



# 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 2023 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

СОСНОВСЬКИЙ Максим Олександрович

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біотехнологічні особливості одержання ферментів мікробного походження для лікування злоякісних пухлин на прикладі L-метіонінази»

керівник роботи \_\_\_\_\_,  
( 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 Штам *Streptomyces sp.* DMMMН 60; продуктивність синтезу ферменту L-метіонінази 48 ОД/мл за 72 год.; 131 г ферменту на рік, для забезпечення лікування метіонін-залежних пухлин; вартість 1 л поживного середовища 1,637 грн.;

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) ВСТУП; РОЗДІЛ 1. Ферментні препарати для лікування пухлинних захворювань; РОЗДІЛ 2. Біотехнологічний підхід у оптимізації процесу одержання L-метіонінази; РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ L-МЕТІОНІНАЗИ; РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для лікарського засобу; РОЗДІЛ 5. Обґрунтування етапів виділення, очищення субстанції та отримання лікарського засобу; РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання; РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми; РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва субстанції для лікарського засобу; РОЗДІЛ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лз; РОЗДІЛ 10. Опис лікарського засобу згідно АНД;

5. Перелік графічного матеріалу

Апаратурна схема 1 лист А1, Технологічна схема 1 лист А1

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

### КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Ферментні препарати для лікування пухлинних захворювань	01.11.2023 - 13.11.2023.	
2	РОЗДІЛ 2. Біотехнологічний підхід у оптимізації процесу одержання l-метіонінази	01.11.2023 - 13.11.2023.	
3	РОЗДІЛ 3. Технологічні особливості одержання l-метіонінази	01.11.2023 - 13.11.2023.	
4	РОЗДІЛ 4. Техніко-економічне обґрунтування виробництва субстанції для лікарського засобу	13.11.2023 - 16.11.2023.	
5	РОЗДІЛ 5. Обґрунтування етапів виділення, очищення субстанції та отримання лікарського засобу	16.11.2023 - 22.11.2023.	
6	РОЗДІЛ 6. Специфікація обладнання	22.11.2023 - 25.11.2023.	
7	РОЗДІЛ 7. Опис технологічної схеми	25.11.2023 - 02.12.2023.	
8	РОЗДІЛ 8. Контроль виробництва субстанції для лікарського засобу	02.12.2023 – 10.12.2023.	
9	РОЗДІЛ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ	10.12.2023 - 23.12.2023.	
10	РОЗДІЛ 10. Опис лікарського засобу згідно АНД	23.12.2023 - 01.01.2024.	
11	Оформлення апаратурної та технологічної схеми	01.01.2024 - 10.01.2024.	
12	Оформлення вступу та реферату	10.01.2024 – 27.01.2024	

**Здобувач**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Максим СОСНОВСЬКИЙ**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

**Керівник роботи**

\_\_\_\_\_ (підпис)

**Вікторія КРАСІНЬКО**

\_\_\_\_\_ (ім'я та прізвище)

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробці науково обгрунтованої технології виробництва ін'єкційного протипухлинного лікарського засобу на основі ферменту мікробного походження – L-метіонінази, що отримується при культивуванні грампозитивного штаму бактерій *Streptomyces sp. DMMMН 60*, який продукує 48 ОД/мл за 72 години.

Запропонована технологія виробництва препарату передбачає обробку культуральної рідини центрифугуванням, осадженням ферменту амоній-сульфатом, діалізом, ультрафільтрацією та іонообмінною гелъ-хроматографією, що дозволяє зберегти 50% від початкового вмісту активності ферменту у культуральній рідині. Потужність виробництва становить 131 г сухого ферменту на рік у 163 750 л/рік, кількість трудоднів на рік складає 1842,1 л/цикл та 330 трудоднів.

Новизною роботи є розробка потужності виробництва ін'єкційного ферментного засобу якого не має на ринку та поза її межами, на основі літературних досліджень та статистики з онкології в Україні на 2022 рік.

Кваліфікаційна робота викладена на 90 сторінках друкованого тексту, містить 9 таблиць, 20 рисунків і складається зі вступу, десяти розділів, списку використаної літератури (62), графічної частини (2 креслення формату А1) та додатків.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РЕФЕРАТ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>		<i>Сосновський М.О.</i>					<i>3</i>	<i>90</i>
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>						
<i>Н. конто</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>						
						<i>Кафедра БТМ 3</i>		

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>РОЗДІЛ 1. ФЕРМЕНТНІ ПРЕПАРАТИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПУХЛИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ</b> .....	6
1.1. Мікробні ензими, що впливають на метаболізм амінокислот в ракових клітинах. ....	6
1.2. Властивості ферментних препаратів.....	11
1.3. Властивості L-метіонінази як ферменту протиракової дії.....	12
<b>РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД У ОПТИМІЗАЦІЇ ПРОЦЕСУ ОДЕРЖАННЯ L-МЕТІОНІНАЗИ</b> .....	16
2.1. Джерела L-метіонінази.....	21
2.2. Особливості L-метіонінази та процесу її біосинтезу.....	20
2.3. Перспективи в оптимізації процесу одержання ферменту L-метіонінази.....	22
<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ L-МЕТІОНІНАЗИ</b> .....	25
3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та умов культивування..	25
3.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента.....	31
3.3. Таксономічний статус біологічного агента.....	31
3.4. Вибір післяферментаційних стадій виділення та очищення метіонінази.....	32
3.5. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу.....	35
<b>РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</b> .....	37
4.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ на основі обраної субстанції, галузей використання, потреби у ЛЗ (нинішня та враховуючи перспективи).....	37
4.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині.....	39
4.3. Розрахунок потужності виробництва та кількості виробничих циклів.....	39
4.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу.....	40
<b>РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ, ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</b> .....	44
<b>РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ</b> .....	49

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>			
Зм	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>	Літера	Аркуш	Аркшів
Розробник	Керівник	Н. контр	Консильт	Зав. каф.			4	90
						<i>Кафедра БТМ 4</i>		

<b>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ.....</b>	<b>50</b>
<b>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....</b>	<b>54</b>
8.1. Визначення активності L-метіонінази.....	54
8.2. Визначення наявності та ступеня чистоти білку.....	54
8.3. Контроль чистоти субстанції.....	58
8.4. Наявність механічних включень.....	59
8.5. Вміст вологи у готовому ЛЗ.....	59
<b>РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ.....</b>	<b>60</b>
9.1. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень....	60
9.2. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	66
9.3. Обґрунтування вибору підготовки води.....	68
9.4. Обґрунтування вибору обладнання для одержання готового ЛЗ...	69
<b>РОЗДІЛ 10. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД.....</b>	<b>74</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>80</b>

## ВСТУП

Рак є однією з найбільш агресивних і смертоносних хвороб у світі, займаючи друге місце серед причин смерті. Це багатofакторне захворювання, в якому ключову роль відіграє генетична чутливість, але й кілька факторів навколишнього середовища також сприяють його розвитку та прогресуванню [1].

Згідно статистичних даних викладених Бюлетні національного канцер-реєстру України № 24, на 2022 рік, на обліку перебувають 1 105 152 осіб, з них, нових зареєстрованих випадків 93 877 (без урахування Криму та м. Севастополя) [10].

Звичайні методи лікування раку, такі як хірургічне втручання, хіміотерапія та променева терапія, часто не дозволяють досягти повної ремісії раку. Крім того, було широко визнано, що променева терапія та/або хіміотерапія можуть викликати значні побічні ефекти (мукозит, кардіотоксичність, репродуктивна дисфункція, пневмонія, нейропатія) Це спонукало до розробки багатьох нових підходів до лікування раку. Одним із таких прикладів є використання живих ослаблених бактерій або їх очищених продуктів(зокрема ферментів) [1,5]

Технології використання ослаблених бактерій передбачають зараження пухлин факультативно-анаеробними бактеріями,що підвищує їх антигенність, Окрім цього бактеріальні інфекції змінюють функції клітин імунної системи: CD4 + і CD8 +Т-клітин [11].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>				<i>ВСТУП</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>						6	90
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ 6</i>		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Окрім цього, застосовують бактеріальні ферменти, що впливають на метаболізм пухлини, таким чином призводячи до їх загибелі. Бактеріальні ферменти, є менш токсичними для організму, аніж класичні терапевтичні підходи, такі як радіо-, та хімотерапії [12].

Таким чином, застосування бактеріальних ферментів і розробка препаратів на їх основі, може потенційно вплинути на перебіг ракового захворювання [1].

Тому, метою магістерської роботи стала розробка методу одержання ферменту L-метіонінази мікробного походження для лікування злоякісних пухлин.

Відповідно до мети, були поставлені наступні завдання:

1. Ознайомитися із літературними джерелами, щодо особливостей застосування ферментних препаратів.
2. Проаналізувати сучасні наукові джерела, щодо особливостей культивування мікроорганізмів продуцентів L-метіонінази
3. Застосувати наукові джерела для оптимізації процесів культивування, виділення та очистки ферменту з культуральної рідини.
4. Створення теоретичного підґрунтя для розроблення технології виробництва лікарського препарату на основі літературних джерел та статистики із онкології в Україні.

## РОЗДІЛ 1. ФЕРМЕНТНІ ПРЕПАРАТИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПУХЛИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Враховуючи, що класичні підходи до лікування онкологічних захворювань часто призводять до цілого спектру різноманітних побічних реакцій, дослідники намагаються розробити нові біотехнологічні підходи до лікування ракових хвороб. До таких альтернативних підходів є використання мікробних ферментів з метою впливу на певні ланки метаболізму ракових клітин [1].

Розвиток біології забезпечив глибше розуміння метаболізму ракових клітин та їх відмінності від метаболізму нормальних клітин. Ці відмінності використовуються не тільки для діагностики, а й як мішені для розробки специфічних методів лікування раку. Ця цільова терапія ефективніша, оскільки може подолати існуючі обмеження системної токсичності, чутливості та концентрації препарату [1].

Одним із прикладом використання знань про метаболізм пухлини, є використання мікробних ферментів. Власне, використання мікробних ферментів є надзвичайно ефективним та економічно дешевим [13]

Доведено, що мікробні протиракові ферменти є ефективними засобами для лікування раку. Так, *Aeromonas veronii* здатний виробляти L -глутаміназу, протипухлинний засіб, ефективний проти гострого лімфо лейкозу [13].

### 1.1. Мікробні ензими, що впливають на метаболізм амінокислот в ракових клітинах.

Швидкий і неконтрольований ріст ракових клітин призводить до підвищеної потреби в поживних речовинах у порівнянні з нормальними клітинами.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>				<i>РОЗДІЛ 1. ФЕРМЕНТНІ ПРЕПАРАТИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПУХЛИННИХ ЗАХВОРЮВАНЬ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Архів</i>
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>						<i>8</i>	<i>90</i>
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ 8</i>		
<i>Консульт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

В результаті пухлинні клітини стають ауксотрофними до деяких поживних речовин, таких як амінокислоти та залежать від надходженні поживних речовин з нормальних клітин [1].

Терапія депривації амінокислот (AADT-amino acid deprivation therapy) є однією з таких перспективних стратегій, що характеризується використанням ферментів, що використовують в якості субстрату амінокислоти, таким чином сприяючи лікуванню ауксотрофних пухлини. Позбавлення таких екзогенних поживних речовин завдяки ферментам, що розкладають амінокислоти, пригнічує ріст пухлин. Ферменти шкодять як ауксотрофним пухлинним клітинам, так і нормальним клітинам, однак, останні здатні синтезувати амінокислоти ендогенними механізмами. Основна мета терапія депривацією амінокислот полягає в інгібуванні *de novo* синтезу білка [1].

Амінокислоти виконують ключові функції у клітинній фізіології, зокрема, такі, клітинний сигналінг та регуляція синтезу РНК. Таким чином, виснаження амінокислот під час терапії AADT викликає смерть злоякісних клітин. Ферменти, які використовуються в AADT, як правило, є мікробного походження через їхню доступність, високу продуктивність і легкість маніпуляцій для поліпшення їх властивостей [1].

L-аспарагіназа був першим мікробним ферментом, який використовувався для AADT, і є зараз доступний як препарат, високоефективний проти лімфом (T-ALL). Відтоді амінокислотна деривація терапія набрала обертів і інші ферменти, як аргініндеїміназа, аргіназа, метіоназа, лізин оксидази та фенілаланін-амоніази-ліази почали застосовуватися для лікування раку[1].

Іншим прикладом використання препаратів AADT є застосування бактеріального ензиму аргініндеїмінази (ADI-arginine deiminase) *Mycoplasma arginini*, що розкладає амінокислоту аргінін, і призводить до інгібування росту пухлини. Даний фермент є потенційно терапевтичним засобом для лікування

пухлин *in vitro* та *in vivo*, таких як гепатоцелюлярна карцинома, меланома, лейкемія. Вважається, що таке пригнічення росту ракових клітин відбувається через виснаження концентрації аргініну, необхідного для росту пухлин[5].

Взагалі, якщо заглиблюватися в метаболізм аргініну, то для синтезу аргініну з цитруліну потрібні два ферменти: спочатку аргініносукцинатсинтетаза (ASS) перетворює цитрулін на аргініносукцинат, а потім він перетворюється на аргінін аргініносукцинатліазою (ASL). А бактеріальний фермент ADI перетворює аргінін на цитрулін і аміак. Хоча аргінін є незамінною амінокислотою в організмі людини, деякі види раку, такі як гепатоцелюлярна карцинома, меланома або нирково-клітинний рак, не експресують ASS *in vivo*, що робить їх чутливими до дефіциту аргініну через дію ADI[5].

Таким чином, нормальні клітини організму не страждають від недостачі аргініну, оскільки можуть їх синтезувати завдяки ферменту ASS.

Іншим прикладом застосування методу AADT, є використання L-глютамінази. Власне, L-глютаміназа (EC 3.5.1.2) є амідогідролазним ферментом, який каталізує L-глютамін до L-глютамату та аміаку. Він корисний при лікуванні гострого лімфолейкозу і демонструє протиракову дію, зменшуючи концентрацію L-глютаміну в крові. Оскільки ракові клітини потребують набагато більше L-глютаміну для активної проліферації аніж здорові клітини, то зменшення її концентрації призведе до зниження проліферативної здатності раку [13].

У роботі [14] розглядається застосування метіонази *P.putida*, яка широко використовувалася для зниження концентрації метіоніну в плазмі крові, і інгібування, таким чином, проліферативних властивостей ракових пухлин. Дослідження показали, що метіоназа *P.putida* демонструвала високі антипроліферативні властивості, по відношенню до карциноми легенів Льюїса, раку товстої кишки людини, гліобластоми та нейробластоми.

Цікаво, що в експериментах на застосування метіонінази, були отримані наступні результати [19]:



Рис. 1.1. Застосування метіонінази для лікування гепатоми [19].  
SeMET(-)-щури, що не отримували лікування метіоніназою, SeMET(+)-щури,  
що отримували лікування метіоніназою.

На рисунку можемо бачити, що вираженість гепатоми суттєво менша у групі SeMET+, по відношенню до групи SeMET(-). Ріст гепатоми визначали по збільшенню маси тіла.

### **1.1.2. Імобілізовані мікробні ферменти.**

Ще однією стратегією лікування раку за участі мікробних ферментів є їх іммобілізація на наночастинці з метою точної доставки ферменту до ракової клітини. В дослідженні[2], виділили трансклутаміназу із *Streptomyces mobaraensis* NCIM 5208 та іммобілізували на наноквітках. Наноквітки — це особлива підгрупа наноматеріалів, які нагадують квіти при дослідженні під мікроскопом [2].

**1.1.3. Імобілізовані мікробні ензими, що впливають на доступність амінокислот для ракових клітин.**

Часто застосовують методи іммобілізації, власне, ферментних препаратів на основі ензимів, що метаболізують амінокислоти. Фактично, це комбінування підходів, описаних в 1.1. і 1.2. Вважається, що деякі ферменти, що розкладають певні амінокислоти, вбивають ракові клітини. L-аспарагіназа (ASNase) показала чудову терапевтичну відповідь на аспарагін-ауксотрофний рак, такий як гострий лімфобластний лейкоз [4]. Деталі цього процесу на рисунку 1.2:

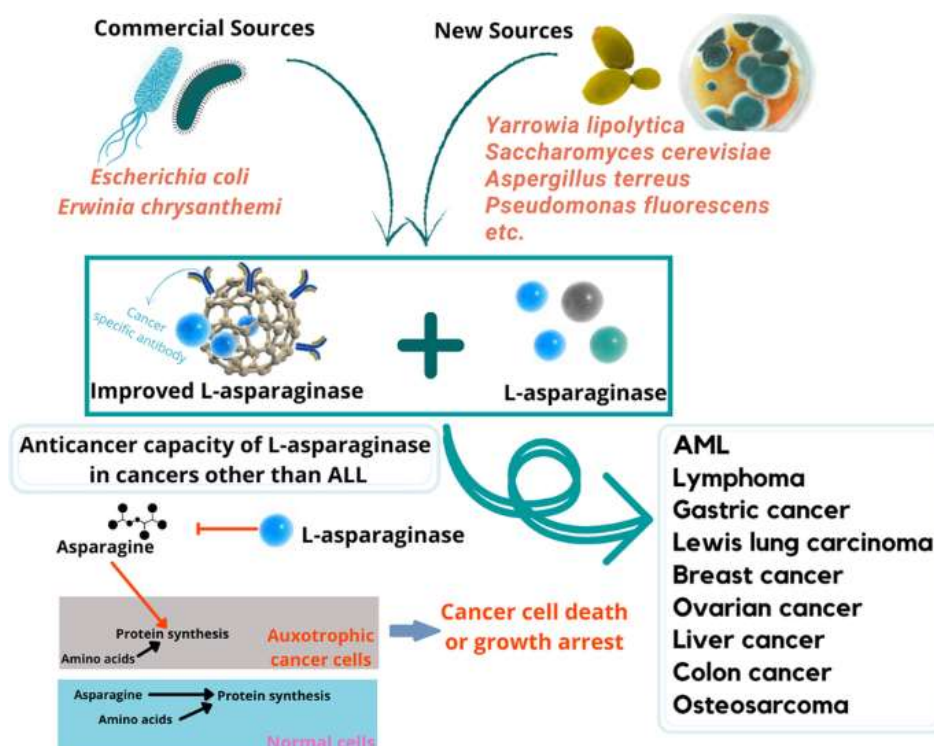


Рис. 1.2. Іммобілізована бактеріальна аспарагіназа для лікування гострого лімфобластного лейкозу[4](asparagine-амінокислота аспарагін;asparaginase-фермент аспарагіназа; lymphoma-лімфома; gastric cancer-рак шлунку:commercial,new sources-джерела аспарагінази:brest cancer-рак молочної залози; liver cancer-рак печінки;ovarian cancer-рак яєчників; colon cancer-рак кишечника;

Можемо бачити сфери застосування (види чутливого раку) іммобілізованої аспарагінази, а також принцип дії протиракової активності аспарагінази.

Ще одним прикладом застосування іммобілізації для мікробних амінокислот-розкладаючих ферментів є фіксація ADI на PEG(poly-ethylene glycol), оскільки не іммобілізований ADI викликає імунну відповідь при ін'єкції у людей. Щоб зменшити імуногенність, ADI був ковалентно зв'язаний з PEG 20 000 і перейменований на ADI-PEG20 (Polaris, Inc.).

Іммобілізація ADI на PEG зберегло приблизно 50% його специфічної активності та збільшило період напіврозпаду на тваринних моделях. Було показано, що ADI-PEG20 пригнічує *in vivo* та *in vitro* ріст людської меланоми та гепатоцелюлярної карциноми, які були виявлені як ауксотрофні для аргініну через дефіцит ASS[5].

## **1.2. Властивості ферментних препаратів**

Ферменти є хімічними каталізаторами нашого організму. Вони дозволяють організмам самовідтворюватися та вибірково й ефективно каталізувати важливі біохімічні реакції. Ферменти – це білки, за винятком рибозимів, які є невеликою групою молекул РНК з каталітичною активністю[3].

