

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

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

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

« » ЛЮТОГО 2024 г.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » ЛЮТОГО 2024 г.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми Фармацевтична біотехнологія

на тему: _____ Дріжджові кілер-токсини як альтернативний протигрибковий засіб

Виконав: здобувач_2 курсу, групи 2__

КРАСЬКО Мар'яна Олегівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

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

Консультанти _____ (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент _____ (прізвище та ініціали) _____ (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ 30 ” жовтня 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КРАСЬКО Мар'яни Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Дріжджові кілер-токсини як альтернативний протигрибковий засіб

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.

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

затверджені наказом закладу вищої освіти від 06 листопада 2023 року № 913-к

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Wickerhamomyces anomalus*, цільовий продукт: дріжджовий кілер-токсин

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити): Розділ 1. Кілер-токсини як засоби боротьби з патогенними мікроорганізмами; Розділ 2. Сучасний підхід до одержання і використання кілер-токсинів; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування; Розділ 4. Обґрунтування післяферментаційних процесів; Розділ 5. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з врахуванням матеріальних потоків; Розділ 6. Специфікація обладнання для виділення та очищення кілер-токсинів; Розділ 7. Опис технологічної схеми процесів виділення та очищення кілер-токсинів; Розділ 8. Контроль готової субстанції кілер-токсинів; Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу проти кандидозу; Розділ 10. Специфікація обладнання для виробництва таблеток проти кандидозу; Розділ 11. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти кандидозу; Розділ 12. Опис таблетованого лікарського засобу на основі кілер токсину згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема ділянки виділення та очищення кілер-токсину – 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема ділянки виділення та очищення кілер-токсину – 1

аркуш формату А1. Технологічна схема виробництва готового лікарського засобу на основі кілер-токсину - 1 аркуш формату А1. Апаратурна схема виробництва готового лікарського засобу на основі кілер-токсину - 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 30 жовтня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. Кілер-токсини як засоби боротьби з патогенними мікроорганізми;	01.11.2023 - 19.11.2023	
2	Розділ 2. Сучасний підхід до одержання і використання кілер-токсинів;	20.11.2023- 30.11.2023	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування;	01.12.2023- 06.12.2023	
4	Розділ 4. Обґрунтування післяферментаційних процесів;	07.12.2023- 12.12.2023	
5	Розділ 5. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з врахуванням матеріальних потоків;	13.12.2023- 15.12.2023	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання для виділення та очищення кілер-токсинів;	16.12.2023- 18.12.2023	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми процесів виділення та очищення кілер-токсинів;	19.12.2023- 25.12.2023	
8	Розділ 8. Контроль готової субстанції кілер-токсинів;	26.12.2023- 03.01.2024	
9	Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу проти кандидозу;	04.01.2024- 07.01.2024	
10	Розділ 10. Специфікація обладнання для виробництва таблеток проти кандидозу;	08.01.2024- 10.01.2024	
11	Розділ 11. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу проти кандидозу;	11.01.2024- 13.01.2024	
12	Розділ 12. Опис таблетованого лікарського засобу на основі кілер токсину згідно АНД	14.01.2024- 16.01.2024	
13	Оформлення вступу, списку літератури, пояснювальної записки	17.01.2024- 18.01.2024	
14	Оформлення графічної частини кваліфікаційної роботи	19.01.2024- 20.01.2024	

Здобувач

_____ (підпис)

Мар'яна КРАСЬКО

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Вікторія КРАСІНЬКО

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Дана кваліфікаційна робота присвячена розробці лікарського засобу на основі дріжджових кілер-токсинів, які мають високу антагоністичну активність щодо збудників кандидозу. Через поширеність цього захворювання, а також зниження ефективності наявних препаратів за рахунок механізму утворення стійкості, кілер-токсини можуть стати гарною альтернативою класичним протигрибковим препаратам.

Як біологічний агент було обрано дріжджі *Wickerhamomyces anomalus* 1F1, які за 72 години культивування синтезували 2326 од/мл кілер-токсину. Беручи до уваги ці дані, було розраховано потребу в препараті для пацієнтів з хворобами крові та ВІЛ-інфікованих, оскільки досить часто кандидоз виступає супутнім захворюванням. Річна потреба в кілер-токсині при цьому складає 401 кг.

Для виділення та очищення було обрано схему ексклюзійної хроматографії, оскільки це найкращий спосіб для очистки кілер-токсинів, який можна реалізувати в промисловому масштабі. Білковий продукт є екзометаболітом, а тому попередньо необхідно відокремити біомасу від супернатанту, який в подальшому концентрують та піддають осадженню для одержання кілер-токсину. Після стадії ресуспендування, білок очищають хроматографією та сушать у сублімаційній сушці.

Як лікарську форму було запропоновано виробництво таблеток, через зручність їх застосування для пацієнтів. Первинною упаковкою є алюмінієва стрічка з таблетками, що відноситься до сучасної форми м'якого блістера та є зручною у використанні. Готові таблетки пакують у вторинну упаковку у вигляді картонної коробки. Контроль готового лікарського засобу здійснюється за методиками, прописаними в аналітично-нормативній документації.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, 12 розділів та літератури в кількості 204 джерела. Кількість сторінок – 127. Графічна частина представлена технологічними та апаратурними схемами формату А1.

Ключові слова: резистентність, кандидоз, кілер-токсини, дріжджі, *Wickerhamomyces anomalus* 1F1, білки, таблетки

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. КІЛЕР-ТОКСИНИ ЯК ЗАСОБИ БОРОТЬБИ З ПАТОГЕННИМИ МІКРООРГАНІЗМИ.....	10
1.1. Механізм антимікробної дії кілер-токсинів.....	10
1.2. Характеристика кілер-токсинів.....	12
1.2.1. Кілер-токсини <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.2.2. Кілер-токсини, синтезовані іншими видами дріжджів.....	18
1.3. Особливості отримання та визначення активності кілер-токсинів щодо патогенних мікроорганізмів.....	24
РОЗДІЛ 2. СУЧАСНИЙ ПІДХІД ДО ОДЕРЖАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ КІЛЕР-ТОКСИНІВ.....	39
2.1. Отримання кілерних антитіл з антимікробною активністю.....	39
2.2. Від кілер-антитіл до кілер-пептидів.....	42
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ.....	48
3.1. Потреба у цільовому продукті	48
3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу.....	50
3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі кілер-токсину.....	50
3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки таблетованого препарату з кілер токсином.....	53
3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання кілер- токсину.....	56
3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.....	61
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ.....	65
4.1. Обґрунтування методу відділення супернатанту від біомаси.....	69
4.2. Обґрунтування методу концентрування фугату.....	71
4.3. Обґрунтування реагенту для осадження кілер-токсину.....	72

4.4. Обґрунтування методу відокремлення осаду кілер-токсину від спиртового розчину.....	73
4.5. Обґрунтування буферу для ресуспендування кілер-токсину.....	74
4.6. Обґрунтування буферів та смоли для хроматографії.....	74
4.7. Обґрунтування методу сушіння.....	76
РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ.....	77
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КІЛЕР-ТОКСИНІВ.....	82
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КІЛЕР-ТОКСИНІВ.....	85
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ГОТОВОЇ СУБСТАНЦІЇ КІЛЕР-ТОКСИНІВ.....	89
8.1. Визначення концентрації білку кілер-токсинів у готовій субстанції....	88
8.2. Визначення активності готової субстанції кілер-токсинів.....	91
8.3. Визначення вологості субстанції кілер-токсинів.....	93
8.4. Мікробіологічна чистота субстанції кілер-токсинів.....	94
РОЗДІЛ 9. ОБґРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ КАНДИДОЗУ.....	97
9.1. Розрахунок річної потужності виробництва препарату проти кандидозу та кількості серій на рік.....	97
9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря.....	97
9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря.....	97
9.2.2. Підготовка персоналу.....	99
9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів.....	101
9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	104
9.4. Обґрунтування вибору підготовки води.....	104
9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	107

РОЗДІЛ 10. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ТАБЛЕТОК ПРОТИ КАНДИДОЗУ.....	114
РОЗДІЛ 11. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ КАНДИДОЗУ.....	117
РОЗДІЛ 12. ОПИС ТАБЛЕТОВАНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ КІЛЕР ТОКСИНУ ЗГІДНО АНД.....	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	127
ДОДАТКИ.....	148

ВСТУП

Кандидоз - це грибкове захворювання, яке викликається дріжджеподібними грибами роду *Candida*. Найчастіше зустрічається *C. albicans*, але можуть бути збудниками і інші види *Candida*. Кандидоз може вражати різні ділянки тіла, включаючи шкіру і слизові оболонки, такі як рот, глотка, піхва, статеві органи чоловіків, кишечник, очі, вухо, ніс, та внутрішні органи, такі як легені, серце, нирки, печінка [1].

