-ustanovka-na-keram-chnikh-membranakh-bts-cms-mf1/

105. Установка ультрафильтрации на керамических мембранах [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://bts.net.ua/ua/membrane_filter/membrane_system/ustanovka-ultrafiltracii-na-keramicheskikh-membranakh/
106. Збірники сталіні емальовані [Електроний ресурс]. Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/sborniki_email_ua.php
107. YMC Pilot Glass Columns [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://ymc.eu/ymc-pilot-glass-columns.html>
108. Насос METABO P 2000 G [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://storgom.ua/product/tsentrobeznyy-nasos-metabo-p-2000-g.html>
109. Система зворотного осмосу Nerex KISSRO240-S (400 літрів/годину) [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p1243289769-sistema-obratnogo-osmosa.html?&primelead=My4yNQ>
110. Установка электродеионизации DOW EDI-310 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://aqua-life.ua/product/ustanovka-jelektrodeionizacii-edi-310/>
111. Дозатор води і рідин [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p370228267-dozator-vody-zhidkostej.html>
112. Промышленные фильтр-прессы ЧМ [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://www.npk-vu.com.ua/images/stories/Catalog2012.pdf>
113. Microflow XL Crossflow Microfiltration Systems [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://shop.pall.com/us/en/food-beverage/zidgxiypj51>
114. Automatic 500L Units EDI Pure Water Ultra filtration System For Industry [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Ultra-Filtration-System-Automatic-500L-Units_1600517915238.html?spm=a2700.7724857.normal_offer.d_title.45616b27QPRthW&s=p
115. насос Grundfos CR 1S-4 A-A-A-E-HQQE [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://hotline.ua/dacha_sad-nasosy-vodosnabzheniya/grundfos-cr-1s-4-a-a-a-e-hqqe-96515551/

116. BPG chromatography columns [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/columns/process-columns/bpg-chromatography-columns-p-05573#order>
117. Шафа сушильна вакуумна СВ-30 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://medservice.net.ua/ua/p1368929585-shafa-sushilna-vakuumna.html>
118. Молотковые мельницы Perten LM 120 и LM 3100 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://soctrade.ua/equipment/shop/perten-lm120-lm3100/>
119. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ЕМКОСТИ (БИНЫ) [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://www.agierre.eu/public/index.php?node=43&subpg=catalogo-prodotti-view&idntree=3&idprod=13&idlang=uk#>
120. НЕРА фильтр 610*610*292 Н12 ФяС [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/hepa-filtr-610610292-h12-fias>
121. Гранулятор фармацевтичний GM-60 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/p790024467-granulyator-farmatsevticheskij.html>
122. Апарати стальні емальовані з механічним змішуючим пристроєм [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://euromash.kiev.ua/ua/aparati_emal_mehanicheskim_perem_ustroystvom_ua.php
123. V-подібний міксер V-200 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://chumaki.in.ua/ua/p1334339167-podibnij-zmishuvach-200.html>
124. Автоматична машина для наповнення капсул NJP 800 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://ua.carmapharm.com/pharma-machines/capsule-filling-machine/njp-800-automatic-capsule-filling-machine.html>
125. Машина для підрахунку капсул на 8 смуг [Електроний ресурс]. Режим доступу: <http://ua.carmapharm.com/pharma-machines/capsule-counting-machine/8-lanes-capsule-counting-machine.html>

126. Автоматична Етикетувальна машина ALM-200 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://chumaki.in.ua/ua/p1142064604-avtomaticheskaya-etiketirovochnaya-mashina.html>

127. МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ із застосування засобу "ДЕЗОлайт" [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://storage.ua.prom.st/1168991_metodichka_dezolajt_10.02.15.pdf

128. КлінДез 401 Методичні вказівки [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://www.mpi-dpr.com.ua/content/24-klindez-401-metodichni-vkazivki>

129. Лактоферрин (Lactoferrin) 250 мг 60 капсул [Електроний ресурс]. Режим доступу: https://biovit.ua/laktoferrin/laktoferrin-lactoferrin-250-mg-60-kapsul?gclid=CjwKCAjwv4SaBhBPEiwA9YzZvA7Tdxzb0IycuTsdRrk0ODq6Wh eo3b9nSQiSdLlrU6bPKmZMgzPElxc0QavD_BwE

130. Активіт Залізо + лактоферрин табл. по 230 мг №20 [Електроний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%90%D0%BA%D1%82%D0%B8%D0%B2%D0%B8%D1%82-%D0%96%D0%B5%D0%BB%D0%B5%D0%B7%D0%BE-plus-%D0%BB%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%BE%D1%84%D0%B5%D1%80%D1%80%D0%B8%D0%BD/1024389/>

131. Yao X., Bunt C., Cornish J. Improved RP-HPLC method for determination of bovine lactoferrin and its proteolytic degradation in simulated gastrointestinal fluids. *Biomedical Chromatography*. 2012, 27(2): 197–202. doi:10.1002/bmc.2771