Альтернативним підходом є використання ферментів безпосередньо як терапевтичних препаратів. Вперше вони були використані в кінці XIX-го століття, коли ферменти, такі як пепсин, використовувалися для лікування диспепсії[3].

Ферментні препарати були схвалені FDA для лікування ракових, метаболічних, серцево-судинних захворювань. Однак, незважаючи на нещодавні вдосконалення та потенційну застосовність ферментної терапії, лише деякі з них були схвалені FDA та ЕМА[3].

Для ферментних препаратів, характерні наступні властивості, що прямо витікають із їх біології, як ферментів : короткий період напіввиведення *in vivo*, відсутність імуногенності, висока каталітична активність[3].

Окрім цього, для ферментних препаратів часто характерне явище низької тканинної специфічності, тобто ситуації, при якій ферменти зазвичай не розрізняють нормальні та патологічні субстрати тканин і, отже, можуть проявляти аутоксичність [3].

Для того щоб стати вдалим варіантом ферментного препарату, який схвалить комісія FDA, EMA, потрібно щоб ферментна терапія пододала швидкий кліренс ферменту *in vivo*, небажані аутоксичні реакції та імунну відповідь пацієнта. Інкапсуляція та молекулярні модифікації ферментів разом із активним моніторингом імунної відповіді є найдієвішими методами вдосконалення терапії, розглянутими на сьогоднішній день [3].

### **1.3. Властивості L-метіонінази як ферменту протиракової дії.**

Результати, отримані за останні 40 років, продемонстрували, що пухлинні клітини всіх протестованих типів мають підвищену потребу в метіоніні порівняно з нормальними клітинами. Раніше було встановлено, що рекомбінантна метіоніназа (pMETаза), клонована з *Pseudomonas putida*, є ефективним протипухлинним засобом, що пояснюється позбавленням позаклітинного джерела метіоніну для росту пухлини [41].

Цільова хіміотерапія зазвичай ефективна для лікування лише одного або кількох типів раку. Хіміотерапевтичні агенти мають дуже обмежену здатність знищувати метастатичні ракові клітини і врешті-решт виявляються неефективними через неминучу резистентність до ліків. Альтернативна стратегія передбачає використання особливостей метаболізму ракових клітин. Таких, як наприклад, - сильна залежність від метіоніну майже всіх злоякісних пухлин. Таким чином, застосування бактеріальної метіонінази, що буде виснажувати пулл метіоніну, і таким чином інгібувати ріст пухлини є перспективним [7].

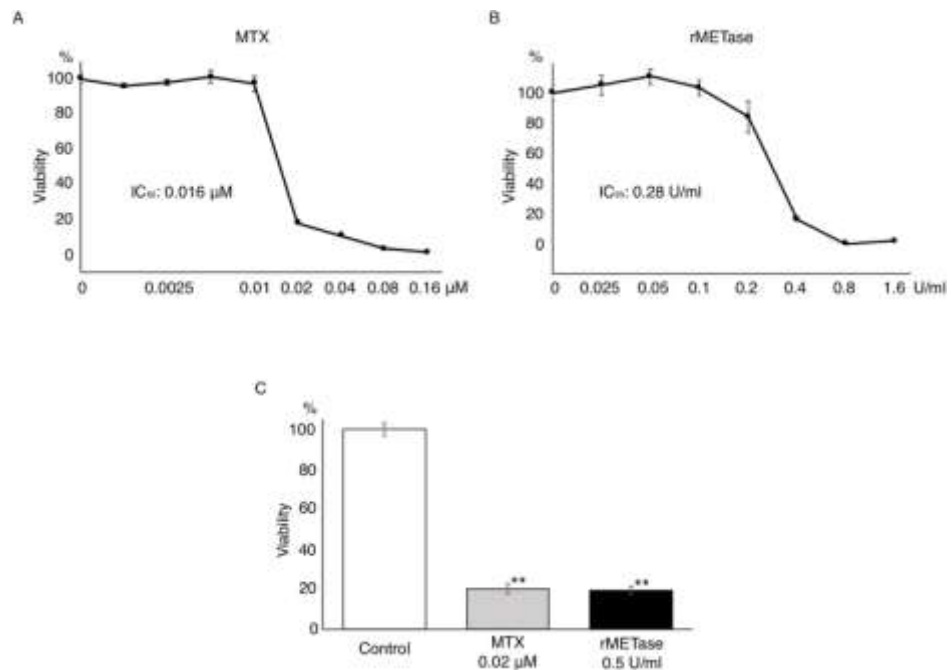


Рис. 2.6. Виживаність клітин остеосаркоми при застосуванні метатрексату та метіонінази[33].

IC50 (інгібуючи концентрація, при якій гинуть 50% клітин) для метатрексату становить 0,016нМ, а для метіонінази 0,28U/мл. При 0,8U/мл можливе максимальне інгібування клітин остеосаркоми(0%виживаності).

Цікаво, що активність метіонінази, що виділена з продуцента *Streptomyces sp.* DMMMН 4 становить 31U/мл, що значно вище ніж IC50 для остеосаркоми.

Згідно інших джерел [35], виснаження вмісту метіоніну може повністю зупинити ріст метіоніни-залежних пухлинних клітин *in vivo* за допомогою блоку клітинного циклу перед мітозом. Метіоніназа, введена внутрішньовенно, призупинила ріст саркоми Йосіда у голих мишей і значно уповільнила ріст недрібноклітинної карциноми легенів людини Н460 у голих мишей.

Окрім цього, введення метіонінази не викликало втрату ваги протягом 10 днів лікування при 40-120 одиницях/добу, що свідчить про можливість низької токсичності [35].

Окрім цього, існують певні модифікації класичного варіанту застосування метіонінази. Наприклад, вивільнення токсичного метилселенолу за участі ферменту метіонінази [38].

Згідно дослідження [37], доволі ефективним є комбінування терапії метіоніназою, із введенням хімотерапевтичних агентів. На моделі раку товстої кишки, найкраще себе показала комбінація оксаліплатину, фторурацилу, та метіонінази.

Іншим прикладом комбінування хімотерапевтичних препаратів із метіоніназою, є експеримент, із синергічною дією метіонінази та рапаміцину на клітини остеосаркоми молочної залози [39]. Деталі на рисунку нижче:

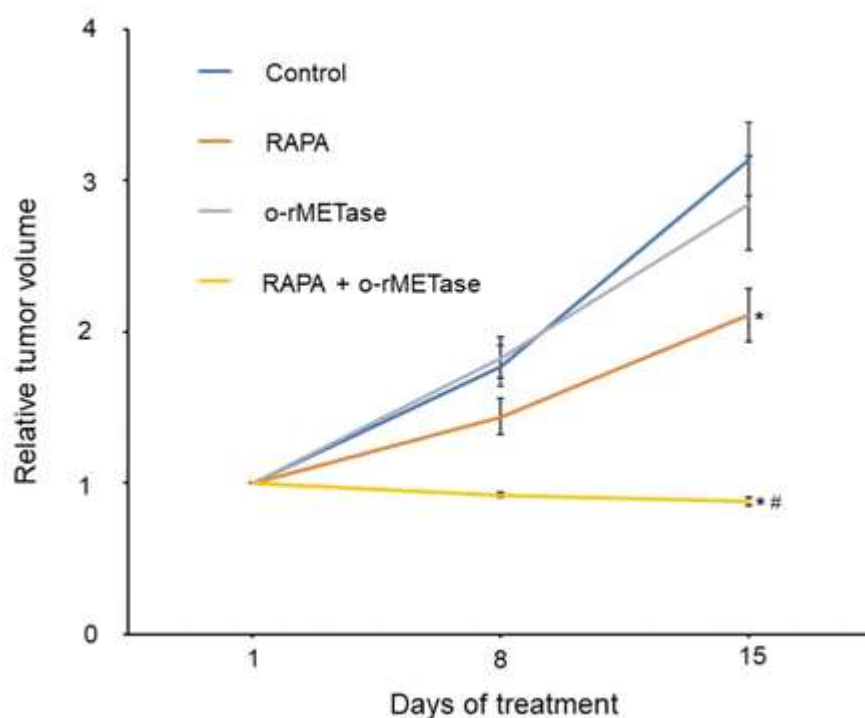


Рис. 2.7. Синергічна дія метіонінази і рапаміцину[39].

При одночасному застосуванні метіонінази та рапаміцину суттєво зменшилася кількість ракових клітин.

Інше дослідження показало сильну синергічну дію метіонінази та тамоксифену. Ступінь інгібування росту пухлини склав 84,65%[40].

Що стосується токсичності, то дослідження[42], проведені вибірці хворих на рак молочної залози, показали, що застосування метіонінази у дозах 2000/5000U не супроводжується клінічною токсичністю.

Таким чином, препарати на основі метіонаназ є перспективними для лікування ракових захворювань різної етіології, через їх низьку токсичність, низькі дози IC50 для певних типів раку, високу ефективність.

Клінічні випробування застосування метіонінази на ракових клітинах показали, що препарат метіоніназа ефективно знижує рівень метіоніну, таким чином інгібуючи розростання пухлини. Клінічні випробування проводилися наступним чином: одна пацієнтка, 67-річна жінка з раком яєчників, приймала метіоніназу двічі на день по 250 одиниць на дозу протягом приблизно одного місяця. Другий пацієнт, 76-річний чоловік з метастатичним раком простати в кістках, приймав метіоніназу двічі на день по 250 одиниць на дозу протягом трьох місяців. Результати: у першого пацієнта рівень циркулюючого метіоніну знизився на 50% протягом 4 годин після прийому 250 одиниць о-метіонінази. У другого пацієнта PSA(простат-специфічний антиген) знизився приблизно на 70% протягом 3 місяців. За цей час у хворого підвищився гемоглобін[43].

Простат-специфічний антиген підвищується при злоякісних та доброякісних пухлинах, тому зниження рівня його експресії вказує на зменшення розмірів пухлини[44].

Щодо схеми застосування, то комбінування метіонінази з іншими хіміотерапевтичними агентами є перспективно. Автори статті[45], вважають що послідовна терапія, при якій найбільш є застосування метіонінази на ракових клітинах, що перебувають на стадії S/G2, а потім обробляються хіміотерапевтичними агентами, активними проти клітин у фазі S/G2 клітинного циклу.

## РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД У ОПТИМІЗАЦІЇ ПРОЦЕСУ ОДЕРЖАННЯ L-МЕТІОНІНАЗИ

Метіонін - сірковмісна незамінна амінокислота, необхідна в раціоні людей, інших ссавців і птахів для нормального росту та функціонування організму. Метіонін відіграє незамінну роль у багатьох клітинних процесах і діяльності, включаючи синтез сполук, регуляцію каталітичної функції та посттрансляційну модифікацію багатьох білків. Окрім того, що вона є ініціюючою амінокислотою в синтезі еукаріотичних поліпептидних ланцюгів і попередником для всіх інших сірковмісних амінокислот та їх похідних, вона служить основним донором метильних груп проміжних продуктів синтезу ДНК і РНК[5].

В еукаріотичних організмах метаболізм і трансметилування метіоніну мають першочергове значення для модифікації та регуляції білків, ліпідів і нуклеїнових кислот. Диференціальне метилування генів регулює їх експресію в безлічі клітин еукаріотичних організмів. Порушення та аномалії метаболізму та трансметилування метіоніну, здається, пов'язані з основними захворюваннями людства, включаючи рак, хвороби серця, старіння, ожиріння та хворобу Паркінсона[36].

Ракові клітини використовують у великих кількостях метіонін. Так, злоякісні клітинні лінії людини мають підвищену потребу в метіоніні для високого синтезу білка та регуляції експресії ДНК у ракових клітинах. Окрім цього, метіонін перетворюється на S-аденозилметіонін і стає донором метилу для метилування ДНК. Дієта з високим вмістом метіоніну збільшувала ризик розвитку раку простати[14].

Окрім цього, ракові клітини залежать від надходження метіоніну, через відсутність у них ферменту метіонінсинтази.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Адж.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД У ОПТИМІЗАЦІЇ ПРОЦЕСУ ОДЕРЖАННЯ L-МЕТІОНІНАЗИ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркшиів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>						18	90
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>							18
<i>Н. контр</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							<i>Кафедра БТМ</i>

Більше того, підвищена потреба ракових клітин у метіоніні (MET) називається залежністю від MET і, можливо, є єдиним відомим загальним метаболічним дефектом раку. Націлювання на MET за допомогою рекомбінантної метіонінази (rMETase) може зупинити ріст ракових клітин *in vitro* та *in vivo* через їхню підвищену потребу в MET [17,34].

Основною біологічною проблемою хімотерапії є той факт, що більшість ракових клітин перебувають у спокої (G0/G1 фаза), де вони мають стійкість до хімотерапії. Застосування же рекомбінантної метіонінази призводить до інгібування росту клітини на S/G2 етапі росту клітини[24].

В експериментах[18], було показано, що зниження концентрації метіоніну внаслідок активності рекомбінантної метіонінази(rMETase) знижується швидкість проліферації клітин нейроblastоми.

Зниження проліферації клітин нейроblastоми є наслідком зупинки клітин в G2фазі, через недостачу метіоніну, і послідуєчий апоптоз[18,22].

Таким чином, використання ферментів, що розкладають метіонін, вплине на розвиток і швидкість проліферації ракового захворювання.

L-метіоназа є внутрішньоклітинним ферментом у бактерій, позаклітинним ферментом у грибів і відсутній у ссавців. L -метіоназа має потенційне застосування проти багатьох видів раку [14].

Виробництво L-Met(метіонінази) на основі мікробної ферментації все ще є складним, і промислове застосування ще не розроблено, незважаючи на високий комерційний інтерес. Це значною мірою тому, що шлях біосинтезу L-Met є сильно розгалуженим, а метаболічна регуляція цього біохімічного шляху є складною[7].

Однак, варто зазначити, що на базі наукових джерел, розроблені оптимальні умови для отримання L-Met. Так, було показано, що найбільший синтез L-Met у бактерій роду *Streptomyces spp.* був помічений після п'яти днів

інкубації з інтенсивністю перемішування 150 об/хв. Загалом, культуру інкубували при 28 °С протягом 7 днів і активність ферменту складала 31 од/мл культуральної рідини [8]. Після чого, колонії чистих культур *Streptomyces* збирали та витримували на крохмально-нітратному агарі та зберігали при 4 °С. Крім того, кожен із цих ізолятів перевіряли на його здатність розкласти та використовувати L-метіонін як єдине джерело азоту в середовищі з використанням агарових чашок, що містять модифіковане крохмально-агарове середовище [8].

В іншому дослідженні оцінювали вплив різних субстратів на ефективність біосинтезу L-Met, використовуючи в якості продуцента *E.coli*. Було визначено, що поживне середовище (глюкоза 37,43 г/л, дріжджовий екстракт 0,95 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,82 г/л і  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4,51 г/л) значно збільшувало титр L-Met (3,04 г/л з менш ніж 2,0 г/л)[9].

Іншим варіантом одержання L-метіонази є культивування бактерій роду *Rhizophora mucronata*. Поживне середовище для культивування мало наступний склад: 6 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 г/л,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 г/л  $\text{NaCl}$ , 20 г/л L-метіоніну, 2 г/л глюкози, 0,2 г/л  $\text{MgSO}_4$ , 0,005 г/л  $\text{CaCl}_2$ , 20 г/л агару та 0,007%.ВТВ. рН середовища встановлювали на рівні 5,5 - 6. *Rhizophora mucronata* висівали на чашку MCD та інкубували при 37°C протягом 24-48 годин.

Також, L-метіоназу можна одержати із бактерій виду *Alcaligenes aquatilis*, при їх культивуванні на середовищі, що містить: 10%  $\text{NaCl}$ , 6%  $\text{KCl}$  та 4%  $\text{MgSO}_4$ , L-аспарагін, L-глутамін, L-аланін і L-тирозин [16]. Згідно інших даних [17], метіоніназу отримували культивуванням грам негативних бактерій, на середовищі, що містило: 0,25 % L-метіоніну, 0,1 % поліпептону, 0,1 % гліцерину, 0,1 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,01 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  та 0,02 % дріжджового екстракту.

## 2.1. Джерела L-метіонінази

Біосинтетичний шлях і регуляторні механізми роботи L-Met(метіонінази) були широко вивчені та добре відомі у багатьох мікроорганізмів, зокрема в *Escherichia coli* і *Corynebacterium glutamicum*. Протягом останніх кількох десятиліть було проведено великий обсяг робіт зі скринінгу та мутагенезу штамів *Escherichia coli* і *Corynebacterium glutamicum* з метою генетичної інженерії(збільшення продукції метіонінази)[7].

Також, метіоніназу було виявлено в бактеріях *Porphyromonas gingivalis* і *Treponema denticola*. Слід зазначити, що дослідження знайшли L -метіоніназу в культуральних фільтратах кількох дріжджів, включаючи *Geotrichum candidum* , *Debaromyces hasenii* та *Saccharomyces cerevisiae*[8]

Ще одним джерелом L-метіонінази є бактерії виду *Rhizophora mucronata*[15].

Також, можливо отримати L-метіоніназу із бактерій виду *Alcaligenes aquatilis*, рідкісну морську бактерію[16].

Згідно літературних даних[17], L-метіоніназу виділили та очистили із наступних бактерій: *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas putida*; *Brevibacterium*; *Citrobacter freundii*; *Lactococcus lactis*, а також *Clostridium sporogenes*.

Згідно інших джерел, метіоніназу було ідентифіковано в бактеріях, особливо в псевдомонадах, і індукується додаванням l -метіоніну до культурального середовища. Фермент був очищений з *Aeromonas sp.* , *Clostridium sporogenes* і *Trichomonas vaginalis* і *Brevibacterium linens*[29].

За останні роки були знайдені і описані в наукових роботах і такі продуценти L-метіонінази, як бактерії *Hafnia alvei* [52], гриби *Aspergillus flavipes* [53], бактерії *Fusobacterium nucleatum* [54], і проведено багато досліджень зі штамми бактерій *Streptomyces sp.* [8, 27, 31, 50].

## 2.2. Особливості L-метіонінази та процесу її біосинтезу

Схему каталітичної дії L-метіонінази можемо бачити на рисунку 2.2.

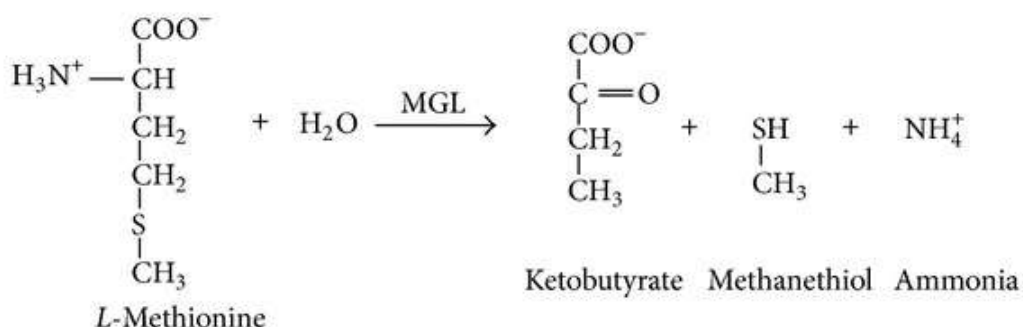


Рис. 2.1. Механізм роботи L - метіонінази за участі H<sub>2</sub>O [14].

L-метіоназа розщеплює L-метіонін за участі H<sub>2</sub>O до кетобутирату, метанетиолу, та йону амонію. Таким чином бактеріальна L-метіоназа знижує пул L-метіоніну, що критично необхідний для росту ракових пухлин[14]. Було показано, що метіоніназа демонструє найбільшу активність при температурі в 37 градусів (на експерименті з метіоніназою, що виділена із бактерії роду *Pseudomonas*[17]).