Кандидоз внутрішніх органів зазвичай розвивається у людей з ослабленим імунітетом, таких як новонароджені, люди з ВІЛ/СНІДом, онкологічними захворюваннями, прийомом кортикостероїдів або інших імуносупресивних препаратів [1].

Кандидоз шкіри зазвичай лікується місцевими протигрибковими препаратами, такими як креми, мазі, розчини. У деяких випадках може бути необхідним пероральне застосування протигрибкових препаратів. Кандидоз слизових оболонок зазвичай лікується місцевими протигрибковими препаратами, такими як свічки, вагінальні таблетки, розчини для полоскання рота, горла. У деяких випадках може бути необхідним пероральне застосування протигрибкових препаратів. Кандидоз внутрішніх органів зазвичай лікується системними протигрибковими препаратами, які приймаються всередину [1,2].

Наразі триває пошук нових препаратів проти кандидозу. Аналоги протигрибкових препаратів для цього захворювання шукають з кількох причин [1,2]:

- Зростаюча резистентність *Candida* до існуючих препаратів. *C. albicans*, найпоширеніший збудник кандидозу, поступово розвиває резистентність до протигрибкових препаратів, що використовуються для лікування кандидозу. Це означає, що ці препарати стають менш ефективними, і лікування кандидозу стає більш складним і тривалим.

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата									
Розроб.		Красько М.О.			ВСТУП				Літ.	Арк.	Аркушів		
Перевір.		Красінько В.О.									7	127	
Реценз.									Кафедра БТМ				
Н. Контр.													
Затверд.		Стабніков В.П.											

- Поява нових видів *Candida*, які викликають кандидоз. У останні роки були виявлені нові види *Candida*, які можуть викликати кандидоз. Ці види *Candida* часто мають більш високу резистентність до існуючих препаратів, ніж *C. albicans*.

- Небажані побічні ефекти протигрибкових препаратів. Протигрибкові препарати можуть викликати ряд побічних ефектів, таких як нудота, блювання, діарея, головний біль, шкірні висипання. У деяких випадках ці побічні ефекти можуть бути серйозними і вимагати припинення лікування.

Пошук аналогів протигрибкових препаратів проти кандидозу спрямований на вирішення цих проблем. Аналогічні препарати можуть бути більш ефективними проти резистентних штамів *Candida*, ефективними проти нових видів *Candida* і мати меншу кількість побічних ефектів. Дослідження аналогів протигрибкових препаратів проти кандидозу проводяться в різних напрямках. Вчені вивчають [2,3]:

- Нові механізми дії протигрибкових препаратів. Аналогічні препарати з новими механізмами дії можуть бути більш ефективними проти резистентних штамів *Candida*.

- Протигрибкові речовини, що містяться в природних продуктах. Багато природних продуктів, таких як гриби, рослини, мінерали, мають протигрибкові властивості. Вчені вивчають ці речовини з метою розробки нових протигрибкових препаратів.

- Протигрибкові препарати, спрямовані на конкретні мішені в клітинах *Candida*. Ці препарати можуть бути більш ефективними, ніж препарати з широким спектром дії.

Дріжджові кілер-токсини - це білкові екзометаболіти, які виробляються деякими видами дріжджів. Вони мають антагоністичні властивості проти інших мікроорганізмів, у тому числі фітопатогенних грибів, які викликають захворювання рослин. Дріжджові кілер-токсини були вперше виявлені в 1950-х роках у дріжджах роду *Saccharomyces*. Згодом вони були виявлені в інших родах дріжджів, включаючи *Candida*, *Kluyveromyces* та *Pichia*. Дріжджові кілер-токсини діють на чутливі мікроорганізми різними способами. Вони можуть порушувати

клітинну стінку, мембрану або ДНК мікроба. У деяких випадках дріжджові кілер-токсини можуть також викликати лізис клітини [4].

Дріжджові кілер-токсини мають потенціал для використання в різних галузях, включаючи сільське господарство, харчову промисловість та медицину. У сільському господарстві дріжджові кілер-токсини можна використовувати для біологічного контролю фітопатогенних грибів. Вони можуть бути використані для захисту рослин до або після збирання врожаю. У харчовій промисловості дріжджові кілер-токсини можна використовувати як безпечні біопресерванти. Вони можуть бути додані до харчових продуктів для запобігання росту патогенних мікроорганізмів. У медицині дріжджові кілер-токсини можна використовувати для лікування інфекцій, викликаних чутливими мікроорганізмами. Вони можуть бути використані як альтернатива традиційним антибіотикам [5].

Переваги використання дріжджових кілер-токсинів для лікування кандидозу [6]:

- Ефективність проти резистентних штамів *Candida*. Дріжджові кілер-токсини демонструють високу ефективність проти резистентних штамів *Candida*, які нечутливі до існуючих протигрибкових препаратів.
- Ефективність проти нових видів *Candida*. Дріжджові кілер-токсини також ефективні проти нових видів *Candida*, які можуть викликати кандидоз.
- Безпека. Дріжджові кілер-токсини мають низьку токсичність і добре переносяться пацієнтами.
- Можливість місцевого застосування. Дріжджові кілер-токсини можуть бути використані для місцевого лікування кандидозу, що дозволяє уникнути системних побічних ефектів.

Тому, актуальністю теми кваліфікаційної роботи є дослідження дріжджових кілер-токсинів як безпечних аналогів сучасних препаратів, які втрачають свою ефективність через утворення стійкості патогенних мікроорганізмів.

Новизною теми є застосування *Wickerhamomyces anomalus* 1F1, як біологічного агента для синтезу дріжджового кілер-токсину з високою антагоністичною дією проти патогенних дріжджів виду *Candida* [7].

РОЗДІЛ 1

КІЛЕР-ТОКСИНИ ЯК ЗАСОБИ БОРОТЬБИ З ПАТОГЕННИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ

1.1. Механізм антимікробної дії кілер-токсинів

Деякі дріжджі мають потенційну здатність синтезувати білки або глікопротеїни, що є смертельними для чутливих штамів дріжджів, а також деяких грибів та бактерій. Такі речовини білкового походження отримали назву кілер-токсинів. На сьогодні відомо, що фенотип кілера широко поширений серед багатьох дріжджів, зокрема вбивчу активність здатні проявляти понад 100 видів дріжджів, що належать до більш ніж сорока родів [8, 9].

Кілер-системи дріжджів були відкриті відносно нещодавно, порівняно з антагоністичними системами бактерій та інших грибів, а тому значну частину інформації, яка стосується синтезу кілер-токсинів та механізмів їх дії ще необхідно розкрити на молекулярному рівні з точними деталями [10]. Проте в ході вже проведених досліджень було встановлено, що виділені кілер-токсини відрізняються між собою не лише фізико-хімічними властивостями, але й механізмами розпізнавання та знищення чутливих клітин [11].

Так, вбивча дія кілер-токсинів щодо чутливих мікроорганізмів характеризується двоетапним механізмом, опосередкованим рецепторами. Під час першого етапу кілер-токсин розпізнає та зв'язується з первинним рецептором на клітинній стінці чутливої мішені [11, 12]. Такими первинними рецепторами можуть виступати: β -1,6-глюкан для кілер-токсинів K1 та K2 *S. cerevisiae* [13]; β -1,3-глюкан, який діє як первинний рецептор для токсину *W. anomalus* ATCC 96603 [14]; манопротеїн є рецептором для кілера K28 *S. cerevisiae* і токсину *Pichia membranifaciens* CYC1086 та хітин, який слугує рецептором для токсину *Debaryomyces robertsiae* CBS6693 та зимоцину *K. lactis*. Даний етап не потребує витрат енергії, а отже є енергонезалежним [13, 15, 16].