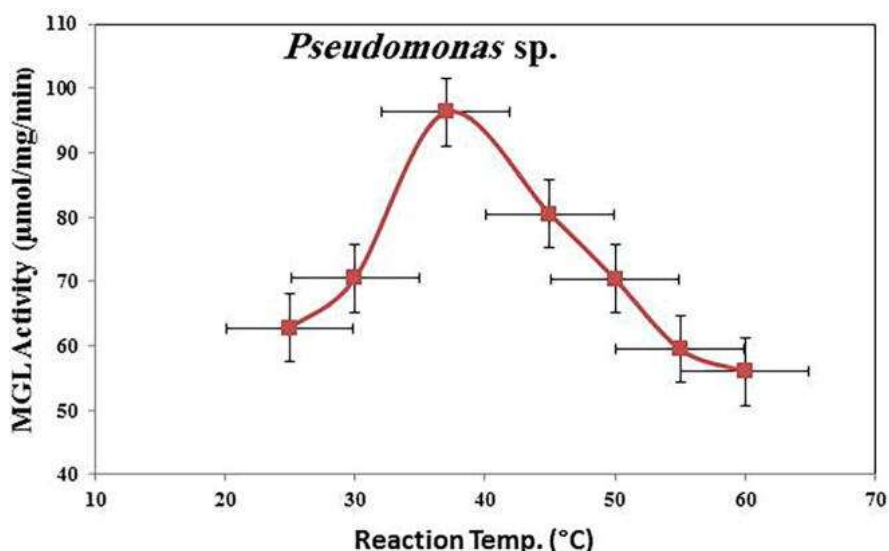


Рис.2.2. Залежність активності метіонінази від температури[17](MGL-метіоніназа)

Щодо рН, то найбільша активність метіонінази була при рН 6,0–7,0 [17].

Деталі на рисунку нижче:

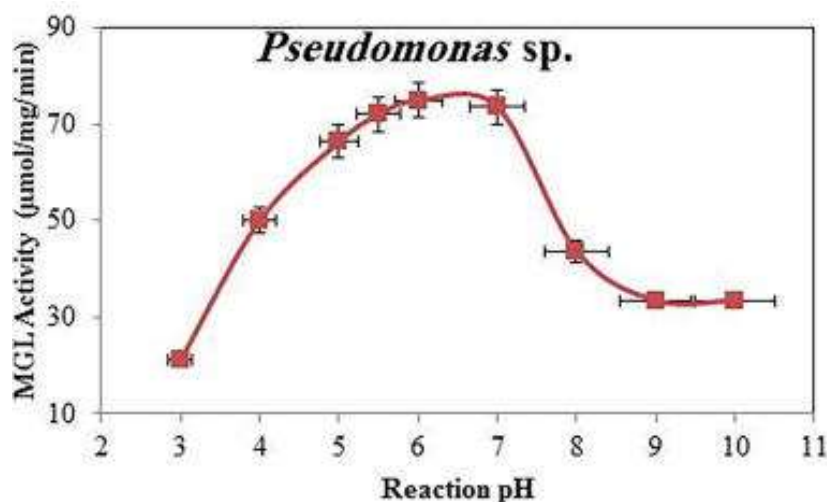


Рис.2.3. Залежність активності метіонінази від рН[17].

На рисунку зображена активність метіонінази при різних значеннях рН.

Згідно літературних даних, на бактерії роду *Pseudomonas spp*, було показано, що ефективним поживним середовищем для культивування, є середовище на основі L-метіоніну[17].

Також, було показано, що при виділенні ферменту з культуральної рідини, та його осаджування ацетоном(1:1), з подальшим очищенням на колонках с сефразою, питома активність очищеного ферменту зросла в 1,89 рази[17].

Таким чином, при біосинтезі L-метіонінази слід вносити в культуральне середовище L-метіонін.

Важливо зазначити, що наведені графіки, щодо залежності активності ферменту від рН та температури мають певний ступінь варіації у різних мікроорганізмах. Так, у бактерії *Brevibacterium linens* BL2 були одержані наступні оптимуми рН, температури, соleyності[29]:

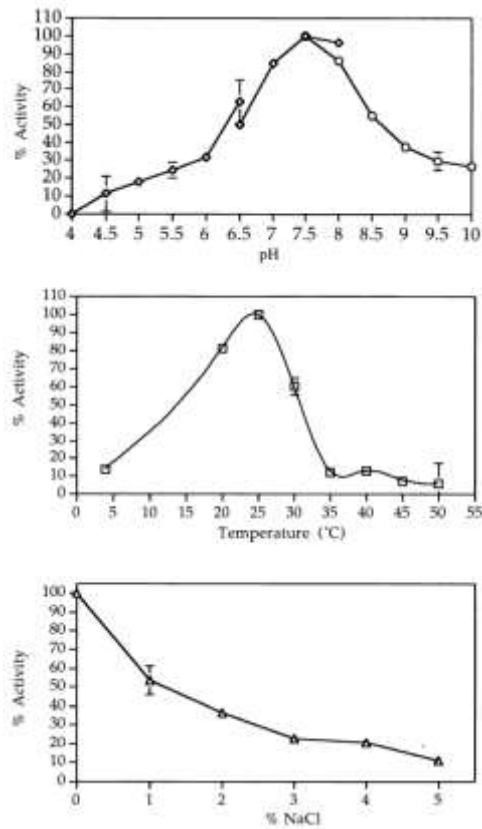


Рис. 2.4. Оптимуми рН, температури та сольоності для ферменту виділеного від *Brevibacterium licens*[29].

У бактерії роду *Pseudomonas* sp. Температурний оптимум становив 37градусів, у бактерії виду *Brevibacterium licens*-26градусів. рН-6-7 у *Pseudomonas* spp, 7-8 у *Brevibacterium licens*. Оптимум сольоності для *Brevibacterium licens*-0%NaCl[17,29].

### 2.3. Перспективи в оптимізації процесу одержання ферменту L-метіонінази

Методами генетичної інженерії можна збільшити продукцію ферменту метіонінази, або зменшити, наприклад, делетувати небажані гени у бактерії. Так, наприклад, в одному дослідженні методами генетичної інженерії делетували гени *msbB* і *purI* у бактерії *Salmonella typhimurium* що необхідні для біосинтезу ендотоксину, токсичного для людини. Таким чином, експериментатори створили новий бактеріальний штам VNP 20009. Надалі, експериментатори, знову ж таки, методами генетичної інженерії,

модифікували штамм VNP20009, шляхом введення гену метіонази, отриманого від бактерії *Pseudomonas putida*[21].

Таким чином, завдяки методам генетичної інженерії, можливо отримати метіоназу від тих бактерій, що у природі не мають відповідних генів, необхідних для синтезу метіонази.

Іншим прикладом, є отримання рекомбінантної метіонази (pMETаза) шляхом внесення гену METase з *Pseudomonas putida* АТТСС 8209 у плазмиду pT7-7 та послідууючої експресії у штамі *E. coli* BL21[23].

В результаті застосування данного методу, отримали 3,13г загального білку, з питомою активністю 18,59U од.мг<sup>-1</sup>, що вважається доволі низьким виходом. Але, коли ген *rMETase* був клонований у вектори pTrc99А клітини *E. coli* JM109 синтезували загального білку-32,63г, з питомою активністю 54,86U мг<sup>-1</sup>. Цей експеримент показав, що посилення експресії гена *rMETase* при використанні промотору trc, вище, аніж при застосування промотора РНК-полімерази T7 [23].

Таким чином, при застосуванні генетично-модифікованих продуцентів метіонази потрібно враховувати, що ефективність продукування метіонази дуже сильно залежить від використовуюваного вектора.

Сучасні методи отримання метіонази від бактеріальних клітин включають наступні стадії [20]:

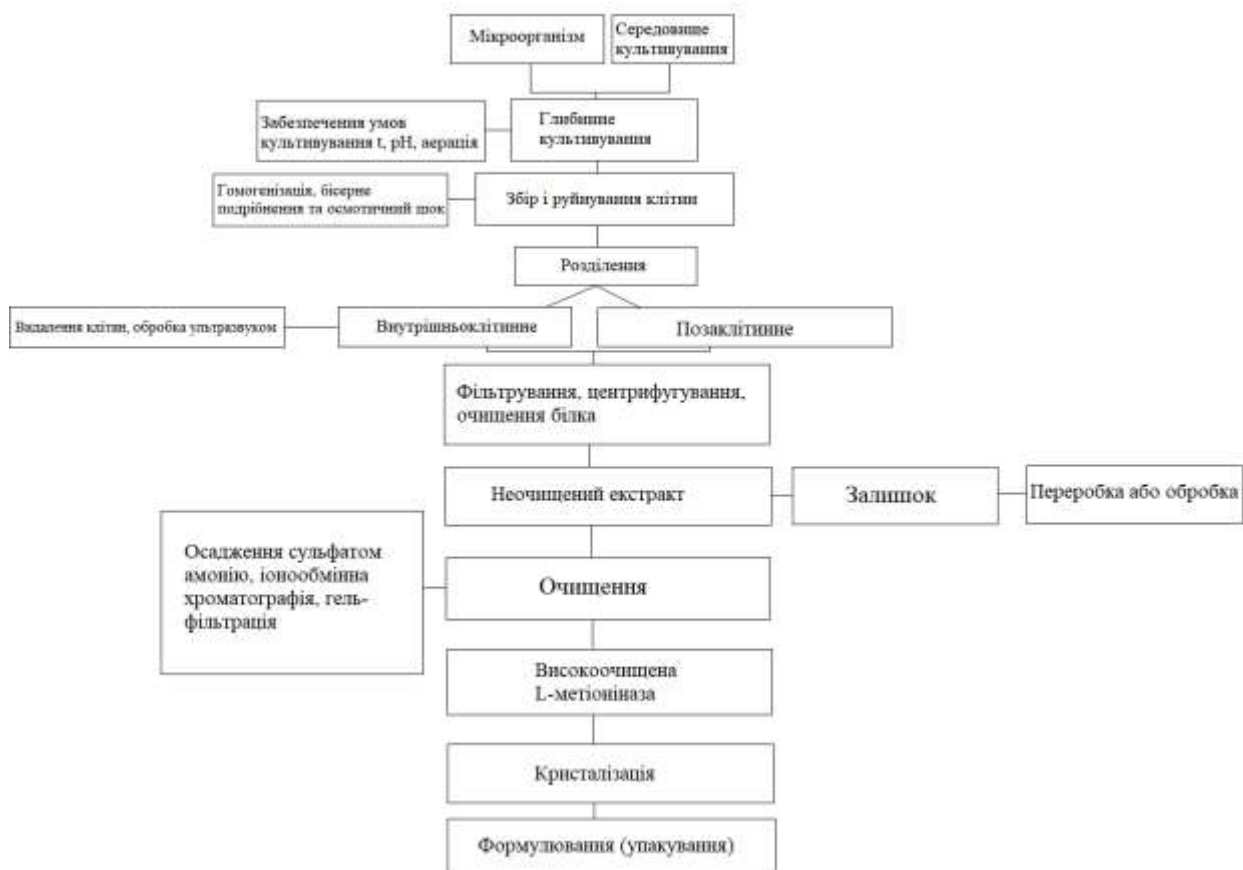


Рис. 2.5. Технологічні особливості отримання метіонінази від бактеріальних клітин [20].

Основні стадії отримання метіонінази включають в себе глибоке культивування штаму обраного мікроорганізма на поживному середовищі, при дотриманні оптимальних умов культивування, відділення культуральної рідини, що містить синтезовані ферменти, фільтрацію, центрифугування, та виділення чистого ферменту. Отриманий фермент кристалізують, та упаковують.

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ L-МЕТІОНІНАЗИ

### 3.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та умов культивування

L-метіоніназа є потенційним терапевтичним ферментом, який каталізує розпад L-метіоніну до метанетіолу,  $\alpha$ -кетобутирату та аміаку. Ферменту потрібен піридоксаль - L -фосфат для  $\gamma$ -елімінації L -метіоніну,  $\alpha$ ,  $\beta$ -елімінації L -цистеїну та його аналогів. Метіонін є незамінною амінокислотою в організмі людини, яка відіграє вирішальну роль у метаболізмі ссавців, наприклад у біосинтезі білка, глутаміну та поліаміну. Підвищена потреба в метіоніні плазми для синтезу білка та регуляції експресії ДНК спостерігалася в кількох ракових клітинах. При дефіциті метіоніну ракові клітини затримувались у пізній фазі S-G2 клітинного циклу та піддавалися апоптозу. Обмеження розвитку раку за допомогою L -метіонінази для видів раку, які виявляють залежність від L -метіоніну для свого росту та проліферації, є багатообіцяючою стратегією протипухлинного лікування [5].

Однак L -метіоніназа відсутня в клітинах ссавців. Щодо своєї природи, L -метіоніназа була охарактеризована з багатьох видів бактерій як внутрішньоклітинний фермент і у деяких видів грибів як внутрішньоклітинний та позаклітинний фермент [6].

За даними, наведеними в *табл. 3.1.* можна зробити висновок, що у середньому час культивування всіх представлених продуцентів перебуває в межах 84 годин. При цьому найнижчою активністю є фермент, синтезований продуцентом *Bacillus haynesii* JUB2. Найвищу активність мають ферменти, синтезовані *Streptomyces sp.* DMMMН 4. На наступному етапі вибору біологічного агента розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування обраних мікроорганізмів (*табл. 3.2*).

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ L- МЕТІОНІНАЗИ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркулш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>						27	90
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>							
<i>Н. конто</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i> <sup>27</sup>		

Таблиця 3.1

## Особливості одержання ферменту

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Активність L-метіонінази, од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Aspergillus fumigatus</i>	L-метіонін Поліпептон Гліцерин K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O Дріжджовий екстракт	3 1 1 1 1 1 0,25	96	12,24	pH середовища для росту довели до 7 за допомогою 0,075 М калій-фосфатного буфера. 150 об/хв. при 28 °C	Hendy MH, Hashem AH, Sulieman WB, Sultan MH, Abdelraof M. Purification, Characterization and anticancer activity of L-methionine $\gamma$ -lyase from thermo-tolerant <i>Aspergillus fumigatus</i> . Microb Cell Fact. 2023 Jan 12;22(1):8. doi: 10.1186/s12934-023-02019-z. PMID: 36635695; PMCID: PMC9837997.
<i>Streptomyces</i> sp. DMMMН 4	Крохмаль L-метіонін NaCl K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O CaCO <sub>3</sub>	20 5 0,5 1 0,5 0,001 3	72	31	pH 7 із струшуванням 150 об/хв при 28 °C	Selim MH, Elshikh HH, El-Hadedy DE, Saad MM, Eliwa E, Abdelraof M. 1-Methioninase from some <i>Streptomyces</i> isolates I: Isolation, identification of best producers and some properties of the crude enzyme produced. J Genet Eng Biotechnol. 2015 Dec;13(2):129-137. doi: 10.1016/j.jgeb.2015.08.001. Epub 2015 Sep 11. PMID: 30647576; PMCID: PMC6299813.

1	2	3	4	5	6	7
<i>Streptomyces</i> sp. DMMMН 60	Крохмаль L-метіонін NaCl K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O CaCO <sub>3</sub>	20 5 0,5 1 0,5 0,001 3	72	48	pH 7 із струшуванням 150 об/хв при 28 °C	Selim MH, Elshikh HH, El-Hadedy DE, Saad MM, Eliwa E, Abdelraof M. l-Methioninase from some Streptomyces isolates I: Isolation, identification of best producers and some properties of the crude enzyme produced. J Genet Eng Biotechnol. 2015 Dec;13(2):129-137. doi: 10.1016/j.jgeb.2015.08.001. Epub 2015 Sep 11. PMID: 30647576; PMCID: PMC6299813.
<i>Streptomyces</i> sp. DMMMН 60	Дріжджовий екстракт Меляса L -метіонін MgCl <sub>2</sub>	0,79 23,52 0,87 0,85	101	60,7	33,03 °C, pH 8,38, вміст початкового інокуляту 5,27%	Mohamed Abdelraof, Mohsen Helmy Selim, Mostafa M. Abo Elsoud, Mamdouh Moawad Ali, Statistically optimized production of extracellular l-methionine $\gamma$ -lyase by Streptomyces Sp. DMMMН60 and evaluation of purified enzyme in sub-culturing cell lines, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Volume 18, 2019, 101074, ISSN 1878-8181

<p><i>Trichoderma harzianum</i> MH828332.1</p>	<p>Лактоза L -метіонін KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> MgCl<sub>2</sub>*6H<sub>2</sub>O CaCl<sub>2</sub>*2H<sub>2</sub>O FeCl<sub>3</sub>*6H<sub>2</sub>O Хлорид цинку</p>	<p>13,9 11,37 1,58 3,98 0,5 0,1 0,02 0,01</p>	<p>120</p>	<p>6,668</p>	<p>pH середовища доводили до 7 за допомогою гідроксиду натрію при 28 °C з постійним струшуванням при 150 об/хв.</p>	<p>Salim N, Santhiagu A, Joji K. Purification, characterization and anticancer evaluation of l-methioninase from <i>Trichoderma harzianum</i>. 3 Biotech. 2020 Nov;10(11):501. doi: 10.1007/s13205-020-02494-w. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33163320; PMCID: PMC7606426.</p>
<p><i>Bacillus haynesii</i> JUB2</p>	<p>L-метіонін, Глюкоза Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> NaCl MgSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O CaCl<sub>2</sub> Агар</p>	<p>5,0 2,0 6,0 3,0 0,5 0,5 0,01 20,0</p>	<p>48</p>	<p>7,38</p>	<p>pH 7 при 37°C</p>	<p>Bopaiah, B. B. K., Kumar, D. A. N., Balan, K., Dehingia, L., Reddy, M. K. R. V., Suresh, A. B., &amp; Nadumane, V. K. (2020). Purification, characterization, and antiproliferative activity of L-methioninase from a new isolate of <i>Bacillus haynesii</i> JUB2. <i>Journal of Applied Pharmaceutical Science</i>, 10(10), 054-061.</p>

Таблиця 3.2

**Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів L-метіонінази**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	L-метіонін	3	140	0,42	1
	Поліпептон	1	1120	1,12	20
	Гліцерин	1	75	0,075	2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	261	0,261	3
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	122	0,122	4
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1	420	0,42	5
	Дріжджовий екстракт	0,25	4376	1,094	6
<b>Вартість 1 л середовища – 3,512 грн</b>					
<i>Streptomyces sp. DMMMН 4</i>	Крохмаль	20	38	0,76	7
	L-метіонін	2	140	0,28	1
	NaCl	0,5	19	0,0095	8
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	261	0,261	3
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5	420	0,21	5
	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,001	28,80	0,000029	9
	CaCO <sub>3</sub>	3	39	0,117	10
<b>Вартість 1 л середовища – 1,6375 грн</b>					
<i>Streptomyces sp. DMMMН 60</i>	Крохмаль	20	38	0,76	7
	L-метіонін	2	140	0,28	1
	NaCl	0,5	19	0,0095	8
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	261	0,261	3
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5	420	0,21	5
	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,001	28,80	0,000029	9
	CaCO <sub>3</sub>	3	39	0,117	10
<b>Вартість 1 л середовища – 1,6375 грн</b>					
<i>Streptomyces sp. DMMMН 60</i>	Дріжджовий екстракт	0,79	4376	3,459	6
	Меляса	23,52	27,86	0,655	21
	L -метіонін	0,87	140	0,12	1
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,85	57	0,048	12
<b>Вартість 1 л середовища – 4,28 грн</b>					
<i>Trichoderma harzianum</i> МН828332.1	Лактоза	13,9	108	1,5	11
	L -метіонін	11,37	140	1,59	1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,58	122	0,19	4
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,98	261	1,039	3
	MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,5	57	0,0285	12
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,1	40	0,004	13
	FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,02	70	0,0014	14
	Хлорид цинку	0,01	90	0,0009	15
<b>Вартість 1 л середовища – 4,3538 грн</b>					

Bacillus haynesii JUB2	L-метіонін	5,0	140	0,7	1
	Глюкоза	2,0	135	0,27	16
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,0	192	1,152	17
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0	122	0,366	4
	NaCl	0,5	19	0,0095	8
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5	420	0,21	5
	CaCl <sub>2</sub>	0,01	47	0,00047	18
	Агар	20,0	259	5,18	19
	<b>Вартість 1 л середовища – 7,88797 грн</b>				