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Красько М.О.				РОЗДІЛ I КІЛЕР-ТОКСИНИ ЯК ЗАСОБИ БОРОТЬБИ З ПАТОГЕННИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ		Літ.	Арк.
Перевір.	Красінко В.О.							Аркушів
Реценз.								10
Н. Контр.								127
Затверд.	Стабніков В.П.						Кафедра БТМ	

Другий, енергозалежний етап полягає у переміщенні токсину на цитоплазматичну мембрану чутливого мікроорганізму для наступної взаємодії з вторинними рецепторами. Даний етап є менш охарактеризованим, а тому вторинні рецептори відомі або припущені для досить небагатьох кілер-токсинів [12]. Так, на сьогоднішній день точно ідентифіковано лише мембранний рецептор для токсину K1 *S. cerevisiae* – Krel, О-глікозилований поверхневий білок дріжджової клітини, який прикріплений до плазматичної мембрани через глікозилфосфатидилінозитоловий (GPI) якір та бере участь у синтезі β -1,6-глюкану. Також існують припущення, що вторинним рецептором для токсину K28 може бути HDEL Erd2p, який у низькій кількості копій локалізується на цитоплазматичній мембрані. Також було виявлено, що білок плазматичної мембрани Cwp2p з молекулярною масою 11,7 кДа та його GPI-закріплений попередник можуть виступати як первинні рецептори для токсину РМКТ, синтезованого *P. membranifaciens*. Варто додати, що взаємодія між кілер-токсинами та плазматичною мембраною чутливої мішені може безпосередньо залежати від їх заряду. Зазвичай кілер-токсини мають позитивний заряд, тоді як плазматична мембрана чутливих клітин заряджена негативно, завдяки цьому токсини можуть мати певну спорідненість зі вторинними рецепторами, що сприятиме їх адсорбції на цільовій мембрані чутливих клітин. З цього можна зробити висновок, що мікроорганізми з більш негативно зарядженою мембраною будуть більш сприйнятливі до дії кілер-токсинів. Подібним чином, токсини, що матимуть більш позитивно заряджені амінокислотні залишки проявлятимуть сильнішу вбивчу дію проти чутливих клітин. Такого ефекту можна досягти завдяки мутаціям клонованого гену кілер-токсинів [13, 17].

Після зв'язування зі вторинними рецепторами кілер-токсини потрапляють у чутливі клітини та знищують їх за допомогою різних механізмів. До них відносять: пошкодження цитоплазматичної мембрани: після досягнення мембрани деякі токсини чинять летальний ефект шляхом утворення іонних каналів з наступним порушенням цілісності і функцій мембрани, при цьому спостерігається вивільнення калій йодиду, АТФ та інших метаболітів; пригнічення синтезу ДНК та

блокування клітинного циклу: відомо, що токсин K28 проникає у чутливу дріжджову клітину шляхом ендоцитозу та проходить шлях секреції в зворотному напрямку, після чого потрапляє в цитозоль та передає свій токсичний сигнал у ядро дріжджової клітини, в результаті спостерігається пригнічення реплікації ДНК, викликаючи зупинку клітинного циклу на ранній S-фазі; атака тРНК: кілер-токсин *P. inositolovora*, націлений на тРНК, спричиняє блокування трансляції та зупинку клітинного циклу на фазі G1. Крім того, у деяких випадках токсини, в тому числі й кілер НМ-1 *H. mrakii*, проявляють β -глюканазну активність та можуть перешкоджати синтезу клітинної стінки шляхом інгібування β -1,3-глюкансинтази або гідролізу основних компонентів клітинної стінки чутливих клітин, що призводить до лізису клітини [11-13].

Незважаючи на одноклітинний спосіб життя дріжджів, відомо, що деякі з них піддаються програмованій клітинній смерті за різних умов, включаючи вплив екзогенних та ендогенних стресів [18]. Одним із механізмів дії кілер-токсинів є здатність індукувати програмовану клітинну смерть у чутливих штамів клітин, що проявляється типовими цитологічними маркерами апоптозу, такими як фрагментація ДНК, конденсація хроматину, вплив фосфатидилсерину на зовнішню поверхню плазматичної мембрани, накопичення активних форм кисню (АФК) та фенотипічні зміни. При цьому важливим є те, що апоптотична загибель клітин була викликана низькими дозами кілер-токсинів, тоді як високі концентрації токсинів запобігають апоптозу та викликають некротичну загибель клітин за допомогою різних токсичних стратегій, розглянутих вище. Ґрунтуючись на всіх цих спостереженнях, можна зробити висновок, що в природному середовищі існування дріжджів, де концентрація токсину зазвичай низька, індукція апоптозу відіграє вирішальну роль у ефективному токсин-опосередкованому знищенні клітин [17, 19].

1.2. Характеристика кілер-токсинів

1.2.1. Кілер-токсини *Saccharomyces cerevisiae*

Вперше кілерний фенотип був досліджений у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у 1963 році Беваном та Маковером. На конференції в Нідерландах ними

були описані антагоністичні взаємодії між штамами *S. cerevisiae* і потенційними конкурентами на основі виділених токсинів [19]. Саме тому на сьогодні найбільш вивченими вважаються кілер-токсини, продуцентами яких є дріжджі *S. cerevisiae*.

Грунтуючись на деяких кілерних характеристиках, таких як молекулярна структура та механізм знищення чутливих клітин, токсини *S. cerevisiae* були розділені на 4 типи: K1, K2, K28 та Klus [20]. Незабаром після проведення початкових досліджень феномена кілера у деяких родів дріжджів, було встановлено, що за експресію фенотипу кілера можуть відповідати позахромосомні вірусоподібні дволанцюгові РНК (дцРНК), також фенотип-кілер може кодуватись хромосомними генами чи лінійними плазмідами дволанцюгових ДНК [21]. Відомо, що кілерний фенотип у *S. cerevisiae* викликають два окремо інкапсульовані віруси дцРНК сімейства *Totiviridae*, такі як LA та його сателітний вірус М, які постійно присутні в цитоплазмі інфікованих дріжджових клітин у вигляді вірусоподібних часток [22, 23]. LA являє собою хелперний вірус довжиною 4,6 кб. Лінійний геном LA має дві відкритих рамки зчитування на кодуючому ланцюзі, ORF1 та ORF2. Основний капсидний білок Gag масою 76 кДа кодується ORF1 та необхідний для правильної інкапсуляції дцРНК і утворення необхідної структури вірусоподібних часток. ORF2 кодує РНК-залежну-РНК-полімеразу (Pol), яка транслюється як сумісний білок Gag-Pol з молекулярною масою 180 кДа, який забезпечує транскрипцію та реплікацію віруса [21]. Отже, вірус М є неавтономним і як класичний сателіт потребує присутності хелперного вірусу LA для стабільної підтримки та реплікації в цитоплазмі клітини-господаря [24].

В залежності від типу токсину, що кодується, віруси М поділяються на M1, M2, M28 і Mlus розміром 1,6, 1,5, 1,8 та 2,2 кб відповідно. Відомо, що чотири генома М, що кодують відповідний специфічний токсин, не зустрічаються в одній клітині одночасно, виключаючи один одного за допомогою невідомого механізму [23]. Тільки один ланцюг (позитивний) М-вірусу володіє кодуючою здатністю і містить єдину відкриту рамку зчитування (ORF), яка кодує препротоксин. Також, вважається, що даний вірус бере участь у забезпеченні імунітету клітини-продуцента до власного токсину, проте дана теорія ще не є підтвердженою [21].

Отже, первинним генним продуктом дцРНК є препротоксин – білок, який є непроцесованим попередником зрілого токсину та має пройти певний секреторний шлях для подальшого процесингу з метою отримання необхідного кілера. Серед кодованих вірусом токсинів-кілерів *S. cerevisiae*, білки K1 та K28 є найбільш вивченими. Хоча обидва токсини значно відрізняються за своїм амінокислотним складом і молекулярним способом дії, проте вони є досить подібними за механізмами їх синтезу, процесингу та секреції, а тому і будова їх препротоксинів є дуже подібною [25]. Так, попередник складається з N-кінцевої сигнальної послідовності, необхідної для імпорту білка в просвіт ендоплазматичного ретикулума, за яким розташовані дві субодиниці зрілого токсину – альфа і бета. Ці субодиниці відокремлені між собою за допомогою N-глікозильованої гама-послідовності, яка, ймовірно, сприяє правильній укладці попередника і утворенню дисульфідних зв'язків між альфа- та бета ділянками. Після проникнення в ендоплазматичний ретикулум, сигнальний пептид видаляється шляхом розщеплення сигнальною пептидазою, далі відбувається N-глікозилювання гама-послідовності з утворенням одинарного дисульфідного зв'язку для токсину K28 та потрійного – для білку K1. В подальшому попередник транспортується до апарату Гольджі, де піддається додатковим стадіям процесинга за участю пептидаз Kex1p та Kex2p. В результаті отриманий зрілий токсин, що складається з альфа та бета субодиниць, з'єднаних ковалентним зв'язком, секретується в позаклітинний простір [20, 21, 26]. Токсин K2 не був охарактеризований так широко, як два попередні, проте за деякими дослідженнями вважається, що його попередник не містить N-глікозильованої гама-послідовності, оскільки припущено, що зрілий токсин складається лише з однієї субодиниці [27].

Зі структурної точки зору всі токсини-кілери можна згрупувати в 3 класи: невеликі білки з однією субодиницею, гетеродимерні білки та мультидимерні білкові комплекси. Так зрілий токсин K1 є гетеродимерним білком та складається з двох субодиниць: α з молекулярною масою 9,5 кДа та β з молекулярною масою 9 кДа. Токсин K2 являє собою білок з молекулярною масою 21,5 кДа. Білок K28, що

виділяється дріжджами *S. cerevisiae*, має дві субодиниці - α (10,5 кДа) та β (11 кДа) [19].

Незважаючи на те, що будова препротоксину екзометаолітів K1 та K28 є подібною, механізм їх дії значно відрізняється. Так, токсин K1 першочергово зв'язується з β -1,6-глюканом на клітинній стінці рН-залежним чином, після цього K1 взаємодіє з рецепторним білком Krel на плазматичній мембрані, викликаючи утворення іонних каналів або альтернативно активує калієві канали Tok1. Ця стадія є енергозалежною і приводить до неконтрольованого витоку K^+ , H^+ та АТФ з цитоплазми, що інгібує транспорт амінокислот і порушує електрохімічні іонні градієнти через плазматичну мембрану. Подібний механізм дії передбачається й для токсину K2 [22]. Натомість кілер-токсин K28 зв'язується з α -1,3-манопротейном в якості первинного рецептора, після цього відбувається його взаємодія з мембранним рецептором Erd2p з наступним проникненням в клітину шляхом ендоцитозу, там токсин паразитує на ретроградному секреторному шляху. Після транслокації кілер-токсина з ендоплазматичного ретикулуму в цитозоль, β -субодиниця піддається протеасомній деградації, тоді як α -субодиниця проникає в ядро і викликає зупинку клітинного циклу та блокування синтезу ДНК [23, 25]. Кілер-токсин Klus було ідентифіковано зовсім нещодавно, тому механізм його дії ще достеменно не вивчено [22].

Активність більшості токсинів *S. cerevisiae* є стабільною у вузькому діапазоні рН (3,5 – 5,0) та температури (18 – 28°C) та значно знижується з підвищенням зазначених показників [20, 28]. Узагальнені дані щодо характеристики відомих типів кілер-токсинів *Saccharomyces cerevisiae* наведені в таблиці 1.1.

Деякими вченими проведено дослідження, метою якого було охарактеризувати токсин-кілер *S. cerevisiae* Y500-4L, зокрема провести визначення його молекулярної маси та умов, за яких кілер-токсин проявляв максимальну стабільність і активність. Так, молекулярна маса очищеного токсину була оцінена

Таблиця 1.1.

Характеристика кілер-токсинів *S. cerevisiae*

Тип токсину	Молекулярна структура	Первинні рецептори	Вторинні рецептори	Механізм знищення чутливих клітин	Віруси-детермінанти фенотипу кілера
K1	Гетеродимерний білок, що складається з двох субодиниць: α (9,5 кДа) та β (9 кДа)	β -1,6-глюкан	Мембранний рецептор Krel	Мембранна пермеабілізація	Хелперний вірус LA та сателітний вірус M1 (1,6 кб)
K2	Білок, представлений однією субодиницею молекулярною масою 21 кДа	β -1,6-глюкан	Не досліджено	Мембранна пермеабілізація	Хелперний вірус LA та сателітний вірус M2 (1,5 кб)
K28	Гетеродимерний білок, що складається з двох субодиниць: α (10,5 кДа) та β (11 кДа)	α -1,6-манопро-теїн	Мембранний рецептор Erd2p	Пригнічення синтезу ДНК і блокування клітинного циклу	Хелперний вірус LA та сателітний вірус M28 (1,8 кб)
Klus	не досліджено				Хелперний вірус LA та сателітний вірус Mlus (2,2 кб)

в 43 кДа за допомогою гель-фільтрації Sephadex G-100. Також, завдяки електрофорезу в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (SDS-PAGE) була отримана одна смуга близько 18-20 кДа, що може свідчити про те, що синтезований токсин є димерною молекулою. Стабільність та активність кілер-токсину визначали шляхом культивування сконцентрованого та профільтованого через мембрани з розміром пор 45 мкм зразку за різних значень рН та температури. Так, токсин був найбільш стабільним в діапазоні рН від 3,8 до 4,5 та зберігав 80% своєї активності після інкубації протягом 24 год за рН 2,0-3,5 та температури -10°C. При 8°C та рН 2,0-5,4 токсин-кілер зберігав 50-60% своєї активності, 35% активності спостерігалось за наступних умов інкубування: рН – 2,0-4,5, температура – 25°C. Токсин інактивувався при культивуванні в середовищі з рН 6,0-8,0 за температури 8°C та -10°C. Також повне інактивування кілер-токсину спостерігалось після нагрівання при 40°C та рН 4,1 протягом 1 години, що

демонструє нестабільність до температур вище 38°C, яка властива більшості кілер-токсинам *S. cerevisiae* [28].

Відомо, що штами-продуценти кілер-токсинів стійкі до свого власного токсину, а також до токсинів, що належать до одного й того ж типу. Натомість токсини активні щодо штамів, котрі не є кілерами та тих, що належать до продуцентів інших типів токсинів. Так, було досліджено вплив токсину K2, продуцентом якого є штам *S. cerevisiae* V10-25-16, на життєздатність клітин штаму *S. cerevisiae* α'1, не здатного до утворення токсину, а також на штами, що виділяють токсини K1 та K28. Екзометаболіт K2 отримували шляхом культивування *S. cerevisiae* V10-25-16 на синтетичному середовищі при рН 4,4 та температурі 18°C протягом 4 днів з обережним перемішуванням. Визначення активності концентрованого кілер-токсину щодо чутливих штамів проводили методом лункового аналізу. В ході дослідження було встановлено, що додавання до середовища очищеного токсину K2 знижувало кількість життєздатних клітин штаму α'1 на один порядок вже протягом 30 хв, тоді як кількість клітин кілерних штамів K1 та K28 після впливу токсину K2 знижувалась на порядок аж через 1,5 та 3,5 години відповідно, і залишались на тому ж рівні до кінця дослідження. Отже, штами-кілери K1 та K28 були менш чутливі до токсину K2, ніж штам α'1. Тому вважається, що кілерні системи K1 та K28 можуть забезпечувати частковий захист від токсину K2 [22].