Примітка. \* – Ціни наведено станом на грудень 2023 р. 1 – [https://zahid-agromiks.com.ua/p711828657-aminokislota-metionin-kormovij.html?source=merchant\\_center&gclid=CjwKCAjw6p-oBhAYEiwAgg2PghJsFK8pkO6fXVLHdV6uSFHSGMnzjBADGIXzTpsvrL9HtCx9BXNIxoC8NsQAvD\\_BwE](https://zahid-agromiks.com.ua/p711828657-aminokislota-metionin-kormovij.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAjw6p-oBhAYEiwAgg2PghJsFK8pkO6fXVLHdV6uSFHSGMnzjBADGIXzTpsvrL9HtCx9BXNIxoC8NsQAvD_BwE); 2 - <https://prom.ua/ua/p1885149216-glitserin-distilovanij-999.html?&primelead=MS42>; 3 - <https://prom.ua/p953593209-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=MC44NQ>; 4 - <https://prom.ua/p1260939234-monofosfat-kaliya-monokalijfosfat.html?&primelead=MC44NQ>; 5 - <https://fresh.co.ua/product-7707780263>; 6 - <https://prom.ua/ua/p1310539165-drozhzhevoj-ekstrakt-conda.html>; 7 - <https://prom.ua/ua/p1516573406-krahmal-kukuruznyj-nativnyj.html>; 8 - <https://prom.ua/ua/p273983668-natrij-hloristyj.html>; 9 - <https://www.systopt.com.ua/ru/item-zalizo-sirchanokysle-7-vodne>; 10 - <https://prom.ua/p1261706371-kaltsij-karbonat-uglekislyj.html?&primelead=MS4y>; 11 - <https://prom.ua/p1546791557-laktoza-pischevaya-klebrig.html>; 12 - <https://klebrig.com.ua/ua/p1274951694-magnij-hloristyj-klebrig.html>; 13 - <https://prom.ua/p1296604649-kaltsij-hloristyj.html>; 14 - <https://radiokomponent.com.ua/ua/product/khlornoe-zhelezo-shestivodnoe-fecl36h2o-500gramm/>; 15 - <https://prom.ua/p1400377849-tsink-hlorid-roznychye.html>; 16 - <https://prom.ua/p1011776101-glyukoza-pischevaya-kristallicheskaya.html>; 17 - <https://prom.ua/p1133576828-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>; 18 - <https://prom.ua/p1296599018-hlorid-kaltsiya-meshok.html>; 19 - <https://prom.ua/p1811985993-agar-pitatelnyj-suhoy.html>; 20 - <https://shop.hlr.ua/pepton-fermentativnyy-pan-gis-12817.html>; 21 - [https://prom.ua/p1300558364-patoka-melassa-sveklovichnaya.html?utm\\_source=google\\_product&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=pla&utm\\_campaign=KT\\_cpc\\_05\\_1&gclid=CjwKCAjwjaWoBhAmEiwAXz8DBXgU1y2l\\_W13Mc7RnoDrTxM-AS9u0I3fEgRCN5tZeWgzVDWQIjJZ1RoCLhIQAvD\\_BwE](https://prom.ua/p1300558364-patoka-melassa-sveklovichnaya.html?utm_source=google_product&utm_medium=cpc&utm_content=pla&utm_campaign=KT_cpc_05_1&gclid=CjwKCAjwjaWoBhAmEiwAXz8DBXgU1y2l_W13Mc7RnoDrTxM-AS9u0I3fEgRCN5tZeWgzVDWQIjJZ1RoCLhIQAvD_BwE);

**Розрахунок вартості 1 одиниці активності  
L-метіонінази**

<b>Продуцент</b>	<b>Активність L-метіонінази, од/мл</b>	<b>Вартість 1 л поживного середовища</b>	<b>Вартість 1 од активності, грн</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	12,24	<b>3,512</b>	$2,869 \cdot 10^{-4}$
<i>Streptomyces sp.</i> DMMMН 4	31	<b>1,6375</b>	$0,528 \cdot 10^{-4}$
<i>Streptomyces sp.</i> DMMMН 60	48	<b>1,6375</b>	$0,341 \cdot 10^{-4}$
<i>Streptomyces sp.</i> DMMMН 60	60,7	<b>4,28</b>	$0,705 \cdot 10^{-4}$
<i>Trichoderma harzianum</i> МН828332.1	6,668	<b>4,3538</b>	$6,529 \cdot 10^{-4}$
<i>Bacillus haynesii</i> JUB2	7,38	<b>7,88797</b>	0,001

Дані, наведені в табл. 3.2. та в табл. 3.3. свідчать, що найдорожчим є середовище для культивування *Bacillus haynesii*. Натомість середовище для інкубування *Streptomyces sp.* DMMMН 60 з крохмалем є найдешевшим з усіх представлених і характеризується найменшою вартістю одиниці активності ферменту. Отже, можна зробити висновок, що найкращим продуцентом для культивування ферменту є середовище, що містить крохмаль із продуцентом *Streptomyces sp.* DMMMН 60.

### **3.2 Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента**

*Streptomyces* – рід бактерій типу актинобактерії, тобто грам-позитивних бактерій з високим вмістом гуаніну/цитозину. *Streptomyces* знаходяться в основному в ґрунті і у залишках рослин, більшість видів формують ендоспори. *Streptomyces* відомі своїм характерним «земляним» запахом, який походить від виробництва непостійного метаболіту – геозміну.

*Streptomyces* характеризуються складним вторинним метаболізмом. Вони виробляють велике число антибіотиків, які знаходяться у клінічному використанні. *Streptomyces* інколи можуть бути патогенами людини.

### 3.3. Таксономічний статус біологічного агента

Домен: бактерії (*Bacteria*)

Тип: *Actinobacteria*

Ряд: *Actinomycetales*

Родина: *Streptomycetaceae*

Рід: *Streptomyces*

Вид: *Streptomyces spectabilis* [49]

### 3.4. Вибір післяферментаційних стадій виділення та очищення метіонінази

Щоб обрати найкращі методи для виділення та очистки ферменту треба проаналізувати декілька методик задля найбільшої ефективності та мінімізації втрат на етапах, тому розглянемо виділення метіонінази з *Trichoderma harzianum* та *Candida tropicalis*.

**Виділення і очистка L-метіонінази після культивування *Trichoderma harzianum*:** Супернатант культури, що містить неочищений білок, фракціонували за допомогою осадження сульфатом амонію, поетапно при 0–30%, 30–70% та 70–90% насичення. Білок, що випав в осад, збирали центрифугуванням при 10000×г протягом 20 хв при 4 °С. Виділений білок ресуспендували в мінімальній кількості 25 мМ калій-фосфатного буфера (рН 7,2) і діалізували проти нього протягом 24 годин із трьома змінами буфера для знесолення. Діалізована проба білка з метіонінази наносили на іонообмінну колонку з діетиламіноетилсефадексом, попередньо врівноважену 25 мМ калій-фосфатним буфером (рН 7,2). Хроматографічну колонку промивали двошаровим об'ємом 25 мМ калій-фосфатного буфера (рН 7,2), щоб зібрати фракцію незв'язаного білка. Зв'язані білки елюювали поетапно лінійним градієнтом 0,1–1,0 М NaCl у тому ж буфері зі швидкістю потоку 60 мл/год.

Фракції збирали та аналізували на білок при 280 нм. Концентрацію білка в зразках також визначали за Лоурі (1951 рік) з використанням бичачого сироваткового альбуміну як стандарту. Було проведено аналіз зв'язаних і незв'язаних білків L-метіоніназної активності. Активні фракції об'єднували, діалізували і концентрували ультрафільтрацією. Зразок концентрованого білка піддавали гель-фільтраційній колонці (2 × 50 см) з Sephacryl-S-300 HR як матрицею. Фракції елюювали за допомогою 25 мМ калій-фосфатного буфера (рН 7,2) зі швидкістю потоку 30 мл/год з розміром зразка 2 мл. Концентрацію білка у фракціях оцінювали шляхом вимірювання абсорбції при 280 нм і тестували на активність L-метіонінази. Активні фракції концентрували сублімаційним сушінням і зберігали при –80 °С

**Виділення і очистка L-метіонінази після культивування *Candida tropicalis*: Часткове очищення L-метіонінази.** Усі етапи очищення проводили при температурі 5–10°C. Буфери, використані під час очищення, містили 20 М піридоксаль-5-фосфат для захисту активності ферментів. Безклітинний екстракт нагрівали при 60°C протягом 10 хвилин. Після охолодження на льоду протягом 1 год. денатуровані білки видаляли центрифугуванням при 5000 об/хв при 4°C протягом 15 хв.

Іонообмінна хроматографія на DEAE-целюлозі. DEAE-целюлозна колонка (50×2 см), врівноваженого 0,05 М калій-фосфатним буфером (рН 6,5). Колонку промивали тим же буфером, що містить 0,12 М NaCl, доки абсорбція при 280 нм елюату не зменшувалася до менше 0,05 одиниць абсорбції. Фракцію ферменту, яка показала найвищу активність на стадії часткового очищення, завантажували на колонку, а потім елюювали лінійним градієнтом 0,15–0,6 М у тому самому буфері. Швидкість потоку регулювали до 100 мл/год. Визначали активність ферменту та вміст білка в кожному елюаті. Ферментно-активні фракції об'єднували та діалізували проти дистильованої води при 4°C. Чистоту ферменту перевіряли електрофорезом у поліакриламідному гелі.

Сефадекс G-200 Хроматографія. Смолу Sephadex G-200 змочували в 0,05 М натрій-цитратному буфері (рН 6,5) і давали набухнути. Набухлі кульки виливали в хроматографічну колонку (50×2 см) і залишили осідати на постійну висоту 45 см без тиску. Ферментактивний зразок з DEAE-целюлозної колонки наносили на колонку Sephadex G-200, врівноважену та елюйовану 0,05 М натрій-цитратним буфером (рН 6,5) зі швидкістю потоку 30 мл/год. Елюат (фракції по 5 мл) збирали окремо для вимірювання активності ферменту та вмісту білка. Ферментно-активні фракції об'єднували і ліофілізували. Чистоту ферменту перевіряли електрофорезом у поліакриламідному гелі.

Отже, згідно наведених технологій можна виділити такі стадії очистки та виділення ферменту:

Таблиця 3.4

<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Candida tropicalis</i>
1. Фракціонування сульфатом амонію	1. Нагрівання безклітинного екстракту
2. Холодна центрифуга	2. Охолодження
3. Ресуспендування білка	3. Холодна центрифуга
4. Діаліз	4. Іонообмінна хроматографія
5. Іонообмінна хроматографія	4.1. Нанесення на колонку
5.1. Нанесення на колонку	4.2. Промивка незв'язаних білків
5.2. Промивка незв'язаних білків	4.3. Елюція зв'язаних білків
5.3. Елюція зв'язаних білків	5. Діаліз
6. Діаліз	6. Сефадекс хроматографія
7. Ультрафільтрація	6.1. Нанесення
8. Гель-фільтрація	6.2. Елюція зв'язаних білків
9. Елюція зв'язаних білків	7. Ліофілізування
10. Сублімаційне сушіння	

Отже, згідно наведених технологій можна найкращим методом виділення і очистки ферменту L-метіонінази є метод представленим у статті [30] з культивування *Trichoderma harzianum*, оскільки дозволив отримати вищий відсоток збереження ферменту після виділення, на відміну від методу очистки *Candida tropicalis* [48], 47,9% і 27,98% відповідно.

### 3.5. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу

L-метіоназа – це фермент протипухлинного спрямування, що за даними досліджень сприяє пригніченню метіонінозалежних пухлин при внутрішньовенному введенні, а отже препарат ін'єкційний, так само як і схожий протипухлинний препарат на основі L-аспарагінази. Необхідно зазначити, що L-метіоназа практично не всмоктується при прийомі всередину. Відповідно до механізму виснаження рівня метіоніну в крові за допомогою відповідного ферменту L-метіонази, то найдієвішим методом буде введення препарату внутрішньовенно, минаючи ШКТ.

Перевагами ін'єкційних препаратів є :

- Швидкість дії (в деяких випадках дія лікарського препарату розвивається через кілька секунд).
- Найбільш повна біологічна доступність (лікарські речовини вводяться, минувши такі захисні бар'єри організму, як шлунково-кишковий тракт).
- Точність і зручність дозування лікарських речовин.
- Можливість введення лікарських препаратів пацієнтам, які перебувають в несвідомому стані, при порушенні акту ковтання.
- Можливість вводити лікарські засоби, що руйнуються в шлунково-кишковому тракті: інсулін, строфантин, бензилпеніцилін.

Так як ін'єкційні препарати вводяться в організм минаючи багато біологічних бар'єрів, то до таких форм лікарських препаратів висувають такі вимоги:

- Стерильність;
- Ін'єкційне введення готових лікарських форм не повинно викликати підвищення температури тіла;
- Відсутність механічних домішок;

- Стабільність як в процесі виготовлення ін'єкційних лікарських засобів, так і при їх зберіганні;
- Ізотонічність (для деяких розчинів, наприклад ізотонічного розчину хлориду натрію) [55].

Ін'єкційні препарати бувають декількох форм випуску, у формі вже готових розчинів, та у формі ліофілізованого порошку. Оскільки виробництво річної партії препарату складає 330 трудоднів, тому необхідно обрати найстабільнішу форму лікарського засобу. Ліофілізована форма препарату, на відміну від розчину, має довший термін зберігання, та простіша у транспортуванні, також така форма дозволяє точніше дозувати препарат для введення, оскільки містить лише фермент.

Отже кінцева форма препарату - це ліофілізований порошок.

## РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

### 4.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ на основі обраної субстанції, галузей використання, потреби у ЛЗ (нинішня та враховуючи перспективи)

Рак завжди буде актуальною проблемою у світі, і методи його лікування мають удосконалюватись, лише за 2022 рік в Україні зареєстровано 93 877 (без урахування Криму та м. Севастополя) нових випадків ракових захворювань із загальної кількості 1 105 152 дорослих осіб, а також 6 366 зареєстрованих випадків дитячої онкології. Новим підходом до протипухлинної терапії є створення та застосування ферментних препаратів.

Так як, ще не існує препарату на основі ферменту L-метіонінази, то за приклад основних властивостей, дозування, терміну зберігання та лікарської форми, можна розглянути ін'єкційний препарат зі схожими протипухлинними властивостями, а саме L-аспарагіназу [51].

Препарат з L-метіоніназою випускають у флаконах по 5 000 та 10 000 МО у вигляді ліофілізованого порошку, а застосовують внутрішньовенно, тобто це ін'єкційний препарат і застосовують його виключно в умовах стаціонару.

Перед застосуванням необхідно провести аналіз на наявність можливої алергічної реакції у пацієнта. Для цього 10 МО (0,25 мкг) препарату розчиняють в 0,1 мл дистильованої води, вводять підшкірно і спостерігають реакцію протягом години. Також так само підшкірно вводять 0,1 мл 0,9% розчин хлориду натрію. Якщо розмір папули не перевищує 1 см, то лікування L-метіоніназою можна проводити.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 4. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Архів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>						39	90
<i>Керівник</i>	<i>Красінко В.О.</i>							39
<i>Н. контр</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>							

Для розведення використовують 0,9% розчин хлориду натрію. Відповідно до способу введення буде варіюватись об'єм хлориду натрію, а саме для одноразового введення зі шприца, ліофілізований порошок треба розвести у 20-40 мл 0,9% розчину хлориду натрію, повільно вводячи препарат 1 раз на добу, а при введенні за допомогою капельниці використовують 150 мл розчину хлориду натрію.

Дозу та тривалість лікування визначає лікар залежно від перебігу та тяжкості захворювання. Разова доза для дорослих і дітей становить 200-300 МО (5 - 7,5 мкг) на 1 кг маси тіла, курсова доза для дорослих - 300 000-400 000 МО (7,5 мг – 10 мг), для дітей дозу знижують відповідно до маси тіла, тривалість лікування становить 3 тижні. Прийmemo за середній показник ваги дитини 12 років – 45 кг, а дорослого 75, тому розрахуємо кількість препарату на 1 дозу лікування:

Разова доза для дитини:  $45 \text{ кг} * 7,5 \text{ мкг} = 337,5 \text{ мкг}$  препарату

Разова доза для дорослого:  $75 \text{ кг} * 7,5 \text{ мкг} = 562,5 \text{ мкг}$  препарату

Так як курс лікування становить 3 тижні або 21 день, розрахуємо потребу у метіоназі для дітей та дорослих:

Курсова доза для дитини:  $337,5 \text{ мкг} * 21 \text{ день} = 7,0875 \text{ мг}$

Курсова доза для дорослого:  $562,5 \text{ мкг} * 21 \text{ день} = 11,8125 \text{ мг}$

*Таблиця 4.1*

#### **Вихідні дані для розрахунку річної потреби в L - метіоназі**

Група пацієнтів	Доза препарату, мкг	Тривалість лікування, днів	Кількість L-метіонази на одну людину, мг	Кількість хворих на рак в Україні на 2022 рік	Загальна кількість L-метіонази на всіх хворих, г
1	2	3	4	5	6
Дорослі	562,5	21	11,8125	1 105 152	13050
Діти	337,5	21	7,0875	6366	45,12
<b>Загалом:</b>					<b>13 095,12 г</b>

Примітка. \*1 мкг = 40 МО, 1 МО = 0,025 мкг.

Так як препарат на основі ферменту L-метіонінази інгібує ріст лише метіонін-залежних пухлин, а також існує ряд альтернативних стратегій лікування онкологічних захворювань, то відсоток забезпечення препаратом загального числа хворих становитиме 1%, а саме  $13\ 095,12 * 1\% = 131$  г.

#### **4.2. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині**

Так як в Україні та за кордоном, ще не існує препарату протипухлинного спрямування на основі L-метіонінази, то приймемо необхідність препарату для задоволення потреб споживачів, як 100%.

Згідно з попередніми розрахунками, річна потреба у L-метіоніназі становить **131** г, або **131 000 000** мкг що буде дорівнювати **5 240 000 000** МО. Відомо, що обраний продуцент *Streptomyces* sp. DMMMН 60 продукує L-метіоніназу з ферментною активністю 48 МО/мл, отже можна обрахувати необхідний об'єм культуральної рідини:

$$48 \text{ МО} - 1 \text{ мл}$$

$$5\ 240\ 000\ 000 \text{ МО} - X \text{ мл}$$

$$\text{Тому } X = 5\ 240\ 000\ 000 / 48 = 109\ 166\ 666,7 \text{ мл або } 109\ 166,7 \text{ л}$$

Враховуючі втрати цільового продукту при виділенні (50%), необхідно отримати таку кількість культуральної рідини:

$$V_{\text{кр}} = 109\ 166,7 * 1,50 = 163\ 750,05 \text{ л}$$

#### **4.3. Розрахунок потужності виробництва та кількості виробничих циклів**

Потужність виробництва ферментного препарату на основі метіонінази становить  $V_{\text{кр}} = 163\ 750,05$  л/рік

Обраний біологічний агент *Streptomyces* sp. DMMMН 60 продукує 48 од./мл за 72 години культивування.

Для подальших розрахунків приймемо наступні дані:

- Час роботи ферментера  $T_{\text{цф}} = 81$  год (тривалість культивування – 72 год, тривалість підготовчих робіт – миття та огляд ферментера (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1,5), завантаження середовища (1 год), засів (0,5 год), вивантаження культури)
- Сумарні витрати при виділенні цільового продукту 55%
- Коефіцієнт запасу  $K_1 = 1,1$

Розрахуємо, кількість культуральної рідини, яку потрібно отримати за цикл ферментації. Приймемо кількість трудових днів – 330, тоді об'єм культуральної рідини становить:

$$V_d = V_{\text{гп}} / T_{\text{тр}} = 163\,750,05 / 330 = 496,2 \text{ л}$$

Кількість продукту за цикл буде становити:

$$V_{\text{цк}} = (K_1 * V_d * T_{\text{цф}}) / 24 = (1,1 * 496,2 * 81) / 24 = 1\,842,1 \text{ л/цикл}$$

Визначаємо геометричний об'єм ферментера згідно коефіцієнту заповнення (0,6) та об'єму КР:

$$V_r = V_{\text{цк}} / K_3 = 1\,842,1 / 0,6 = 3070 \text{ л}$$

Згідно з таблицею, найближчим за геометричним об'ємом є ферментер  $V_{\text{ф}} = 3,2 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:

$$K_3 = 1842,1 / 3200 = 0,57$$

#### 4.4. Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу

За один виробничий цикл отримують 1 842,1 л культуральної рідини. Також потрібно врахувати втрати культуральної рідини в результаті краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря ( $E_{\text{ф}}$ ), які становлять від 10 - 15%.