Також було досліджено токсини, продуцентами яких є штами *S. cerevisiae* CF8 і *S. cerevisiae* M12, виділені з виноробних регіонів Аргентини. Було визначено, що обидва токсини були активними при значеннях рН від 2,5 до 5,0 з оптимальною активністю при рН 3,5. Оптимальна температура для токсинів становила 10 – 20°C. Стабільність токсинів перевіряли при 98°C протягом 1 години. В результаті спостерігалось, що кілер-токсини CF8 і M12 втрачали за таких умов 10 і 30% кілерної активності відповідно, це вказує, що обидва кілер-токсини є термостабільними порівняно з іншими кілерами *S. cerevisiae*. Також, було визначено, що штами-продуценти не містили молекул дцРНК, а тому було припущено, що генетична детермінанта фенотипу кілера могла бути хромосомно

закодована. За допомогою специфічних праймерів було визначено присутність хромосомних генів KHR і KHS, що підтвердило попередню теорію. Отже, токсини *S. cerevisiae* CF8 і *S. cerevisiae* M12 на сьогодні є єдиними токсинами *S. cerevisiae*, кодованими хромосомами [29].

Як вже зазначалось, відносно нещодавно було ідентифіковано кілер-токсин Klus, який було виділено вперше з винних дріжджів виноградарників в Іспанії. Було встановлено, що продуценти даного токсину здатні спричиняти загибель інших дріжджів *S. cerevisiae*, котрі секретують токсини типу K1, K2 та K28. Такі дані були поштовхом до пошуку нових кілерних токсинів дріжджів *S. cerevisiae*, і не тільки, здатних володіти раніше не описаними властивостями. З цією метою з різноманітних ягід та фруктів було виділено нові штами *S. cerevisiae* Kx, здатні синтезувати, на думку науковців, раніше невідомий кілер-токсин. Така думка склалась за рахунок того, що виділений токсин в незначних концентраціях здатен пригнічувати штами-продуценти токсинів K1, K2 та K28, крім того спостерігалось, що форма зон лізису була спотворена, а дія токсинів K1, K2 і K28 була пригнічена, це свідчить, що штамом Kx, котрий володіє слабкими кілерними властивостями здатен пригнічувати стандартну дифузцію токсинів *S. cerevisiae* в середовище та їх вбивчу здатність. У випадку стандартних взаємодій токсинів-кілерів таке явище ніколи не спостерігалось. Також з клітин було виділено дцРНК, яка за будовою була подібна до таких у інших штамів, проте розмір вірусу М складав 2,5 кб, що й свідчило про відмінність кодованого токсину. Проте такі відкриття потребують подальших більш детальних досліджень [30, 31].

1.2.2. Кілер-токсини, синтезовані іншими видами дріжджів

Незважаючи на те, що кілер-токсини *S. cerevisiae* вважаються найбільш вивченими, з моменту першого відкриття кілерного фенотипу у дріжджів відмінних видів та родів було проведено ряд досліджень з метою виділення та характеристики їх токсинів-екзометаболітів, які відрізняються за молекулярною масою, механізмами дій та умовами, за яких проявляють максимальну активність та стабільність.

Так, здатність синтезувати кілер-токсини була виявлена у дріжджів *Schwanniomyces occidentalis*. Основною метою дослідження [32] було проведення ідентифікації отриманого токсину та встановлення оптимальних умов його активності та стабільності. Результати показали, що отриманий токсин є гетеродимерною молекулою та складається з двох субодиниць з молекулярною масою 7,4 та 4,9 кДа. Кілерна активність токсину повністю втрачалась після інкубування його з папаїном та пепсином, що підтверджувало білкову природу синтезованого екзометаболіту. Найвища активність токсину спостерігалась при рН 4,2 – 4,8. Білок-кілер був стабільним в діапазоні рН від 2,0 до 5,0 протягом щонайменше 8 годин. 50% активності втрачалось протягом 8 годин при рН 5,0 та температурі 24°C. Повна втрата активності спостерігалась при рН 6,0. Також білок залишався стабільним при 20 та 30°C протягом 8 годин, натомість при 40°C повністю інактивувався впродовж 1 години. Також було визначено, що фенотип кілера у даного продуцента є хромосомно закодованим, а первинним рецептором на клітинній стінці чутливих клітин може виступати манан.

Кілер-токсин *Pichia kudriavzevii* RY55 складається з однієї субодиниці, молекулярна маса якої складає 39,8 кДа. Очищений токсин виявляв максимальну активність при температурі 30°C та рН 5,0, однак значну активність спостерігали також при 20, 25 і 37°C та рН 4,6 і 7. Аналіз температурної стабільності екзометаболіту показав, що токсин є абсолютно стабільним за температури 4°C протягом 60 днів. Понад 90% активності зберігалось при 20°C протягом 24-48 годин. Хороша стабільність спостерігалась при 30°C, проте досить короткі періоди часу (15-30 хв). За температури вище 50°C активність токсину не була виявлена. Аналіз рН стабільності продемонстрував, що токсин є стабільним в широкому діапазоні рН (2-6), але протягом початкових 15-30 хвилин інкубації. Також було проаналізовано вплив різних добавок на активність очищеного токсину. Так, Mn^{2+} , Fe^{2+} і Zn^{2+} викликали значне зниження активності, тоді як ЕДТА та SDS повністю інгібують вбивчу активність кілеру [33].

Також, були проведені дослідження, щоб охарактеризувати кілер-токсин K-500, продуцентом якого є дріжджі *Williopsis mrakii* NCYC 500. Аналіз показав, що

молекулярна маса токсину коливається в межах 1,8 – 5 кДа, що значно менше, ніж для будь-якого іншого токсину, про який повідомлялося раніше. Також, було встановлено, що отриманий токсин залишався стабільним при температурі 4° протягом 24 годин, натомість стабільність знижувалась при підвищенні температури інкубації і повністю втрачалась протягом 7 – 24 годин за температури 37°C. Інактивація токсину спостерігалась за температури вище 50°C та рН вище 4,0, проте токсин залишався стабільним протягом 18 годин в діапазоні рН 2,4-4,0. Точний механізм дії кілер-токсину К-500 по відношенню до чутливих клітин ще не є вивченим, проте існують деякі припущення, що токсин утворює канали, сприяючи втраті іонів, що зрештою призводить до загибелі чутливих мікроорганізмів. Аналіз пошкодження мембрани в дослідженні [34] продемонстрував, що екзометаболіт К-500 дійсно порушує проникність мембрани чутливих дріжджів, викликаючи вивільнення радіоактивної міченої амінокислоти. А отже, це може свідчити, що його механізм подібний до такого у токсину К1.

В дослідженні [35] зазначається, що кілер-токсин КТ4561, який синтезується дріжджами *Williopsis saturnus* DBVPG 4561, має молекулярну масу близько 62 кДа. Виявлено, що очищений токсин, на відміну від інших, є активним в межах широкого діапазону температур (5 – 45°C) та рН (4,5 – 8,0). Крім того, після теплового шоку при 100°C протягом 10 хв активність токсину лише незначно знизилась. Такі дані зацікавили науковців, адже це один з небагатьох токсинів, який є активним при фізіологічних для людського тіла значеннях рН та температури, тому подальші дослідження були присвячені вивченню його антимікробних властивостей.

Визначено, що деякі штами морських дріжджів також здатні синтезувати кілер-токсини, не виключенням є й дріжджі *Williopsis saturnus* WC91-2 морського походження, у яких кілерний фенотип закодований хромосомними генами. Молекулярна маса очищеного токсину за даними SDS-PAGE оцінювалась в 11 кДа. Після вивчення впливу різних значень температури, рН на активність і стабільність кілер-токсину, було встановлено, що оптимальним для кілерної активності є рН 3,5 та температура 16°C. При цьому токсин залишався стабільним при рН 3,0 – 4,0 та

температурі нижче 35°C. Кілерна активність повністю втрачалась за температури 40°C та pH вище 4,0. Такі дані показують, що даний токсин є досить чутливим до високої температури і холодоактивним [36].

Галотолерантні дріжджі *Debaryomyces hansenii* CYC 1021 та *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238 також здатні виділяти кілер-токсини, які кодовані хромосомними генами та належать до низькомолекулярних білків з молекулярною масою близько 23 кДа. Дослідження кілер-токсину *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238 були спрямовані переважно на вивчення його антимікробної активності, тоді як кілер-токсини *Debaryomyces hansenii* CYC 1021 були більш широко охарактеризовані щодо умов їх активності та стабільності. Так, при температурі 15°C і нижче активність токсину залишалась стабільною протягом тижня, тоді як інкубація за температури 20°C протягом 5 днів призводила до значного зниження активності на 25%. За витримування токсину при температурі 30°C і pH 4,0 протягом 24 годин більше половини активності було втрачено. Оптимальними для токсину були кислі значення pH, тобто він залишався стабільним при pH 4,5 та нижче, натомість при pH 5,1 спостерігалась його інактивація. Стосовно механізму дії токсинів *D. hansenii* відомо лише, що первинним рецептором для них виступає β -1,6-глюкан [37, 38].

СпКТ – це кілер-токсин, що продукується галотолерантними дріжджами *Candida nodaeensis*. У штаму-продуцента здатність до синтезу даного токсину кодується хромосомними генами. Молекулярна маса та механізм дії токсину СпКТ залишаються ще не вивченими, проте було проведене дослідження [39] з метою визначення основних властивостей кілер-токсину. Так, СпКТ залишався стабільним, тобто проявляв однаковий ступінь активності, при інкубуванні протягом 7 днів за температури від 0 до 30°C, втрачаючи активність між 37 і 40°C. При більш коротких термінах токсин залишається стабільним за більш високих температур та інактивується при температурі, що перевищує 50°C. Варто додати, що при зберіганні токсину за температури -80 та -20°C протягом 7 днів його активність залишалась незмінною. Крім того, стабільність токсину спостерігалась при досить широкому діапазоні pH – від 2,6 до 7,6, що не є властиво для більшості

охарактеризованих токсинів. Також на активність токсину позитивно впливало додавання до середовища 0,5 або 1М NaCl, це дозволяло подовжувати термін стабільності токсину за температур, що перевищували 37°C. Отже, за результатами проведено дослідження можна зробити висновок, що токсин *C. nodaensis* є досить стійким та здатен витримувати досить різноманітні та агресивні умови навколишнього середовища.

Високу здатність виробляти кілер-токсини мають дріжджі *Wickerhamomyces anomalus*. Зокрема, штам морського походження *W. anomalus* YF07b, виділений з кишківника асцидії, продукує кілер-токсин з молекулярною масою 67 кДа, для якого оптимальною є температура 16°C та рН 3,5. Токсин залишався стабільним за температури нижче 40°C, при її підвищенні активність токсину різко знижувалась до повної втрати при 50°C. Також, кілер-токсин залишався стабільним за рН нижче 6,5. Позитивно на активність екзометаболіту впливала присутність в середовищі NaCl в концентрації 4,0%. При дослідженні механізму дії, результати показали, що ламінарин (β -1,3-глюкан), манан та хітин не розщеплюються кілер-токсином, це свідчить, що основним первинним рецептором у клітинній стінці чутливих клітин може виступати β -1,6-глюкан. Також встановлено, що основним механізмом знищення мікроорганізмів даними токсинами є пошкодження плазматичної мембрани чутливих клітин. Це свідчить, що за механізмом дії даний білок є подібним до токсину K1 [40].

Також, в дослідженні [41] було охарактеризовано мікоцин *W. anomalus* tp2-15, основні характеристики якого наведені в узагальнюючій таблиці 1.1.

Дослідження [42] було спрямоване на характеристику кілер-токсину *Kluyveromyces siamensis* HN12-1. SDS-PAGE використовували для оцінки молекулярної маси очищеного токсину, в результаті було встановлено, що білок є мономером з масою 66,4 кДа. Також, дослідження продемонструвало, що кілер-токсин характеризувався знищувальною активністю лише по відношенню до цілих клітин чутливих мікроорганізмів, але не мав знищувальної активності щодо протопластів дріжджів, що в свою чергу підтверджує, що клітинна стінка є

необхідною для дії токсину-кілера. Найвища активність кілер-токсину спостерігалась за температури 25°C та pH 4,5.

Дріжджі *Metschnikowia saccharicola* продукують кілер-токсин, який являє собою мономерний білок з молекулярною масою 47 кДа. Властивості токсину стосовно активності та стабільності були подібні до таких у токсинів *W. anomalus* YF07b та представлені в таблиці 1.1. Як і в попередньому дослідженні, було доведено, що механізм дії даного токсину пов'язаний з первинною дією на рецептори клітинної стінки чутливих мікроорганізмів [43].

Феномен кілера у дріжджів *Pichia membranifaciens* вивчався протягом декількох років. За цей період було описано два токсини РМКТ та РМКТ2, що продукуються штамами *P. membranifaciens* CYC 1106 та *P. membranifaciens* CYC 1086 відповідно. Синтезовані токсини являють собою білки з низькою молекулярною масою – 18 кДа для токсину РМКТ та 30 кДа для токсину РМКТ2, виробництво яких кодується хромосомами. Механізм дії даних токсинів щодо чутливих мікроорганізмів також був детально вивченим. Так, кілер РМКТ першочергово зв'язується з β -1,6-глюканом, розташованим на поверхні клітинних стінок чутливих клітин, при цьому адсорбція токсину на очищених глюканах відбувалась протягом перших двох хвилин контакту, що підтверджує енергонезалежність даного процесу. Вторинним рецептором для дії токсину слугує білок Cwr2p. Нарешті, досягнувши цитоплазматичної мембрани, кілер-токсин спричиняє її руйнування з наступним утворенням катіонних каналів та порушенням трансмембранних градієнтів, що призводить до загибелі чутливих клітин. Натомість механізм дії токсину РМКТ2 дещо відрізняється, так первинним рецептором для нього слугує манопротейн. На сьогодні досі невідомо, що виступає вторинним рецептором для токсину РМКТ2, а тому дослідження для його встановлення ще продовжуються. Знищення чутливих клітин відбувається шляхом зупинки їх клітинного циклу у фазі G1/S. Незважаючи на відмінності в молекулярній масі та механізмах дії, обидва кілер-токсини є подібні в своїй поведінці при різних значеннях температури та pH. Так, токсин РМКТ був стабільний в діапазоні pH 3,0 – 4,8 та швидко інактивувався за температури вище

20°C. РМКТ2 мав фізико-хімічні властивості, подібні з РМКТ, тобто він був активний за кислих значень рН від 2,5 до 4,8 і за температури нижче 20°C, проте даний токсин є менш лабільним при більш високих температурах та нейтральних значеннях рН протягом коротких періодів часу. Такі, хоч і незначні відмінності вказують на їх біохімічну різноманітність [44].

Узагальнена характеристика всіх представлених кілер-токсинів наведена в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2

**Характеристика кілер-токсинів,
синтезованих різними видами дріжджів**

Продуцент	Молекулярна маса токсину, кДа	Стабільність кілер-токсину		Джерело
		рН	Температура	
<i>P. kudriavzevii</i> RY55	38,9	5,0	4°C (60 днів)	[33]
<i>S. occidentalis</i> ATCC4425	4,9; 7,4	2,0 – 5,0	20 – 30°C	[32]
<i>W. mrakii</i> NCYC 500	1,8 – 5	2,4 – 4,0	4°C, вище 50°C – інактивується	[34]
<i>W. saturnus</i> DBVPG 4561	62	4,5 – 8	5 – 45°C	[35]
<i>W. saturnus</i> WC91-2	11	3,0 – 4,0	<35°C	[36]
<i>D. hansenii</i> CYC 1021	22	4,0 – 4,5	15°C	[38]
<i>W. anomalus</i> YF07b	67	<6,5	<40°C	[40]
<i>W. anomalus</i> tp12-5	45-50	3,0 – 6,0	4 – 37°C	[41]
<i>P. membranifaciens</i> CYC 1106	18	3,0 – 4,8	20°C	[44]
<i>P. membranifaciens</i> CYC 1086	30	2,5 – 4,8	<20°C	[44]
<i>M. saccharicola</i>	47	4,0 – 6,5	0 – 40°C	[43]

З наведених даних, можна зробити висновок, що існує велике різноманіття кілер-токсинів, які відрізняються за молекулярною масою, проте переважна більшість належить до низькомолекулярних білків, які залишаються стабільними за кислих значень рН та низьких температур, що не перевищують 40°C. Механізм дії кілер-токсинів також дещо відрізняється, але невід'ємними етапами для їх активності є зв'язування з первинними та вторинними рецепторами чутливих клітин.