Отже, з урахуванням покриття 10% втрат об'єм поживного середовища та посівного матеріалу перед виробничим біосинтезом має становити:

$$V_{\text{роб.1}} = V_{\text{кр}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 1\,842,1 * 1,1 = 2\,026,31 \text{ л}$$

де  $E_{\text{ф}}$  – втрати культуральної рідини під час біосинтезу. Отже, робочий об'єм ферментера дорівнює **2 026,31 л**. За вибраного коефіцієнта заповнення **0,6** геометричний об'єм ферментера становить:  $V_{\text{ф}} = 2\,026,31 / 0,6 = 3377 \text{ л}$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{ст1}} = 3,2 \text{ м}^3$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення  $K_{31} = 2\,026,31 / 3200 = 0,63$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів ( $0,6 \pm 0,05$ ), отже геометричний об'єм ферментера обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для ферментера становить 10% від об'єму поживного середовища.

Для засіву  $V_{\text{роб.1}} = 2\,026,31 \text{ л}$  середовища, необхідно приготувати

$$V_{\text{пм1}} = V_{\text{роб.1}} * 10\% = 2\,026,31 * 10\% = 202,6 \text{ л посівного матеріалу.}$$

Тоді об'єм поживного середовища в ферментері буде становити:

$$V_{\text{пс1}} = V_{\text{роб.1}} - V_{\text{пм1}} = 2\,026,31 - 202,6 = 1\,823,71 \text{ л,}$$

Врахуємо, що під час одержання **202,6 л** інокуляту в посівному апараті 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.2}} = V_{\text{пм1}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 202,6 * 1,1 = 222,86 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту **222,86 л** за коефіцієнта заповнення **0,6** можна отримати в посівному апараті об'ємом:  $V_{\text{па2}} = 222,86 / 0,6 = 371,4 \text{ л}$ . Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{ст2}} = 400 \text{ л}$ .

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $K_{32} = 222,86 / 400 = 0,55$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10% від об'єму поживного середовища. Отже, для засіву  $V_{\text{роб.2}} = 222,86 \text{ л}$  необхідно приготувати:

$$V_{\text{пм2}} = V_{\text{роб.2}} * X_{\text{ф}} = 222,86 * 10\% = 22,3 \text{ л посівного матеріалу}$$

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс2}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм2}} = 222,86 - 22,3 = 200,56 \text{ л,}$$

Врахуємо, що під час одержання **22,3** л інокуляту в посівному апараті, 10% культуральної рідини буде втрачено внаслідок краплевиносу через колектор відпрацьованого повітря. З урахуванням цього об'єм поживного середовища та посівного матеріалу в посівному апараті становитиме:

$$V_{\text{роб.3}} = V_{\text{пм2}} * (1 + E_{\text{ф}}) = 22,3 * 1,1 = 24,5 \text{ л}$$

Об'єм інокуляту 209 л за коефіцієнта заповнення **0,6** можна отримати в посівному апараті об'ємом:  $V_{\text{па2}} = 24,5 / 0,6 = 40,8$  л. Приймаємо найближчий за об'ємом стандартний ферментер  $V_{\text{ст2}} = 40$  л.

Уточнюємо коефіцієнт заповнення:  $K_{з2} = 24,5 / 40 = 0,61$ . Уточнений коефіцієнт заповнення перебуває у вибраних межах для аеробних процесів, отже геометричний об'єм посівного апарату обрано правильно.

Кількість посівного матеріалу для посівного апарата становить 10 % від об'єму поживного середовища. Для засіву поживного середовища об'ємом **24,5** л необхідно:

$$V_{\text{пм3}} = V_{\text{роб.3}} * X_{\text{ф}} = 24,5 * 10\% = 2,45 \text{ л посівного матеріалу}$$

Тоді об'єм поживного середовища в посівному апараті буде становити:

$$V_{\text{пс3}} = V_{\text{роб.2}} - V_{\text{пм2}} = 24,5 - 2,45 = 22,05 \text{ л}$$

Одержання посівного матеріалу  $V_{\text{пм3}} = 2,45$  л (**2450** мл) для засіву інокулятора можна здійснити культивуванням культури *Streptomyces* sp. DMMMН 60 у колбах на качалці. Для цього використовують качалочні колби об'ємом  $V_{\text{колб}} = 750$  мл з коефіцієнтом заповнення  $K_{зк} = 0,2$ .

Тоді кількість колб становить:

$$N_{\text{колб}} = V_{\text{пм3}} / (V_{\text{колб}} * K_{зк}) = 2450 / (750 * 0,2) = 16,3 \text{ отже приймаємо } 17$$

колб

Таблиця 4.2

**Об'єми середовищ та апаратів для стадії підготовки посівного матеріалу та виробничого біосинтезу**

№ стадії	Об'єм культуральної рідини $V_{кр}$ , м <sup>3</sup> л	Уточнений об'єм культуральної рідини $V_{роб}$ , л	Об'єм посівного матеріалу $V_{пм}$ , м <sup>3</sup> л	Об'єм поживного середовища $V_{пс}$ , м <sup>3</sup> л	Коефіцієнт заповнення $K_{зап}$ , частка	Геометричний об'єм ферментера $V_{ст}$ , м <sup>3</sup> л
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
IV	1 842,1	2 0226,31	202,6	1823,71	0,6	3200
III	202,6	222,86	22,3	200,56	0,6	400
II	22,3	24,5	2,45	22,05	0,6	40
I	2,45	2,45	-	2,45	0,2	17 колб

## РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ, ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Відповідно до обраного методу виділення на та очистки ферменту L-метіонінази з культури *Trichoderma harzianum* [30], що дозволяє зберегти близько 50% ферменту із початкової культуральної рідини, сформовано таблицю матеріальних потоків «Таблиця 5.1», що включає в себе такі основні стадії, як:

1. Центрифугування культуральної рідини. Проводиться при температурі 4° С, для видалення залишків поживного середовища, культури *Streptomyces* sp. DMMMН 60.
2. Осадження ферменту поетапним насиченням супернатанту амоній сульфатом до 30%, 30-70% та 70-90%.
3. Відділення осажденного білку центрифугуванням.
4. Ресуспендування білка у калій-фосфатному буфері та діаліз отриманого розчину.
5. Нанесення діалізованого білку на іонообмінну колонку та його елюція.
6. Повторний діаліз та ультрафільтрація.
7. Гель-фільтрація.

Виділена субстанція поступає на автоматизовану лінію розливу та ліофілізації, з подальшим маркуванням та пакуванням.

<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Разробник</i>		<i>Сосновський М.О.</i>		
<i>Керівник</i>		<i>Красінько В.О.</i>		
<i>Н. контр</i>				
<i>Консильт</i>				
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>		
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ЕТАПІВ ВИДІЛЕННЯ, ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ТА ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ				
		<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркшів</i>
			46	90
46 <i>Кафедра БТМ</i>				

Таблиця 5.1

## Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати цільового продукту (50%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
<b>ТП 1. Зберігання культуральної рідини</b>						
1.	ТП 1. Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	2 026,31 л	0%	2 026,31 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 2,5 м <sup>3</sup>
<b>ТП 2. Центрифугування культуральної рідини</b>						
2.1.	ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	2 026,31 л	5%	-	Центрифуга 5 400 об/хв. 5 м <sup>3</sup> /год
		Супернатант			1945,2 л	Реактор змішувач 3,2 м <sup>3</sup>
		Осад			81,1 кг	На утилізацію
<b>ТП 3. Осадження білку</b>						
3.1.	ТП 3.1. Перше осадження	Супернатант	1945,2 л	1%	2359,5 л	Реактор змішувач 3,2 м <sup>3</sup>
		Амоній-сульфат	414,3 кг		-	Надходить із бункера
		Осаджений білок у розчині	-		-	Перекачується на розділяючу центрифугу
3.1.1	ТП 3.1.1. Перше розділення осаду	Осаджений білок у розчині	2359,5 л	4%	-	-
		Осад	-		47,19 кг	Перекачується у збірник об'ємом 500
		Супернатант	-		2265,12 л	Перекачується у реактор змішувач 3,2 м <sup>3</sup>
3.2.	ТП 3.2. Друге осадження	Супернатант	2265,12 л	1%	2817,52	Реактор змішувач 3,2 м <sup>3</sup>
		Амоній-сульфат	552,4 кг		-	Надходить із бункера

		Осаджений білок у розчині	-		-	Перекачується на розділяючу центрифугу
3.2.1	ТП 3.2.1. Друге розділення осаду	Осаджений білок у розчині	2817,52	4%	-	-
		Осад	-		56,35 кг	Перекачується у збірник об'ємом 500 л
		Супернатант	-		2704,8 л	Перекачується у реактор змішувач 3,2 м <sup>3</sup>
3.3.	ТП 3.3. Третє осадження	Супернатант	2704,8 л	1%	2981 л	Реактор змішувач 3,2 м <sup>3</sup>
		Амоній-сульфат	276,2 кг		-	Надходить із бункера
		Осаджений білок у розчині	-		-	Перекачується на центрифугу відцентровим насосом з продуктивністю 5 м <sup>3</sup> /год
3.3.1	ТП 3.3.1. Третє розділення осаду	Осаджений білок і у розчині	2981 л	4%	-	-
		Осад	-		59,62 кг	Перекачується у збірник об'ємом *
		Супернатант	-		2861,76 л	На утилізацію
<b>ТП 4. Підготовка неочищеного білка</b>						
4.1.	ТП 4.1. Ресуспендування	Осаджений білок	163,16 кг	1%	-	Збірник 500 л
		Калій-фосфатний буфер	326,31 л		-	Надходить із реактора на 400 л
		Суспензія	-		489,48 л	Збірник 550 л
4.2.	ТП 4.2. Діаліз	Суспензія	489,48 л	1%	440 л	Апарат для діалізу 100 л/год
		Діалізована проба білка (лізат)				До збірника 550 л
		Калій-фосфатний буфер	-		-	Утилізація
<b>ТП 5. Іонообмінна хроматографія</b>						

5.1	ТП 5.1. Врівноваження колонки DEAE	Калій-фосфатний буфер	440 л	0%	440 л	Іонообмінна колонка DEAE, об'ємом 15 л і 10 л сорбенту у колонці.
		Відпрацьований розчин				Утилізація
5.2	ТП 5.2. Нанесення білка на колонку DEAE	Діалізована проба білка (лізат)	440 л	3%	-	Іонообмінна колонка DEAE, об'ємом 15 л і 10 л сорбенту у колонці.
		Незв'язаний білок	-			427 л
5.3	ТП 5.3. Промивка колонки DEAE	Калій-фосфатний буфер	-	1%	-	Іонообмінна колонка DEAE, об'ємом 15 л і 10 л сорбенту у колонці.
		Незв'язаний білок				Відбір проби та утилізація
5.4	ТП 5.4. Елюція білка	Калій-фосфатний буфер з лінійним градієнтом NaCl	75 л	3%	-	Іонообмінна колонка DEAE, об'ємом 15 л із яких 10 л сорбенту.
		Елюат	-			75 л
<b>ТП 6. Підготовка активних фракцій білка</b>						
6.1.	ТП 6.1. Діаліз	Елюат	75 л	3%	67,5 л	Апарат для діалізу 100 л/год
		Діалізована проба білка (лізат)				Пересувна ємність на 70 л
6.2	ТП 6.2. Ультрафільтрація	Діалізована проба білка (лізат)	67,5 л	3%	65,5 л	Ультрафільтраційна установка 30 л/год
		Концентрат				Пересувна ємність на 70 л
<b>ТП 7. Гель-фільтрація</b>						
7.1.	ТП 7.1. Нанесення	Концентрат	65,5 л	3%	-	Гель-фільтраційна установка з 4 колонками з продуктивністю 1 л/год
		Незв'язаний білок	-			63,5 л

7.2	ТП 7.2. Елюція	Калій-фосфатний буфер	-	5%	12,7 л	Переносна тара
		Елюат				Переносна тара
<b>ТП 8. Розлив</b>						
8.1	ТП 8.1. Розлив елюату у флакони	Елюат	12,7 л	2%	12,45 л	Лінія розливу флаконів для ліофілізації
		Флакони з пробками				
		Флакони з елюатом				
<b>ТП 9. Сушіння</b>						
9.1.	ТП 9.1. Сублімаційне сушіння	Флакони з елюатом	12,45 л	5%	≈ 524 000 флаконів	Лінія розливу флаконів для ліофілізації
		Флакони з ліофілізованим порошком L-метіонінази				Переносна тара
<b>ПМВ 10. Пакування і маркування</b>						
10.1.	ПМВ 10.1. Маркування	Флакони з ліофілізованим порошком L-метіонінази	-	0%	-	Установка для маркування
		Препарат у флаконах з наліпками				
10.2.	ПМВ 10.2. Пакування	Препарат у флаконах з наліпками	-	0%	-	Установка для пакування
		Препарат у картонних коробках				
<b>ЗВ 11. Знешкодження відходів</b>						
11.1.	ЗВ 11.1. Знешкодження рідких відходів	Рідкі відходи		0%	-	У каналізацію
11.2.	ЗВ 11.2. Знешкодження твердих відходів	Тверді відходи		0%	-	

## РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Таблиця 6.1

Позиція	Найменування	Кількість	Технічні характеристики
1	2	3	4
3-1	Збірник для культуральної рідини рідини	1	Збірник об'ємом 2,5 м <sup>3</sup>
НВ-2.1. НВ-2.2. НВ-2.3. НВ-2.4. НВ-2.5. НВ-2.6.	Насос відцентровий	6	Відцентровий насос МКР-ВІО, максимальна продуктивність 5 м <sup>3</sup> /год
Ц-3.1. Ц-3.2.	Центрифуга	6	Продуктивність 5 м <sup>3</sup> /год
РЗ-4.1. РЗ-4.2.	Реактор змішувач	2	Лопатевий реактор об'ємом 3,5 м <sup>3</sup> , 80 об/хв
3-5	Збірник для осаду	1	Збірник об'ємом 500 л
Д-6.1. Д-6.2.	Апарат для діалізу	2	Електродіалізатор з продуктивністю 100 л/год, з робочими температурними межами 4-35°C
ІК-7	Іонообмінна колонка DEAE	1	Іонообмінна колонка об'ємом 15 л, 10 з яких складає сорбент - діетиламіноетилсефадекс
НК-8	Насос для колонки DEAE	1	Насос PUMP P-50, з максимальною швидкістю 50 л/год
КНБ-9	Установка для контролю наявності білків у субстанції	1	Установка оснащена приладом для реєстрації білків та самописцем
У-10	Ультрафільтраційна установка	1	Установка FlowMem-025 з продуктивністю 2-30 л/год, збереження об'єму субстанції до 96%
Г-11	Гель-фільтраційна установка	1	Установка оснащена 4 колонками з продуктивністю 1 л/год
Л-12	Лінія розливу флаконів для ліофілізації	1	Продуктивність лінії 400 фл./хв
М-13	Установка для маркування	1	Продуктивність 450 фл./хв, похибка нанесення етикеток 0,5 мм, живлення 220 ст, 50 Гц, 2.4 кВт
П-14	Установка для пакування	1	Максимальна продуктивність 180-220 коробок/хв.

<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>			
<i>Керівник</i>	<i>Красінська В.О.</i>			
<i>Н. контр</i>				
<i>Консульт</i>				
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>			
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ			<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>
				<i>Аркшів</i>
				51
			<i>Кафедра БТМ</i>	

## РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

### ТП 1. Зберігання культуральної рідини

Культуральна рідина, що містить у собі неочищений фермент, залишки субстрату та культури *Streptomyces sp. DMMMН 60* зберігається у збірнику **З-1**, при температурі +4°C.

### ТП 2. Центрифугування

#### ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральна рідина, після культивування, перекачується відцентровим насосом **НВ-2.1**. з продуктивністю 5 м<sup>3</sup>/год, та центрифугується на центрифугі **Ц-3.1**. з продуктивністю 5 м<sup>3</sup>/год для первинного розділення рідкої та твердої фази. Осад утилізується, а супернатант передається на наступну стадію за допомогою відцентрового насосу **НВ-2.2**.

### ТП 3. Осадження білку

#### ТП 3.1. Перше осадження

Неочищений фермент осаджують за допомогою додавання сульфату-амонію при поетапному насиченні від 0 до 30% у ректорі змішувачі **РЗ-4.1**. об'ємом 3,5 м<sup>3</sup>.

##### ТП 3.1.1. Перше відокремлення осаду

Осаджений білок та супернатант перекачують на центрифугу за допомогою відцентрового насоса **НВ-2.3.**, відокремлені білки переносять у збірник **РЗ-4.2**. насосом **НВ-2.5**. для подальшого ресуспендування, а супернатант повертають у ректор змішувач насосом **НВ-2.4**.

#### ТП 3.2. Друге осадження

Білок осаджують додаванням сульфату-амонію при поетапному насиченні від 30 до 70% у ректорі змішувачі **РЗ-4.1**. об'ємом 3,5 м<sup>3</sup>.

##### ТП 3.2.1. Друге відокремлення осаду

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ</i>					
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>							<i>Літера</i>	<i>Аркул</i>	<i>Аркциф</i>
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>								52	90
<i>Н. кант</i>								<i>Кафедра БТМ<sup>52</sup></i>		
<i>Консильт</i>										
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>									

Осаджений білок та супернатант перекачують на центрифугу за допомогою відцентрового насоса **НВ-2.3.**, відокремлені білки переносять у збірник **РЗ-4.2.** насосом **НВ-2.5.** для подальшого ресуспендування, а супернатант повертають у реактор змішувач насосом **НВ-2.4.**

### *ТП 3.3. Третє осадження*

Залишки неочищеного ферменту осаджують із супернатанту за допомогою додавання сульфату-амонію при поетапному насиченні від 70 до 90% у реакторі змішувачі **РЗ-4.1.** об'ємом 3,5 м<sup>3</sup> і перекачують відцентровим насосом **НВ-2.3.** до центрифуги **Ц-3.2.**

#### *ТП 3.1.1. Перше відокремлення осаду*

Осаджений білок та супернатант перекачують на центрифугу за допомогою відцентрового насоса **НВ-2.3.**, відокремлені білки переносять у реактор змішувач **РЗ-4.2.** для подальшого ресуспендування. Залишок рідини утилізують.

## **ТП 4. Підготовка неочищеного білка**

### *ТП 4.1. Ресуспендування*

Виділений білок, який надійшов після трьох стадій осадження за допомогою насоса **НВ-2.5.**, ресуспендують у мінімальній кількості калій-фосфатного буфера при  $\text{pH} = 7,2 \pm 0,05$  у реакторі змішувачі об'ємом 500 л **РЗ-4.2.**

### *ТП 4.2. Діаліз*

Суспензію знесолюють діалізом за допомогою ектродіалізатора **Д-6.1.** протягом 24 годин із трьома змінними буферами калій-фосфату, отриманий лізат переносять на наступну стадію та відбирають пробу саплером для електрофорезу.

## **ТП 5. Інообмінна хроматографія**

### *ТП 5.1. Врівноваження колонки DEAE*

Перед нанесенням білка на іонообмінну колонку **ІК-7** з діетиламіноетилсефадексом розміром, сорбент врівноважують калій-

фосфатним буфером при  $pH=7,2 \pm 0,05$ , відпрацьований розчин калій-фосфату утилізують.

#### *ТП 5.2. Нанесення білка на колонку DEAE*

Отриманий лізат, після діалізу, наносять на попередньо врівноважену іонообмінну колонку **ІК-7** самоплином. Після нанесення відбирають пробу незв'язаного білка саплером для електрофорезу та утилізують рідину.

#### *ТП 5.3. Промивка колонки DEAE*

Колонку **ІК-7** з сорбентом діетиламіноетилсефадексом та зв'язаним білком промивають калій-фосфатним буфером, щоб зібрати фракцію незв'язаного білка. Відбирають пробу фракції саплером та утилізують.

#### *ТП 5.4. Елюція*

Зв'язані білки збирають перекачуючи розчин калій-фосфату з додаванням лінійного градієнту NaCl ( $pH=7,2 \pm 0,05$ ) через DEAE колонку **ІК-7**, за допомогою насосу **НК-8** та установки для зчитування білків **КНБ-9** зі швидкістю потоку 50 л/год. Відбирають пробу елюату саплером і передають на наступну стадію.

### **ТП 6. Підготовка активних фракцій білка**

#### *ТП 6.1. Діаліз*

Активні фракції білка знесолювали діалізом **Д-6.2.**, елюат переносять на наступну стадію.

#### *ТП 6.2. Ультрафільтрація*

Лізат очищають ультрафільтрацією **У-10** за допомогою мембрани та відбирають пробу саплером для електрофорезу.

### **ТП 7. Гель-фільтрація**

#### *ТП 7.1. Нанесення*

Очищений фугат наносять на 4 колонки Sephacryl-S-300 HR **Г-11**, незв'язаний білок відбирають на пробу та утилізують.

#### *ТП 7.2. Елюція*

Зв'язаний білок збирають з колонок за допомогою 25 мМ калій-фосфатного буфера ( $pH=7,2 \pm 0,05$ ), насосом зі швидкістю потоку 1 л/год.

## **ТП 8. Розлив**

### *ТП 8.1. Розлив елюату у флакони*

Елюат розливають у флакони по 5 000 МО та 10 000 МО. Розлив проводять у чистому приміщенні класу **B**, у якому знаходиться асептична автоматизована лінія класу **A** для розливу субстанції у флакони **Л-12** для унеможливлення потрапляння мікробіоти або сторонніх забруднювачів в ін'єкційний препарат.

## **ТП 9. Сушіння**

### *ТП 9.1. Сублімаційне сушіння*

Флакони з елюатом попередньо укупуруються гумовими пробками з прорізами (для відходження вологи) у середині автоматизованої лінії **Л-12** і активні фракції білка висушували сублімаційним сушінням до 10 % вологості. Після сушіння здійснюється доукупування та обкатка алюмінієвими ковпачками безпосередньо в автоматизованій лінії.

## **ПМВ 10. Пакування та маркування**

### *ПМВ 10.1. Маркування*

Після висушування закупорені флакони з ліофілізованим порошком **L-метіонінази** обкатані алюмінієвими ковпачками маркуються етикетками на установці для маркування **М-13**, з продуктивністю лінії 450 фл/хв, похибкою нанесення етикетки 0,5 мм.

### *ПМВ 10.2. Пакування*

Промарковані флакони завантажуються на лінію пакування флаконів у картонні коробки **П-14**, по одному флакону на кожну коробку, з продуктивністю 180-220 коробок/хв.

## **ЗВ 11. Знешкодження відходів**

### *ЗВ 11.1. Знешкодження рідких відходів*

Рідкі відходи культуральної рідини, відпрацьованих розчинів зливають у каналізацію.

### *ЗВ 11.2. Знешкодження твердих відходів*

## РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

Під час виробництва протипухлинного ін'єкційного препарату на основі L-метіонінази, необхідно забезпечити належні методи контролю активності ферменту та його чистоти, під час очистки та виділення.

### 8.1. Визначення активності L-метіонінази

Проби які піддаються аналізу були відібрані під час іонообмінної хроматографії, після зняття білка з колонки DEAE (тобто елюції), та після гель-фільтрації.

Активність L-метіонінази оцінювали на основі реакції деметиоляції. У зв'язку з цим у процесі аналізу, як субстрат, використовували 20 мМ L-метіоніну в 0,05 М калій-фосфатному буфері рН 7,0, 0,01 мМ піридоксальфосфату (PLP), 0,25 мМ DTNB і кінцевий об'єм фільтрату 1 мл. Контроль без фільтрату та денатурований нагріванням фільтрат (при 60 °С протягом 10 хв) виготовляли окремо після 1 години інкубації при 30 °С. Метантіол (MTL) вивільнявся з L-метіоніну та реагував з 5,5 дитіобіс-2-нітробензойною кислотою (DTNB або реактив Елмана), утворюючи продукт жовтого кольору (тіонітробензойну кислоту), який виявляли спектрофотометрично при поглинанні за довжини хвилі 412 нм. Метантіолат натрію як еталонний стандарт використовувався для вимірювання вивільненої кількості MTL. За одну одиницю активності (U) MGL, приймали кількість L-метіонінази, яка вивільняє 1 мк моль метанетіолу за хвилину.

### 8.2. Визначення наявності та ступеня чистоти білку

Контроль на наявність білка і його чистоту здійснюють за допомогою електрофорезу.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ</i>	<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркишів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>						56	90
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>							56
<i>Н. конто</i>								
<i>Консильт</i>								
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>					<i>Кафедра БТМ</i>		

Для здійснення даного аналізу проводять відбори проб на основних етапах виділення, це нанесення культуральної рідини на колонку, промивка та елюція.

Для першої проби відбирають 50 мкл отриманого лізату за допомогою смплера, далі відбрають 25 мкл рідини яка пройшла через колонку, для перевірки на незв'язаний білок. Потім слідує етапи промивки та елюції. Після промивки відбирають 25 мкл, а після елюції 50 мкл. Так само продовжують відбирати проби і з наступними колонками DEAE.

Відібрані проби підписують та зберігають у холодильнику, коли відібрана остання проба, можна починати електрофорез. Для цього готують поліакриламідний гель, для цього необхідні такі реактиви: акриламід, верхній та нижній буфер (для розділяючого та концентруючого гелю відповідно), дистильована вода, темед та ПСА.



Рис. 8.1. Реактиви для приготування поліакриламідного гелю

Готують розчини у двох різних колбах, так як концентрація реактивів у них різна. Під час приготування гелю потрібно пам'ятати, що застигає він досить швидко, тому темед необхідно додавати в останню чергу, спочатку перед нанесенням нижнього гелю, а потім, безпосередньо перед нанесенням верхнього гелю. Далі розчин для нижнього гелю перемішують смплером та наносять у попередньо підготовлену комірку між скельцем та пластиною у закріпленому вертикальному положенні.



Рис 8.2. Пластини для гелю



Рис. 8.3. Залитий нижній гель

Розчини готують на два гелі, які йдуть паралельно. Після того як нижній гель застиг, зверху наносять верхній гель і вставляють гребінець, який і створить необхідні нам комірки для нанесення проб.



Рис. 8.4. Готовий до застигання поліакриламідний гель

Під час застигання гелю готують проби. До відібраних проб додають 16 мкг спеціальної маркувальної фарби та кип'ячать протягом 3-х хвилин. Далі готують 250 мл електродного буферу, для цього 25 мл концентрованого буферу розбавляють з дистильованою водою.

Після готовності гелю, проб та електродного буферу, скельця з гелем переносять на прибор для електрофорезу, закріплюють, виймають гребінці та заливають електродним буфером, далі наносять проби, на один гель наносять

проби з білком, тобто першою пробою буде відібрана культуральна рідина, потім елюція, а на інший гель наносять промивки, а саме проба рідини після нанесення, промивка, з усіх етапів виділення та очистки.



Рис. 8.5. Скельце з гелем готове до нанесення проб

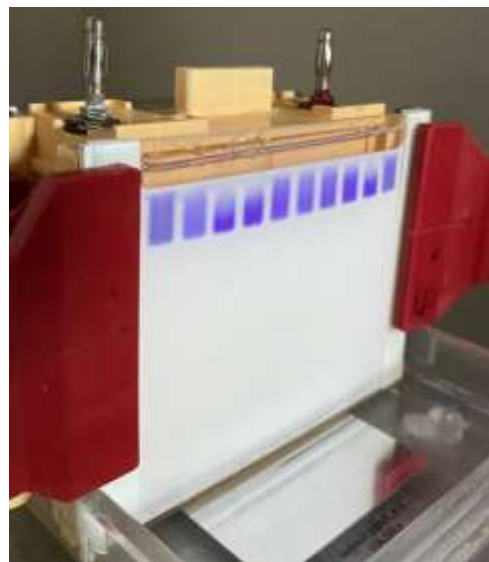


Рис. 8.6. Нанесені проби на поліакриламідний гель

Далі вмикають налаштований прибор, і чекають доки проби під дією напруги сповзуть вниз, близько 1 години 15 хвилин.

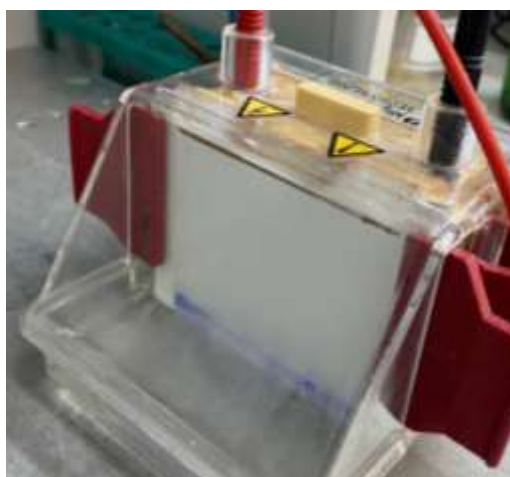


Рис. 8.7. Готовий гель після електрофорезу

Наступним етапом кип'ячать гелі у фарбі протягом 3-х хвилин та відмивають водою до гарної видимості фракцій.

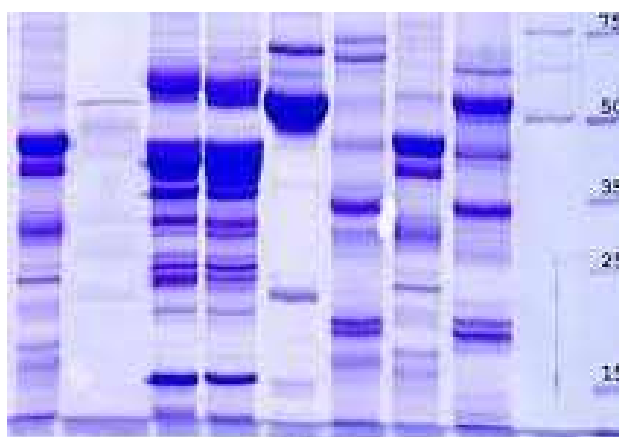


Рис 8.8. Видимі фракції білку після відмивання у воді

### 8.3. Контроль чистоти субстанції

Даний аналіз проводять як для перевірки первинної упаковки так і для субстанції у флаконах.

Безпосередньо перед розливом, після завершення усіх етапів очистки та виділення цільового ферменту, відбирають пробу субстанції у розмірі 5 мл. Готують 6 пробірок із рідким поживним середовищем, 3 пробірки з тіогліколевим та 3 пробірки з соєво-казеїновим бульйоном. У 4 пробірки із рідким середовищем вносять по 1 мл проби субстанції, 2 пробірки залишають без внесення проби, для перевірки на чистоту самого середовища. 6 пробірок із яких 2 не містять проби субстанції інкубують у термостаті, для виявлення

бактерій протягом 18-48 годин при температурі 35-37°C, а для грибів та дріжджів при температурі 20-25 °C до 5 діб.

#### **8.4. Наявність механічних включень**

Даний аналіз проводять як для перевірки первинної упаковки так і для субстанції у флаконах. Відібрані флакони перед процедурою розливу субстанції поміщають у ємність із водою для ін'єкцій, зазвичай використовують скляну прозору пляшку із кришкою. Далі цю посудину виносять із чистого приміщення через повітряний шлюз. Аналізують флакони за допомогою приладу, який підсвічує механічні частки які із флаконів перетекли у воду. Так само аналізують і закриті флакони із субстанцією перед обкаткою алюмінієвими ковпачками, передають флакони із рідиною, та просвічують його за допомогою приладу.

#### **8.5. Вміст вологи у готовому ЛЗ**

Вміст вологи у ліофілізованому порошку визначають за методом Карла Фішера [63], метод базується на реакції води з йодом і діоксидом сірки у розчиннику, яким може виступати метанол або етанол, з утворенням сірчаної кислоти, яку титрують стандартним розчином гідроксиду натрію для визначення кількості.

## РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

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

Виробництво стерильних лікарських засобів GMP ЄС регламентує основні вимоги до чистоти повітря при виробництві стерильних лікарських засобів. У той же час вони не встановлюють конкретні методи визначення чистоти повітря, поверхонь та ін. Ці методи викладені у стандартах ISO та CEN (Європейський комітет зі стандартизації).

Чисті зони для виробництва стерильних продуктів класифікуються відповідно до необхідними характеристиками навколишнього середовища. Кожен виробничий процес вимагає певного рівня чистоти навколишнього середовища в експлуатованому стані, щоб мінімізувати ризик забруднення продукту або матеріалів, що використовуються частинками і мікроорганізмами. Вимоги до допустимої кількості часток у повітрі викладені у Таблиці 9.1.[64]

*Таблиця 9.1.*

#### Класифікація чистих зон за максимальною кількістю допустимих часток у повітрі

Клас чистоти	Максимально допустима кількість часток в 1 м <sup>3</sup> повітря, мкм			
	Оснащений стан		Функціональний стан	
	0,5 мкм	5 мкм	0,5 мкм	5 мкм
A	3500	0	3500	0
B	3500	0	350 000	2000
C	350 000	2000	3 500 000	20000
D	3 500 000	20000	не нормується	

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	РОЗДІЛ 9. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ			<i>Літера</i>	<i>Аркуш</i>	<i>Аркшів</i>
<i>Розробник</i>	<i>Сосновський М.О.</i>								62	90
<i>Керівник</i>	<i>Красінько В.О.</i>							Кафедра БТМ <sup>62</sup>		
<i>Н. кант</i>										
<i>Консульт</i>										
<i>Зав. каф.</i>	<i>Стадніков В.П.</i>									

При виробництві стерильного ін'єкційного препарату на основі ферменту L-метіонінази відповідно до процесів розділяють такі виробничі зони чистоти:

Клас чистоти А - чисту зону А підтримують в середині автоматизованої лінії по розливу та сушінню субстанції по флаконам, дана зона знаходиться у приміщенні класу чистоти В.

Клас чистоти В - дану чисту зону підтримують навколо автоматизованої лінії розливу субстанції з класом чистоти А.

Клас чистоти С - у даному виробничому приміщенні проводять приготування розчинів для ресуспендування, буфери для іонообмінної хроматографії та стерилізуючу фільтрацію субстанції.

Клас чистоти D - у приміщеннях класу чистоти D проводять зважування сипких компонентів.

### **9.1.1. Підготовка персоналу**

Люди є джерелом практично усіх мікроорганізмів у чистих приміщеннях і більшості кількості частинок. Щоб запобігти потраплянню забрудників у лікарський засіб, який виготовляється у чистому приміщенні, необхідно виконувати вимоги, які дозволяють звести до мінімуму генерацію, перенесення і осадження цих забруднень [62].

Вимоги до технологічного одягу для роботи у чистих приміщеннях розділяють відповідно до класів чистоти:

**Клас А/В:** Необхідно носити стерильний брючний костюм або комбінезон, маску, головний убір, який повністю закриває волосся. Спеціальний змінне взуття та бахіли, руки закривають гумовими або пластиковими рукавицями. Нижня частина штанів або комбінезону має бути заправлена у середину бахіл, а рукава у рукавички. По можливості використовувати одноразові комплекти технологічного одягу.

**Клас С:** Волосся має бути покритим, цільний або роздільний костюм, що щільно облягає зап'ястя та високим коміром, змінне спеціальне взуття та бахіли. Також необхідно звертати увагу на матеріал одягу, він не повинен виділяти ворс або інші частки.

**Клас D:** Волосся має бути покритим, носити захисний костюм, цільний або роздільний комплект, змінне спеціальне взуття та/або бахіли.

Персонал який допускається до роботи у чистих приміщеннях, має виконувати ряд спеціальних вимог:

1. У чисте приміщення має допускатися тільки необхідний персонал. Чим більше людей знаходиться у чистому приміщенні, тим вищий у нього рівень забруднення.

2. У чисте приміщення має входити тільки підготовлений для робіт у ньому персонал, який повністю розуміє сенс застосованих правил.

3. Персонал не повинен вносити у чисте приміщення забруднюючі предмети і матеріали. У чисте приміщення дозволяється вносити тільки ті предмети, які необхідні для роботи, то того також типу, який не вносить забруднення у чисте приміщення.

4. Не залишати двері боксу чи чистого приміщення відкритими та не відкривати їх різко, через це може знизитись рівень тиску і з'являться небажаний рух повітря між приміщеннями.

5. Персонал має входити та виходити в чисте приміщення тільки через спеціальну зону переодягання та слідкувати за тим щоб перед відкриванням наступної двері шлюзу, попередня була зачинена.

6. Персонал має розміщуватись правильно відповідно до продукту, не нахилитися до продукту, не притуляти продукт до себе, розмовляти біля продукту. Нічого не має висіти над продуктом та забруднювати його.

7. Також не бажано торкатись різних поверхонь у чистому приміщені, стін, стелі, підлоги. Не дивлячись на те, що приміщення вважається чистим, но його поверхнях, так і на поверхнях обладнання, можуть знаходитись частки та бактерії, які у разі контакту з рукавицями та/або іншими частинами захисного костюму, можуть потрапити у кінцевий продукт.

8. Важливо правильно проводити прибирання чистого приміщення, Метод який використовується для очистки приміщення має відповідати його класу чистоти і продукту який там виготовляється.

### **9.1.2. Прибирання та дезінфекція**

Існують різні методи прибирання чистих приміщень:

- Вакуумне прибирання
- Вологе прибирання з застосуванням мийних засобів
- Дезінфекція
- Стерилізація

Вакуумне прибирання виконується за допомогою централізованої системи вакуумних трубопроводів або автономними переносними пирососами.

Вологе прибирання є найпоширенішим методом. Сухе прибирання у чистих приміщеннях заборонене, так як під час його проведення з інвентарю для прибирання розлітаються частки, які поширюються приміщенням.

При вологому прибиранні використовуються мийні засоби, задачею яких є відділення часток від поверхонь, розчеплення жирів, масел та інших забрудників. Тому необхідно обрати якісний та дієвий дезінфікуючий засіб, щоб унеможливити потраплянню мікробіоти та інших забрудників з поверхонь у чистих приміщеннях у готовий лікарський засіб.

Дезінфікуючий засіб Вернедор [60] має високу дезінфікуючу активність проти збудників внутрішньолікарняних інфекцій, збудників інфекцій

бактерицидної (мікобактерії туберкульозу та особливо небезпечні інфекції), віруліцидної (парентеральні вірусні гепатити В, С, вірус ВІЛ [СНІД], поліомієліту, вірус грипу АН5N1 (пп) патогенів) та грибової (кандидози, дерматомикози, плісняві грибки) етіології, спороцидні властивості.

До складу Вернедора входять такі компоненти: N,N'- біс (3-амінопропіл) додециламін – 17,5 %, алкілдиметилбензиламмоній хлорид –12,5 %, вода підготовлена, поверхнево-активні речовини, комплексон.

Але необхідно пам'ятати, що мікроорганізми з часом виробляють резистентність до компонентів миючого засобу, тому потрібно міняти засіб для дезобробки через кожні декілька тижнів.

Для вирішення питання з чергуванням дезінфікуючого засобу для миття та оброки чистих приміщень можна використати Гуасепт [61].

Геасепт – це універсальний дезінфікуючий засіб у вигляді концентрату для щеззараження поверхонь. Діючою речовиною є водорозчинне полімерне гуанідинове з'єднання, високого ступеню очищення, на основі 26% полігуанідинів (ПГМГ). Воно володіє широким спектром біоцидної дії. Унікальність даного продукту полягає в тому, що на поверхнях, оброблених цим засобом, може зберігатись антимікробна активність на тривалий термін від декількох днів до 8 місяців.