1.3. Особливості отримання та визначення активності кілер-токсинів щодо патогенних мікроорганізмів

На сьогодні дріжджові кілер-токсини викликають значний інтерес завдяки тому, що володіють широким спектром активності щодо мікробних патогенів, здатних спричиняти захворювання людей та тварин. Це, в свою чергу, провокує проведення ряду досліджень з метою встановлення можливості потенційного використання кілер-токсинів в медичній галузі та інших перспективних напрямках, зокрема у фармацевтичній промисловості [9, 12].

Багато хвороб морських тварин спричиняються морськими бактеріями та вірусами, проте протягом останніх років було встановлено, що й деякі види дріжджів є патогенними для морських тварин. Такі дріжджові захворювання спричиняють великі економічні втрати в морській промисловості, тому необхідним є пошук методів та речовин для боротьби з ними. Було встановлено, що молочну хворобу у краба викликаються дріжджі *Metschnikowia bicuspidate*. Спалах цього захворювання призвів до високої смертності краба та великих економічних втрат. При цьому всі використовувані анти-дріжджові сполуки – ністатин, бензалконію бромід і екстракт кореня золотухи та часнику були активними щодо патогенних дріжджів, проте виявились токсичними й для самого краба. Виходом з цієї ситуації може слугувати використання кілер-токсинів в якості альтернативних засобів [45, 46].

Основною метою дослідження [45] було виявити серед дріжджів морського походження штами, здатні до синтезу кілер-токсину з антимікробною активністю, аби в подальшому використати отримані знання для розробки ефективного засобу, спрямованого на запобігання зараженню краба патогенними дріжджами. В результаті було встановлено, що 17 штамів морських дріжджів, які були виділені з морської води, осадів, солончакового мулу, кишківника морської риби та морських водоростей, здатні синтезувати кілер-токсини, активні проти *M. bicuspidate* WCY. Після висіву досліджених суспендованих клітин морських дріжджів на середовище, попередньо засіяне патогенним мікроорганізмом, найвищою антимікробною активністю, яка визначалася за відношенням діаметру зони до

діаметра колонії та перевищувала значення 1,5, володіли п'ять штамів: *Williopsis saturnus* WC91-2, *Pichia guilliermondii* GZ1, *Pichia anomala* YF07b, *Debaryomyces hansenii* hcx-1, *Aureobasidium pullulans* HN2.3. Такі дані свідчать, що серед усіх штамів, ізолюваних з морського середовища, саме п'ять були здатні виробляти відносно більшу кількість кілер-токсину проти патогенних дріжджів *M. bicuspidate* WCY.

Деяких вчених зацікавив штам *Williopsis saturnus* WC91-2, а саме його здатність синтезувати високий рівень кілер-токсинів. Були визначені оптимальні умови культивування морського штаму, які наведені в таблиці 1.2. Проте основною метою проведеного дослідження було визначення активності отриманих концентратів кілер-токсину. Вбивчу активність екзометаболіту вимірювали за допомогою дифузійного тесту з використанням стерильних оксфордських чашок діаметром 6 мм, котрі розміщували на середовищі для аналізу, яке було засіяне відповідними тест-штамами дріжджів (*M. bicuspidate* WCY, *Cryptococcus aureus*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*). Після цього в кожену чашку додавали 200 мкл концентрованого або очищеного кілер-токсину та інкубували при 16°C протягом 72 годин. За міру активності приймали діаметр зони інгібування чутливих штамів. За результатами було встановлено, що кілер-токсин, окрім дії на *M. bicuspidate* WCY, проявляв активність й проти *Cryptococcus aureus*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica*, що свідчить про досить широкий спектр його активності [36].

За схожим механізмом було проаналізовано активність кілер-токсинів, синтезованих дріжджами *Mrakia frigida* 2E00797 та *Kluyveromyces siamensis* HN12-1. При цьому очищений токсин *M. frigida* 2E00797 проявляв активність лише по відношенню до чутливих дріжджів, таких як *M. bicuspidate* WCY, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, серед усіх видів мікроорганізмів, протестованих у дослідженні [40], тоді як кілер-токсин *Kluyveromyces siamensis* був активний лише проти патогенного для крабу штаму *M. bicuspidate* WCY, що свідчить про досить низький спектр активності даних токсинів, порівняно з кілером *W. saturnus* WC91-2 [42].

Дещо пізніше було встановлено, що ще один штам морських дріжджів, а саме *Metschnikowia saccharicola* DD21-2 здатен синтезувати кілер-токсин, який володіє антимікробною активністю щодо патогенного для краба штаму. Метою проведеного дослідження [46] є оптимізація процесу ферментації для отримання максимального виходу токсина-кілера. Було використано статистичний підхід для оцінки зв'язку між вимірюваними параметрами – температурою та часом ферментації, значенням рН, концентрацією внесеного інокуляту, які в подальшому впливали на активність синтезованого токсину, що вимірювалась діаметром зони інгібування відносно патогенного *M. bicuspidate* WCY. Результати показали, оптимальними були наступні умови ферментації: час – 54 години, рН – 5,5, температура – 27,5°C концентрація інокуляту – 4%. Після визначення активності, середній діаметр зон інгібування за таких умов складав 1,43 см. При цьому, зона інгібування лінійно зменшувалась при підвищенні температура та рН вище вказаних значень, що вкотре підтверджує залежність між впливом умов культивування на активність кілер-токсинів. Отримані дані можуть слугувати основою для подальших досліджень з профілактики та боротьби із захворюванням крабу.

Sporothrix schenckii, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* – це комплекс видів дріжджів, що є етіологічними агентами споротрихозу, який може вражати як людей, так і тварин. Хоча для лікування цього захворювання й існують ефективні препарати, проте довга тривалість терапії та їх токсичність зумовлюють необхідність вивчення нових альтернатив для лікування. З цією метою було оцінено дію 18 видів дріжджів, здатних до синтезу кілер-токсинів, на ріст 88 ізолятів комплексу видів *Sporothrix*. Найбільшими зонами інгібування проти 74% ізолятів *Sporothrix*, що складала 19,0 мм, 18,6 мм та 18,5 мм, характеризувались кілер-токсини *Kazachstania unispora* QU49, *T. faecale* QU100, *T. japonicum* QU139, відповідно. Отже, значна кількість дріжджів *Sporothrix* є сприйнятливою до дії кілер-токсинів, що робить їх потенційно корисними для розробки нових протигрибкових засобів [48].

Останніми роками значно зросла кількість інвазивних опортуністичних грибкових інфекцій, викликаних дріжджами роду *Candida*, зокрема видами *Candida albicans* та деякими не-*albicans* видами *Candida* (*C. glabrata* і *C. krusei*). За звичних умов, ці дріжджові гриби є частиною нормальної мікробіоти у людей та тварин, проте за певних порушень захисних механізмів хазяїна, що супроводжуються зниженням імунітету, види *Candida* можуть набувати патогенного характеру і викликають захворювання – кандидемії, починаючи від поверхневих слизових до небезпечних для життя системних інфекцій. Занепокоєння через поширення випадків захворюваності росте в результаті виявлення резистентності деяких видів до протигрибкових засобів, зокрема до азолів. Тому виникла необхідність у пошуку нових сполук, здатних ефективно пригнічувати дріжджі виду *Candida*. До таких було запропоновано віднести кілер-токсини, що володіють широкою антикандидозною активністю, яка досліджувалась протягом тривалого часу [49, 50].