Повна схема прибирання включає наступне:

1. Приготування миючих або дезінфікуючих розчинів. Можуть застосовуватися звичайні засоби, сумісні з покриттями чистих поверхонь. Деякі покриття можуть бути нестійкими, наприклад, до впливу перекису водню. Розчин для приміщень високих класів чистоти готується на основі деіонізованої води, для стерильних приміщень - води очищеної, відфільтрованої через фільтр 0,22 мкм, або води для ін'єкцій.

2. Прохід у чисте приміщення персоналу, що займається прибиранням. Вимоги до такого персоналу, такі ж самі, що й до персоналу, працюючого у чистому приміщенні постійно.

3. Видимі оком забруднення (бите скло, пісок, сміття, тощо) акуратно збираються щіткою, совком або серветкою, не допускаючи поширення забруднень.

4. Стеля. Виконується прибирання зволоженою серветкою або липким роликком, намагаючись не пошкодити HEPA фільтри. Якщо стеля складається повністю з фільтрів HEPA, то краще його не чіпати, забезпечуючи постійну роботу системи вентиляції. При необхідності проводиться очищення елементів кріплення між фільтрами, послідовними рухами в одному напрямку за допомогою серветки, ролика або обробка пилососом.

5. Стіни. Виконується вологе прибирання шваброю, роликком або серветкою паралельними рухами, що перекриваються, зверху вниз. Особлива увага приділяється вимикачам, розеткам, сигнальним пристроям та ін.

6. Скляні поверхні. Обробляються аналогічно до стін. Доцільна їх додаткова обробка спиртовим розчином (для стерильних виробництв - розчином, відфільтрованим через фільтр 0,22 мкм).

7. Підлога. Прибирання виконується аналогічно стінам паралельними рухами, що перекриваються, від безпосереднього місця роботи (хімічний стіл, мийка, місце розливу флаконів, тощо) до дверей. Періодично (або після кожного руху) губка обполіскується у відрі з розчином. Найбільш зручно працювати шваброю, що має віджимний пристрій для губки.

8. В асептичних виробництвах після завершення обробки може знадобитися стерилізація внутрішнього обсягу приміщення парами перекису водню, формальдегіду та ін. Для цього можуть використовуватися генератори пару перекису водню або іншого агента. Витримка чистого приміщення з

наявністю в ньому пар може тривати кілька годин. Після завершення цієї операції іноді виконують повторну обробку окремих поверхонь приміщення.

### **9.1.3. Підготовка вентиляційного повітря**

Підготовка вентиляційного повітря для чистих приміщень виробництва стерильного лікарського засобу, є дуже важливим етапом, адже атмосферне повітря є джерелом та носієм великої кількості часток та мікробіоти [59].

Для початку за допомогою повітрязабірника проводиться забір атмосферного повітря на висоті 30 м над землею через більш стабільну концентрацію мікроорганізмів та забруднень. Наступним етапом є груба очистка повітря, для видалення великих домішок, через фільтр HEPA 10 із чистотою вихідного повітря до 80%.

Стиснення повітря за допомогою турбокомпресора при 0,35 МПа, та температурі близько 120 - 250 °С, далі повітря охолоджується до температури 25-30 °С, і стабілізується у ресивері, до вмісту вологи  $W = 60 - 70 \%$ . Повітря знову нагрівають для видалення залишкової вологи. Наступна очистка повітря за допомогою фільтру HEPA 11 з діаметром пор 1 мкм, дозволяє отримати повітря з чистотою до 95%.

І фінальним етапом є встановлення індивідуальних фільтрів HEPA 14 безпосередньо перед входом повітря у чисті приміщення, який дозволяє отримати повітря з чистотою 99,995%.

## **9.2. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки**

Лікарський засіб на основі ферменту L-метіонінази - ін'єкційний препарат і первинною упаковкою якого є флакони закупорені гумовими пробками, та обкатаними алюмінієвими ковпачками. Для отримання стерильного лікарського засобу, підготовку первинної упаковки здійснюють наступним чином:

## **Підготовка флаконів**

Підприємство отримує флакони у спеціальній тарі (фірмова упаковка). Першим етапом обробляють фірмову упаковку 20% спиртом для первинної очистки. Потім відкривають фірмову упаковку з флаконами за допомогою ножиць. Піддони для мийної машини протирають безворсовою серветкою, яка змочена 76% етиловим спиртом. У протерті піддони виставляють флакони горлом донизу. Наступним кроком піддони закривають металевими кришками та встановлюють у мийну машину. Підготовку флаконів здійснюють у напівавтоматичній машині із заданими параметрами тиску води, повітря та встановлюють режим миття для одного циклу.

Після миття, флакони висушують у сушильній шафі при температурі 150 °С протягом 1,5 годин. Піддони з флаконами виймають із сушильної шафи та знову протирають серветкою змоченою у 76% етиловому спирті та переставляють до стерилізатора. Стерилізують флакони при температурі 180 °С протягом 3 годин.

Стерильні флакони використовують для розливу протягом 48 годин.

## **Підготовка гумових пробок**

Підготовку гумових пробок проводять у приміщенні класу чистоти С у спеціальному технологічному одязі.

Пакети для стерилізації з ліофільними пробками поміщають у паровий стерилізатор, та проводять стерилізацію при температурі 121 °С протягом 15 хвилин, та 2 години у вакуумній сушці.

Пакети із гумовими пробками виймають із стерилізатора в приміщенні класу В під струменем повітря класу А, та залишають на поверхні столу до розливу.

## **Підготовка алюмінієвих ковпачків**

Відбирають необхідну кількість алюмінієвих ковпачків та складають їх у бікс, також у бікс вкладають хімічні індикатори. Далі бікси поміщають у паперовий стерилізатор, та проводять стерилізацію при температурі 121 °С протягом 15 хвилин, та 90 хвилин у вакуумній сушці.

Бікс з ковпачками виймають з камери стерилізатора в приміщенні класу В під струменем повітря класу А, та кладуть на стіл до розливу.

### **9.3. Обґрунтування вибору підготовки води**

Вода один із найважливіших компонентів при приготуванні розчинів, підготовці чистого посуду, розведенні мийних засобів, тому до ступеню її чистоти потрібно відноситись відповідально.

На фармацевтичному виробництві використовується вода, яка відрізняється своїм ступенем підготовки:

1. **Водопровідна вода.** Використовується для підготовки води з більшим ступенем очистки.

2. **Вода очищена.** Використовується для отримання пару, санітарної обробки, миття посуду та при приготування нестерильних розчинів. Також з очищеної води отримують воду для ін'єкцій.

Очищену воду отримують шляхом дистиляції, іонним обміном, зворотнім осмосом, комбінацією даних методів, або іншими методами. Очищена вода має відповідати вимогам по хімічній, іонній, органічній та мікробіологічній чистоті.

3. **Вода для ін'єкцій.** Використовується для виготовлення стерильних лікарських засобів і фінішного ополіскування матеріалів упаковки, тобто флакони.

Оскільки воду для фармацевтичних цілей отримують з питної води, джерелом якої є природна вода, важливо звільнити її від присутніх домішок. Природна вода може містити різні домішки:

- механічні частинки (нерозчинні неорганічні або органічні домішки);
- розчинені речовини (неорганічні солі, іони кальцію, магнію, натрію, хлору, іони сірчаної, вугільної кислот та ін.);
- розчинені хімічно неактивні гази (кисень, азот); розчинені хімічно активні гази (діоксид вуглецю, аміак);
- мікроорганізми (в т.ч. видимі, пліснява, водорості та ін.);
- бактеріальні ендотоксини (ліпополісахариди клітинної стінки грамнегативних мікроорганізмів);
- органічні речовини (природні органічні речовини - гумінова кислота та ін. і забруднюючі органічні речовини - промислові скидання, добрива, пестициди та ін.);
- колоїди (заліза  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ , кремнію  $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ , алюмінію  $\text{Al}_2\text{O}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ , що утворюють комплексні сполуки з органічними речовинами);
- залишкові дезінфікуючі речовини (хлор  $\rightarrow$  хлорноватис- та кислота  $\rightarrow$  гіпохлорит-іон, хлораміни та ін).

Залежно від якості вихідної води, її хімічного складу, можливих домішок у технологічній схемі отримання очищеної води велике значення має попередня підготовка води, яка може включати кілька стадій, таких як фільтрація, пом'якшення, іонний обмін, зворотний осмос та ін.

#### **9.4. Обґрунтування вибору обладнання для одержання готового ЛЗ**

Оскільки лікарський засіб на основі L-метіонази ін'єкційного спрямування, і перед висушуванням, препарат має форму рідкого елюату, то розлив мають здійснювати у таку тару, з якої можна видалити зайву вологу, та одразу ж герметично закрити. Тому фасування ліофілізованого ферменту L-метіонази здійснюють у флакони.

Розлив у флакони здійснюють за допомогою розливної установки у яку загрузають високоочищений елюат. Після розливу елюату по флаконам, за допомогою спеціальних резинових пробок, з різьбою, флакони попередньо укупорюються, обкатуються алюмінієвими ковпачками та поміщаються у сублимаційну сушарку, після закінчення висушування до загального вмісту вологи у порошку - 10 %. Одразу після висушування в сушарці, пробки затискаються у флакон механічно.

Даний процес, починаючи з розливу, є автоматизованим за допомогою установки «Лінія розливу флаконів для ліофілізації» [56].



Рис 9.1. Лінія розливу флаконів для ліофілізації

Продуктивність виробничої лінії складає 400 фл./хв, тому вона підходить під великі обсяги виробництва ліофілізованого порошку для ін'єкцій. Розроблена дана лінія з використанням сучасних закордонних матеріалів та технологій. Дизайн лінії відповідає вимогам GMP, зовнішні та внутрішні поверхні обладнання і його компоненти не піддаються контамінації і легко очищаються. Отже це може гарантувати якість виробленого ін'єкційного препарату протипухлинного спрямування.

Даний автомат складається з:

- Ультразвукова мийка (CPH-100)
- Тунельна сушка (RM8000/4250)
- Машина для розливу (YGR-12)

- Машина для закупорювання (ZGD-12)
- Етикетка

А додаткова комплектація на вибір передбачає:

- Сенсорна панель: SIEMENS, JAPAN HAKKA
- Заливний насос: Belgium NEOCERAM, UK WATSON
- Скляний кожух для створення ламінарного потоку повітря: акрилове скло або загартоване скло
- Фільтр тонкого очищення повітря: Sweden CAMFIL, USA AAF
- Платформа: SKF, Japan SEKIO
- Двигун: ABB, Japan Orienta

Нанесення етикетки на флакони здійснюється за допомогою «Горизонтальної етикетувальної машини модель SHL-2582» [57]



Рис 9.2. Горизонтальна етикетувальна машина модель SHL-2582

Дана установка призначена для автоматичного нанесення самоклеючої етикетки на флакони та ампули. Флакони подаються вручну на стіл, що подає, у вертикальному положенні. Транспортний стіл подає флакони на роликівий конвеєр етикетувальної машини, спеціальний механізм перекладає флакони з вертикального у горизонтальне положення. Етикетувальна головка подає етикетки зверху з великою швидкістю та продуктивністю, а лінійна

обкатка обертає флакони та притискає етикетки. Після етикетування флакони виштовхуються на складальний стіл або коробку.

### **Технічні характеристики:**

- Продуктивність: 450 флаконів/хв
- Похибка нанесення етикеток: 0.5 мм
- Етикетки: ширина 15-80 мм, довжина 25-80 мм,
- Відстань етикеток 3 мм
- Флакони: діаметр 12-30 мм, висота 25-95 мм,
- Ел. живлення: 220 ст, 50 Гц, 2.4 кВт
- Стиснене повітря: 5кг/см<sup>2</sup>
- Вага: 420 кг
- Габарити (Ш \* Д \* В): 2420x1250x1620 мм

Наступним етапом здійснюють пакування флаконів у картонну тару, по 1 ампулі в коробку. Здійснюють автоматизоване пакування за допомогою установки «Картонна машина LT-СМ180» [58]



Рис 9.3. Картонна машина LT-СМ180

Дана безперервна та автоматична машина, може одночасно упакувати продукцію в картонні коробки, штампувати номер партії, дату випуску та ін.

Цей багатофункціональний пристрій може значно заощадити робочі сили та знизити виробничу вартість. Ця машина застосовує передову операційну систему відкриття коробок з безперервною операцією, конвеєрну систему складних інструкцій. Перевагами даної машини є зручні та прості операції, високий рівень безпеки та стабільної роботи, простота в обслуговуванні.

Габарит пакувальної машини (довжина × ширина × висота) 4300 × 1800 × 2250.

Процес пакування флаконів у картонні коробки включає такі етапи:

1. Автоматично або вручну вкладати флакони в конвеєрні лотки, конвеєрний ланцюг рухає лотки.

2. Контрольно-вимірювальний пристрій виявляє флакони в лотках, і, керуючи фальцюванням, у відповідний момент всмоктує один лист інструкції, після фальцювання передає його в нижню частину лотка з продукцією та затискає його.

3. Контрольно-вимірювальний пристрій керує пристроєм всмоктування та забезпечує відкриття коробок у відповідний час. Всмоктує картонну коробку зі стійки для зберігання коробок, потім відкриває її під час обертання, і конвеєрний ланцюг з коробками доставляється до відповідного лотка з продукцією та інструкцією.

4. Конвеєрний ланцюг штовхача рухає штовхач. Одночасно, за допомогою направляючої рейки, штовхач вштовхує продукцію та інструкцію у відповідні коробки, передаючи одночасно коробки у розвантажувальну секцію машини, відповідні місця коробки загнуті, згорнуті, складені, коробка повністю закрита, і таким чином виконаний цілісний процес упаковки.

Максимальна продуктивність установки складає 180-220 коробок/хв.

## РОЗДІЛ 10. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД

Ін'єкційний препарат у формі ліофілізованого порошку на основі ферменту L-метіонази

### Склад:

Діюча речовина: L-метіоназа (фермент);

Фасування здійснюють у флакони по 5 000 МО та 10 000 МО L-метіонінази.

40 МО відповідають 1 мкг сухого ферменту L-метіонінази.

### Лікарська форма:

Порошок для розчину для ін'єкцій.

*Зовнішні ознаки:* порошок білого кольору, або світла пориста маса.

*Вологість:* Не більше 10%. Вологість контролюється за методом Карла Фішера.

*Розчинення:* Порошок повністю розчиняється у рідині. Рідина має прозорий колір без включень.

### Фармакотерапевтична група:

Інші антинеопластичні засоби.

### Фармакологічні властивості:

*Фармакодинаміка.*

L-метіоніназа каталізує розпад L-метіоніну до метанетіолу,  $\alpha$ -кетобутирату та аміаку.

Механізмом дії L-метіонінази є зниження рівня L-метіоніну у

пухлинах.					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ		
Зм	Адж.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробник	Сосновський М.О.				Літера	Аркуш	Аркшів
Керівник	Красінько В.О.					76	90
Н. контр					Кафедра БТМ <sup>76</sup>		
Консильт							
Зав. каф.	Стабніков В.П.						
РОЗДІЛ 10. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД							

У результаті введення ферменту L-метіонінази амінокислота L-метіонін, яка є однією із незамінних амінокислот для пухлинних клітин, все більшою мірою розкладається. За рахунок створення дефіциту метіоніну, синтез білка в пухлинах і їх ріст пригнічується.

#### *Фармакокінетика*

L-метіоніназа, як білок практично не всмоктується при прийомі всередину. L-метіоніназа проникає у ретикулоендотеліальну систему, і як білок розкладається до амінокислот і пептидів.

#### **Показання:**

Як компонент комбінованої антинеопластичної терапії гострої лімфобластної лейкемії у дітей та дорослих.

#### **Протипоказання:**

Пацієнтам, у яких розвивалася алергічна реакція на метіоніназу *Streptomyces* sp., не можна призначати даний ін'єкційний лікарський засіб.

Пацієнтам репродуктивного віку слід вживати заходи контрацепції або утримуватися від статевих відносин під час лікування і протягом 3 місяців після його закінчення.

#### **Взаємодія з іншими лікарськими засобами та інші види взаємодії:**

*Загальна інформація.* L-метіоніназа може підвищувати токсичність інших лікарських засобів унаслідок її впливу на функцію печінки.

*Вакцинація.* Приймаючи до уваги загальну ситуацію, найпоширеніші схеми комбінованої хіміотерапії і базове захворювання, супутня вакцинація живими вакцинами підвищує ризик серйозної інфекції. Таким чином, імунізацію живими вакцинами слід проводити як мінімум через 3 місяці після закінчення курсу антилейкемічної терапії.

### **Особливості щодо застосування:**

Якщо, у пацієнта розвиваються алергічні симптоми, то введення лікарського засобу необхідно припинити негайно. Залежно від тяжкості алергічної реакції, необхідно ввести пацієнту антигістамінний засіб.

Перед початком лікування необхідно провести аналізи крові і сечі, вміст електролітів, визначити значення ниркової затримки, трансаміназ, цукру і білка в крові.

Після введення L-метіонінази рекомендується здійснювати регулярний контроль формули крові, електролітів, речовин, які зазвичай виводяться з сечею, цукру крові/сечі, показників коагуляції (активованій частковий тромбoplastиновий час, протромбіновий час, антитромбін і D-димер), амілази і ліпази сироватки крові, лужної фосфатази, білірубіну, аміаку, тригліцеридів, холестерину.

Подальший контроль здійснюють відповідно до перебігу лікування.

Медичний огляд і контроль формули крові слід проводити з проміжками у 4 тижні упродовж першого року після завершення лікування, на 2-й і 3-й рік кожні три місяці, а потім – кожні півроку.

Після розведення, готовий до застосування розчин можна використовувати протягом 6 годин. Препарат не призначений для порційного застосування. Після розгерметизації упаковки, будь-яку не застосовану частину лікарського засобу необхідно знищити.

Не застосовувати препарат після завершення терміну придатності, який вказаний на флаконі і зовнішній картонній упаковці.

Не застосовувати у період вагітності або годування груддю.

### **Спосіб застосування та дози:**

Для зменшення ризику можливої IgE-зумовленої реакції гіперчутливості, перед тим як розпочинати або відновлювати лікування, слід провести тест шляхом внутрішньокірної проби (вмістити 1 краплю готового до застосування розчину на внутрішню поверхню передпліччя з використанням трубкаподібного інструмента і ввести за допомогою голки в епідерміс краплю з використанням стерильного шприца. Необхідно уникати кровотечі. Через 3 хвилини краплю просушити. Через 20 хвилин оцінити реакцію: якщо розвивається почервоніння і рубчик, лікування L-метіоніназою слід відмінити).

Середня добова доза для внутрішньовенного введення дітям і дорослим під час монотерапії становить 200 МО на 1 кг маси тіла або 6 000 МО на 1 м<sup>2</sup> площі поверхні тіла. Дозу можна збільшити до 1 000 МО на кг маси тіла або більше, залежно від індивідуальної клінічної реакції. Застосовували вищі одноразові дози (1 500 МО/кг маси тіла або 45 000 МО/м<sup>2</sup> площі поверхні тіла і вище), особливо у схемах не щоденного, а циклічного введення (наприклад, двічі на тиждень). У цьому інтервалі доз призначати тільки внутрішньовенне введення.

У протоколах комбінованої хіміотерапії ферментні препарати слід призначати частіше за все з іншими цитостатичними препаратами. У зв'язку з цим слід застосовувати спеціальні правила відносно дозування, шляхів введення та терміну (періоду) терапії.

Середній інтервал дози для внутрішньом'язового введення становить 100 - 400 МО на 1 кг маси тіла на добу або 3 000 - 12 000 МО на 1 м<sup>2</sup> площі поверхні тіла на добу. Не більше 5 000 МО у 2 мл можна вводити в одне місце ін'єкції. Якщо необхідно ввести понад 5 000 МО у вигляді одноразової дози, слід вибрати кілька місць ін'єкції.

#### *Спосіб введення*

Пепарат з L-метіоніназою має вводити тільки досвідчений лікар-онколог.

Для безперервної внутрішньовенної краплинної інфузії розраховану кількість L-метіонінази розчинити у 250-500 мл 0,9 % розчину натрію хлориду або 5 % розчину глюкози і ввести протягом кількох годин.

Для розчинення порошку: 2 мл (4 мл) води для ін'єкцій необхідно повільно влити по внутрішній стінці флакона шприцом для ін'єкцій (не слід спрямовувати струмінь прямо або в порошок). Розчинення вмісту здійснювати повільним обертанням (слід уникати утворення піни у результаті струшування). Готовий до використання розчин може мати легку опалесценцію.

Готовий до використання розчин можна вводити внутрішньом'язово без подальшого розведення залежно від схеми лікування.

#### *Тривалість застосування*

L-метіоніназу слід застосовувати у схемах монотерапії або комбінованої терапії до завершення повного циклу лікування. Якщо розвиваються побічні реакції або пошкодження органів, які є протипоказаннями для введення L-метіонінази, слід розглянути припинення лікування.

#### *Діти.*

Відповідно до показань препарат може застосовуватися дітям.

#### **Передозування:**

Про випадки передозування не повідомлялося. Специфічний антидот невідомий. Лікування симптоматичне і підтримуюче.

#### **Побічні ефекти:**

Окрім імунологічних реакцій на введений чужорідний білок, лікування аспарагіназою також може призводити до порушень в органах і системах, де

присутній високий рівень синтезу білка (особливо у печінці і підшлунковій залозі). Оскільки L-метіоніназу зазвичай слід застосовувати у складі комбінованої терапії, часто буває важко розмежувати побічні ефекти різних лікарських засобів.

**Термін придатності:**

3 роки.

**Умови зберігання:**

Препарат зберігають в холодильнику (при температурі від +2 °С до +8 °С). Зберігати в оригінальній упаковці для захисту від світла. Зберігати в недоступному для дітей місці.

**Упаковка:**

Скляні флакони з L-метіоніназою по 5 000 МО та 10 000 МО закупорених гумовою пробкою та алюмінієвим ковпачком пакують у картонну коробку по 1 флакону, допускається пакування по 5 картонних коробок разом по 1 флаконі у кожній, у поліетилені при нанесенні етикетки.

**Категорія відпуску:**

Препарат з L-метіоніназою відпускають за рецептом лікаря.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Dhankhar R, Gupta V, Kumar S, Kapoor RK, Gulati P. Microbial enzymes for deprivation of amino acid metabolism in malignant cells: biological strategy for cancer treatment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020 Apr;104(7):2857-2869. doi: 10.1007/s00253-020-10432-2. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32037468.
2. Fatima SW, Imtiyaz K, Alam Rizvi MM, Khare SK. Microbial transglutaminase nanoflowers as an alternative nanomedicine for breast cancer theranostics. *RSC Adv.* 2021 Oct 26;11(55):34613-34630. doi: 10.1039/d1ra04513j. PMID: 35494746; PMCID: PMC9042677.
3. De La Fuente M, Lombardero L, Gómez-González A, Solari C, Angulo-Barturen I, Acera A, Vecino E, Astigarraga E, Barreda-Gómez G. Enzyme Therapy: Current Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 25;22(17):9181. doi: 10.3390/ijms22179181. PMID: 34502086; PMCID: PMC8431097.
4. Darvishi, F., Jahanafrooz, Z. & Mokhtarzadeh, A. Microbial L-asparaginase as a promising enzyme for treatment of various cancers. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 5335–5347 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12086-8>
5. Bernardes N, Seruca R, Chakrabarty AM, Fialho AM. Microbial-based therapy of cancer: current progress and future prospects. *Bioeng Bugs.* 2010 May-Jun;1(3):178-90. doi: 10.4161/bbug.1.3.10903. Epub 2009 Dec 2. PMID: 21326924; PMCID: PMC3026423.
6. Shim J, Shin Y, Lee I, Kim SY. L-Methionine Production. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2017;159:153-177. doi: 10.1007/10\_2016\_30. PMID: 27872967.

<i>НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ</i>					
<i>Зм</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	
<i>Розробник</i>		<i>Сосновський М.О.</i>			
<i>Керівник</i>		<i>Красінська В.О.</i>			
<i>Н. контр</i>					
<i>Консильт</i>					
<i>Зав. каф.</i>		<i>Стадніков В.П.</i>			
<i>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ</i>					
			<i>Літера</i>	<i>Аркцш</i>	<i>Аркцшів</i>
				82	90
<i>Кафедра БТМ</i>					
82					

7. Zhou S, Lin Y, Zhao Z, Lai Y, Lu M, Shao Z, Mo X, Mu Y, Liang Z, Wang X, Qu J, Shen H, Li F, Zhao AZ. Targeted deprivation of methionine with engineered *Salmonella* leads to oncolysis and suppression of metastasis in broad types of animal tumor models. *Cell Rep Med*. 2023 Jun 20;4(6):101070. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101070. Epub 2023 Jun 2. PMID: 37269826; PMCID: PMC10313934.
8. Selim MH, Elshikh HH, El-Hadedy DE, Saad MM, Eliwa E, Abdelraof M. l-Methioninase from some *Streptomyces* isolates I: Isolation, identification of best producers and some properties of the crude enzyme produced. *J Genet Eng Biotechnol*. 2015 Dec;13(2):129-137. doi: 10.1016/j.jgeb.2015.08.001. Epub 2015 Sep 11. PMID: 30647576; PMCID: PMC6299813.
9. Zhou HY, Wu WJ, Niu K, Xu YY, Liu ZQ, Zheng YG. Enhanced L-methionine production by genetically engineered *Escherichia coli* through fermentation optimization. *3 Biotech*. 2019 Mar;9(3):96. doi: 10.1007/s13205-019-1609-8. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30800607; PMCID: PMC6385071.
10. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022 Jan;72(1):7-33. doi: 10.3322/caac.21708. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35020204.
11. Kaimala S, Al-Sbiei A, Cabral-Marques O, Fernandez-Cabezudo MJ, Al-Ramadi BK. Attenuated Bacteria as Immunotherapeutic Tools for Cancer Treatment. *Front Oncol*. 2018 May 1;8:136. doi: 10.3389/fonc.2018.00136. PMID: 29765907; PMCID: PMC5938341.
12. Dhankhar, R., Gupta, V., Kumar, S., Kapoor, R. K., & Gulati, P. (2020). Microbial enzymes for deprivation of amino acid metabolism in malignant cells: biological strategy for cancer treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-020-10432-2
13. Jesuraj SAV, Sarker MMR, Ming LC, Praya SMJ, Ravikumar M, Wui WT. Enhancement of the production of L-glutaminase, an anticancer enzyme, from *Aeromonas veronii* by adaptive and induced mutation techniques. *PLoS One*. 2017

Aug 16;12(8):e0181745. doi: 10.1371/journal.pone.0181745. PMID: 28813436; PMCID: PMC5558970.

14. Sharma B, Singh S, Kanwar SS. L-methionase: a therapeutic enzyme to treat malignancies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:506287. doi: 10.1155/2014/506287. Epub 2014 Aug 31. PMID: 25250324; PMCID: PMC4164312.

15. A A Prihanto *Bacillus subtilis* UBTn7, a potential producer of L - Methioninase isolated from mangrove, *Rhizophora mucronata* 2018 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 137 012077

16. Javia, Bhumi M. and Gadhvi, Megha S. and Vyas, Suhas J. and Dudhagara, Dushyant R., Bioprospecting of Thermostable L-Methioninase Enzyme from Agro-Industrial Waste Using *Alcaligenes Aquatilis* Strain BJ1. Available at SSRN:<https://ssrn.com/abstract=4448948> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4448948>

17. Abou Zeid AA, Mohamed AH, El-Sayed ASA, El-Shawadfy AM. Biochemical, molecular and anti-tumor characterization of L-methionine gamma lyase produced by local *Pseudomonas* sp. in Egypt. *Saudi J Biol Sci.* 2023 Jul;30(7):103682. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103682. Epub 2023 May 12. PMID: 37305655; PMCID: PMC10248269

18. Hu J, Cheung NK. Methionine depletion with recombinant methioninase: in vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drugs. *Int J Cancer.* 2009 Apr 1;124(7):1700-6. doi: 10.1002/ijc.24104. PMID: 19089915; PMCID: PMC2700741.

19. Hoffman RM, Miki K, Al-Refaie W, Xu M, Tan Y. Methioninase Gene Therapy. *Methods Mol Biol.* 2019;1866:173-197. doi: 10.1007/978-1-4939-8796-2\_14. PMID: 30725416.

20. Bhawana Kharayat and Priyanka Singh. 2018, Microbial Production of l-Methioninase and its Biotechnology Application. *Int J Recent Sci Res.* 9(8), pp. 28439-28446. DOI: <http://dx.doi.org/10.24327/ijrsr.2018.0908.2460>

21. Sujin Zhou, Yan Lin, Zhenggang Zhao Targeted deprivation of methionine with engineered Salmonella leads to oncolysis and suppression of metastasis in broad types of animal tumor models *Cell Reports Medicine* 4, 101070 June 20, 2023 <sup>a</sup> 2023 The Author(s). <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101070>
22. Igarashi K, Kawaguchi K, Zhao M, Han Q, Tan Y, Kiyuna T, Miyake K, Higuchi T, Nelson SD, Dry SM, Li Y, Yamamoto N, Hayashi K, Kimura H, Miwa S, Singh SR, Tsuchiya H, Hoffman RM. Recombinant Methioninase Combined With Tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R Induced Regression in a PDOX Mouse Model of Doxorubicin-resistant Dedifferentiated Liposarcoma. *Anticancer Res.* 2020 May;40(5):2515-2523. doi: 10.21873/anticancer.14222. PMID: 32366396.
23. Muharram MM. Recombinant Engineering of L-Methioninase Using Two Different Promoter and Expression Systems and in vitro Analysis of Its Anticancer Efficacy on Different Human Cancer Cell Lines. *Pak J Biol Sci.* 2016;19(3):106-114. doi: 10.3923/pjbs.2016.106.114. PMID: 29023047.
24. Yano S., Li S., Han Q., Tan Y., Bouvet M., Fujiwara T., Hoffman R. M. Selective methioninase-induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCI imaging confers chemosensitivity. *Oncotarget.* 2014; 5: 8729-8736. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/2369/text/>
25. Kei Kawaguchi Efficacy of Recombinant Methioninase (rMETase) on Recalcitrant Cancer Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Mouse Models: A Review by *Cells* 2019, 8(5), 410; <https://doi.org/10.3390/cells8050410>
26. Sahoo, Smruti Malinee, and Sabuj Sahoo. "l-Asparaginase and Methioninase as Prospective Anticancer Enzymes: Current Applications and Production Approaches." *Bioprospecting of Enzymes in Industry, Healthcare and Sustainable Environment* (2021): 349-362.
27. Mohamed E El Awady, Manal S Selim, Ahmed S Abd El-Razek, Mohsen MS Asker Production, Purification and Characterization of L-Methioninase from *Streptomyces Variabilis* 3MA2016. *RJPBCS.* 2017; 8(3): 906-921

28. Статистика злочинних утворювань // Електронний ресурс // Режим доступу: [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_23/PDF/all.pdf](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_23/PDF/all.pdf)

29. Sharma B, Singh S, Kanwar SS. L-methionase: a therapeutic enzyme to treat malignancies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:506287. doi: 10.1155/2014/506287. Epub 2014 Aug 31. PMID: 25250324; PMCID: PMC4164312.

30. Salim N, Santhiagu A, Joji K. Purification, characterization and anticancer evaluation of l-methioninase from *Trichoderma harzianum*. *3 Biotech.* 2020 Nov;10(11):501. doi: 10.1007/s13205-020-02494-w. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33163320; PMCID: PMC7606426.

31. Selim MH, Elshikh HH, El-Hadedy DE, Saad MM, Eliwa E, Abdelraof M. l-Methioninase from some Streptomyces isolates I: Isolation, identification of best producers and some properties of the crude enzyme produced. *J Genet Eng Biotechnol.* 2015 Dec;13(2):129-137. doi: 10.1016/j.jgeb.2015.08.001. Epub 2015 Sep 11. PMID: 30647576; PMCID: PMC6299813.

32. Purification, characterization, and antiproliferative activity of L-methioninase from a new isolate of *Bacillus haynesii* JUB2 *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 10(10), pp 054-061, October, 2020 Available online at <http://www.japsonline.com> DOI: 10.7324/JAPS.2020.10106

33. Aoki Y, Tome Y, Han Q, Yamamoto J, Hamada K, Masaki N, Bouvet M, Nishida K, Hoffman RM. Histone H3 lysine-trimethylation markers are decreased by recombinant methioninase and increased by methotrexate at concentrations which inhibit methionine-addicted osteosarcoma cell proliferation. *Biochem Biophys Rep.* 2021 Nov 26;28:101177. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101177. PMID: 34877414; PMCID: PMC8633566.

34. Hoffman RM, Han Q, Kawaguchi K, Li S, Tan Y. Afterword: Oral Methioninase-Answer to Cancer and Fountain of Youth? *Methods Mol Biol.* 2019;1866:311-322. doi: 10.1007/978-1-4939-8796-2\_24. PMID: 30725426

35. Tan Y, Xu M, Guo H, Sun X, Kubota T, Hoffman RM. Anticancer efficacy of methioninase in vivo. *Anticancer Res.* 1996 Nov-Dec;16(6C):3931-6. PMID: 9042315.
36. Hoffman RM. Methioninase: a therapeutic for diseases related to altered methionine metabolism and transmethylation: cancer, heart disease, obesity, aging, and Parkinson's disease. *Hum Cell.* 1997 Mar;10(1):69-80. PMID: 9234067.
37. Park JH, Zhao M, Han Q, Sun Y, Higuchi T, Sugisawa N, Yamamoto J, Singh SR, Clary B, Bouvet M, Hoffman RM. Efficacy of oral recombinant methioninase combined with oxaliplatin and 5-fluorouracil on primary colon cancer in a patient-derived orthotopic xenograft mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Oct 15;518(2):306-310. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.051. Epub 2019 Aug 14. PMID: 31421825.
38. Miki K, Xu M, Gupta A, Ba Y, Tan Y, Al-Refaie W, Bouvet M, Makuuchi M, Moossa AR, Hoffman RM. Methioninase cancer gene therapy with selenomethionine as suicide prodrug substrate. *Cancer Res.* 2001 Sep 15;61(18):6805-10. PMID: 11559554.
39. Masaki N, Han Q, Samonte C, Wu NF, Hozumi C, Wu J, Obara K, Kubota Y, Aoki Y, Bouvet M, Hoffman RM. Oral-recombinant Methioninase in Combination With Rapamycin Eradicates Osteosarcoma of the Breast in a Patient-derived Orthotopic Xenograft Mouse Model. *Anticancer Res.* 2022 Nov;42(11):5217-5222. doi: 10.21873/anticancer.16028. PMID: 36288875.
40. Kavya D, Nadumane VK. A combination of semi-purified L-methioninase with tamoxifen citrate to ameliorate breast cancer in athymic nude mice. *Mol Biol Rep.* 2023 Mar;50(3):2925-2932. doi: 10.1007/s11033-022-08144-z. Epub 2022 Dec 24. PMID: 36566301.
41. Miki K, Al-Refaie W, Xu M, Jiang P, Tan Y, Bouvet M, Zhao M, Gupta A, Chishima T, Shimada H, Makuuchi M, Moossa AR, Hoffman RM. Methioninase gene therapy of human cancer cells is synergistic with recombinant methioninase treatment. *Cancer Res.* 2000 May 15;60(10):2696-702. PMID: 10825143.

42. Tan Y, Zavala J Sr, Han Q, Xu M, Sun X, Tan X, Tan X, Magana R, Geller J, Hoffman RM. Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients. *Anticancer Res.* 1997 Sep-Oct;17(5B):3857-60. PMID: 9427792.

43. Han Q, Tan Y, Hoffman RM. Oral dosing of Recombinant Methioninase Is Associated With a 70% Drop in PSA in a Patient With Bone-metastatic Prostate Cancer and 50% Reduction in Circulating Methionine in a High-stage Ovarian Cancer Patient. *Anticancer Res.* 2020 May;40(5):2813-2819. doi: 10.21873/anticancerres.14254. PMID: 32366428.

44. David MK, Leslie SW. Prostate Specific Antigen. [Updated 2022 Nov 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557495/>

45. Hoffman RM. Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Jan;15(1):21-31. doi: 10.1517/14712598.2015.963050. Epub 2014 Dec 2. PMID: 25439528.

46. [http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL\\_24/PDF\\_E/10-11-all.pdf](http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/PDF_E/10-11-all.pdf)

47. El-Sayed, A. S. A. (2011). Purification and characterization of a new L-methioninase from solid cultures of *Aspergillus flavipes*. *The Journal of Microbiology*, 49(1), 130–140. doi:10.1007/s12275-011-0259-2

48. Salim N, Santhiagu A, Joji K. Purification, characterization and anticancer evaluation of l-methioninase from *Trichoderma harzianum*. *3 Biotech.* 2020 Nov;10(11):501. doi: 10.1007/s13205-020-02494-w. Epub 2020 Nov 2. PMID: 33163320; PMCID: PMC7606426

49. <https://bacdive.dsmz.de/strain/16027>

50. Mohamed Abdelraof, Mohsen Helmy Selim, Mostafa M. Abo Elsoud, Mamdouh Moawad Ali, Statistically optimized production of extracellular l-methionine  $\gamma$ -lyase by *Streptomyces* Sp. DMMM60 and evaluation of purified enzyme in sub-culturing cell lines, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 18, 2019, 101074, ISSN 1878-8181

51. <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=11831>
52. Alshehri WA. Bacterium *Hafnia alvei* secretes l-methioninase enzyme: Optimization of the enzyme secretion conditions. Saudi J Biol Sci. 2020 May;27(5):1222-1227. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.02.008. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32346328; PMCID: PMC7182987.
53. El-Sayed AS. L-methioninase production by *Aspergillus flavipes* under solid-state fermentation. J Basic Microbiol. 2009 Aug;49(4):331-41. doi: 10.1002/jobm.200800318. PMID: 19455514.
54. Bu T, Lan J, Jo I, Zhang J, Bai X, He S, Jin X, Wang L, Jin Y, Jin X, Zhang L, Piao H, Ha NC, Quan C, Nam KH, Xu Y. Structural Basis of the Inhibition of L-Methionine  $\gamma$ -Lyase from *Fusobacterium nucleatum*. Int J Mol Sci. 2023 Jan 13;24(2):1651. doi: 10.3390/ijms24021651. PMID: 36675166; PMCID: PMC9865163.
55. Ін'єкційне та інфузійне введення ліків: <https://profimed.com.ua/likuval-no-profilaktychnyy-pidrozdil/sestryns-ki-manipuliatsii/in-iektsiyne-ta-infuziyne-vvedennia-likiv/>
56. Лінія розливу флаконів для ліофілізації: <https://sinopharmtech.ua/liniya-rozlivu-flakoniv-dlya-liofilizaczi-2/>
57. Горизонтальна етикетувальна машина модель SHL-2582: <https://sinopharmtech.ua/gorizontalna-etiketualna-mashina-dlya-ampul-shl-2582/>
58. Картонна машина LT-СМ180: <https://sinopharmtech.ua/kartonna-mashina-lt-cm180-dlya-upakovki-v-kartonnu-taru/>
59. Типи фільтрів для підготовки вентиляційного повітря [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://studfile.net/preview/7443252/page:52/>
60. Дезінфікуючий засіб Вернедор [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://mdmgroup.com.ua/ru/zasobi-dlya-dezinfekciyi-poverhon-ta-obladnennya/zasib-dezinfekcijnij-vernedor#38002>

61. Дезінфікуючий засіб Гуасепт [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://lysoform.ua/products/guasept-11/>

62. Вимоги до персоналу чистих приміщень [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://studfile.net/preview/12528977/page:32/>

63. Метод Карла Фішера [Електронний ресурс] // Режим доступу: [https://www.laboratuar.com/uk/testler/kimyasal-testler/en-iso-760-suyun-belirlenmesi---karl-fischer-yontemi-\(genel-yontem\)-testi/](https://www.laboratuar.com/uk/testler/kimyasal-testler/en-iso-760-suyun-belirlenmesi---karl-fischer-yontemi-(genel-yontem)-testi/)

64. Класифікація чистих приміщень [Електронний ресурс] // Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>