Дріжджі *Debaryomyces hansenii* є одними з найпоширеніших видів дріжджів, що виділяється з сирів, завдяки своїй здатності рости у присутності високого вмісту солі. Вважається, що дані дріжджі утворюють монофілетичну групу з патогенними для людини видами *Candida*, окрім *C. glabrata*, проте існують припущення, що *D. hansenii* також здатен пригнічувати умовно-патогенні штами завдяки синтезу антикандидозних кілер-токсинів. Для підтвердження цього з 20 різних сирів було виділено 42 штами *D. hansenii*, активність мікоцину кожного штаму оцінювали проти людських клінічних ізолятів *C. albicans* та *C. tropicalis* методом дифузії на агарі зі штриховими пластинками. Розвиток чіткої зони інгібування навколо колоній *D. hansenii* вважався позитивним показником активності токсину. В результаті було відібрано 3 штами, що володіли кілерною активністю: *D. hansenii* 274, *D. hansenii* 237, *D. hansenii* 65. Активність виділених, в результаті культивування, токсинів визначали шляхом внесення мікоцинів у лунки, вирізані в агарі, який попередньо був засіяний чутливими штамами *Candida*. Результати продемонстрували, що чутливість *C. albicans* та *C. tropicalis* значно відрізнялась при різних значеннях рН та температури. *C. tropicalis* був більш чутливий до

мікоцинів *D. hansenii* при нижчих температурах, тоді як *C. albicans* виявляла чутливість при більш високих температурах. Такі дані є важливими і мають бути враховані при подальших дослідженнях використання кілер-токсинів в якості антикандидозних засобів [50].

За статистикою, вульвовагінальний кандидоз вражає кожную другу жінку у всьому світі у певний момент її життя, спричиняючи значні страждання та економічні втрати. Дріжджі *Candida glabrata* досить часто є збудниками такого захворювання. Використання протигрибкових засобів не завжди полегшує стан за рахунок розвитку у патогенів резистентності до препаратів. Це вимагає досліджень нових терапевтичних засобів, які діють при нормальному кислому рН статевих органів. Як зазначалось вище, дріжджі *C. glabrata* не утворюють монофілетичну групу з *D. hansenii*, оскільки більш тісно пов'язані з дріжджами *S. cerevisiae*, котрі також здатні синтезувати кілер-токсини, які є оптимально активними в кислих умовах. Саме завдяки подібності у будові клітинних стінок *C. glabrata* та *S. cerevisiae* було припущено, що токсини *S. cerevisiae* здатні ефективно впливати на рецептори клітин *C. glabrata*, приводячи в результаті до їх загибелі. Для підтвердження цього, 53 клінічні ізоляти *C. glabrata* були перевірені на чутливість до дев'яти штамів дріжджів, що експресують відповідні кілер-токсини методом лункового аналізу. Дріжджі з кілерним фенотипом K1 та K2 пригнічували ріст *C. glabrata* на 100% та 96% відповідно, тоді як решта дріжджів були здатні інгібувати менше 33% ізолятів *C. glabrata*. Також на активність були протестовані безпосередньо виділені та частково очищені токсини K1 та K2, які здатні були пригнічувати всі ізоляти *C. glabrata* у найвищій протестованій концентрації. Тобто токсини K1 та K2 можуть бути корисними як нові протигрибкові засоби, які у порівнянні з азолами, є фунгіцидними, оптимально активними при низькому рН і нетоксичними для клітин людини при фізіологічному рН [51].

Дослідження [52] було спрямоване на вивчення потенційного застосування кілер-токсинів, що були синтезовані дріжджами, виділеними з навколишнього середовища для зменшення та усунення біоплівки *C. albicans*. Фільтратами, отриманими після культивування дріжджів з кілерним фенотипом, обробляли

біоплівку штаму *C. albicans* ATCC 90028. Після 48 год впливу культурального фільтрату, проводили визначення метаболічної активності біоплівки. Спостерігалось, що зниження її активності на понад 50% відбувалось після впливу культурального фільтрату дев'яти токсинів-кілерів. Найвищий відсоток – 71,9% зниження метаболічної активності біоплівки продемонстрував культуральний фільтрат ізоляту *Pseudozyma*. Проведене дослідження дає підстави для подальшої розробки стратегій використання кілер-токсинів з метою обмеження утворення біоплівки *C. albicans* на медичних інструментах.

Дослідження кілер-токсину *W. saturnus* DBVPG 4561 показало, що КТ4561 характеризується широкою антимікотичною активністю щодо патогенних видів *Candida non-albicans*, а саме *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, які є нечутливими до азольних та полієнових антибіотиків. Крім того, даний токсин залишається активним за фізіологічних значень рН та температури, що відкриває широкі перспективи до його можливого застосування в якості антикандидозного агента [35].

Увагу вчених привернули також дріжджі *Whickerhamomyces anomalus* та *Torulaspora delbrueckii*, що здатні продукувати токсини WK та ТК відповідно. Було проведено оцінювання їх протигрибкової активності методом лункового аналізу та визначено ефективність подальшого використання очищених токсинів в якості альтернативних препаратів проти певних патогенних грибів, зокрема *Candida albicans*, *Aspergillus niger* і *Aspergillus flavus*. Хоч результати й показали, що з'єднання WK проявляло більш високу інгібуючу дію щодо всіх протестованих ізолятів порівняно з ТК, проте дане дослідження повною мірою підтверджує медичну важливість двох кілер-токсинів проти патогенних грибів. Варто зазначити, що в дослідженні також було встановлено значний вплив умов культивування продуцентів на активність очищених токсинів. Тому штами *T. delbrueckii* та *W. anomalus* інкубували в середовищі одного складу (бульйон екстракту дріжджового солоду з 2% SDS) з різними режимами перемішування мішалки (120, 150, 160, 180, 200) об/хв, значеннями рН (4,5; 5,5; 6,0; 6,5) та температури (15, 20, 25, 30, 37)°C. Результати експерименту, що забезпечували б

надсинтез кілер-токсинів з максимальною інгібуючою здатністю щодо патогенних клітин наведено в *таблиці 1.2* [53].

Така активність кілер-токсинів зацікавила вчених тому наступне дослідження було спрямоване на визначення здатності токсинів WK та ТК інгібувати дріжджі *Candida albicans*, отримані від пацієнта, який страждав на кандидоз шкіри. Для цього суспензію умовно-патогенних дріжджів наносили на поверхню агару та розподіляли шпателем, планшети залишали на 15 хв за кімнатної температури до висихання, після чого робили лунки діаметром 6 мм та вносили в кожную по 100 мкл токсинів-кілерів у концентрації 200 мг/мл та інкубували при 37°C протягом 24 години. Отримані результати підтвердили високу активність кілеру WK щодо дріжджів *Candida albicans*, адже зона інгібування складала близько 35 мм [54].

Штам морського походження *Wickerhamomyces anomalus* YF07b, виділений з кишківника асцидії, також має високу здатність виробляти кілер-токсини. Найоптимальніші умови культивування продуценту наведені в *таблиці 1.2*. Отриманий екзометаболіт очищали та проводили визначення його антимікробної активності за допомогою дифузійного тесту з використанням стерильних оксфордських чашок. Під час дослідження [40] було встановлено, що максимальна антимікробна активність токсину *W. anomalus* YF07b спостерігалася при рН 3,5 та температурі 16°C щодо наступних мікроорганізмів: *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia bicuspidata* WCY, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* та *Kluyveromyces aestuarii*. Отже, спектр активності даних токсинів був досить широким, проте не виключав дріжджі роду *Candida*.

Також було проведено дослідження з визначення активності мікоцинів *W. anomalus* з навколишнього середовища по відношенню до штамів *Candida albicans*, виділених з крові. Було встановлено, що за концентрації 200 мкг/мл максимальний відсоток чутливих штамів складав лише 70%. Натомість при концентрації 400 мкг/мл екстракти мікоцинів WA40M1, WA45M2, WA92M3 продемонстрували наступну активність, відповідно: 96,6%, 96,6% та 90% штамів *C. albicans* виявились чутливими. Крім того, визначено, що виділені мікоцини не є токсичними для клітин

людини. Ці властивості свідчать про те, що мікоцини *W. anomalus* є потенційними кандидатами для розробки нових протигрибкових препаратів [55].

Отже, враховуючи антимікробну активність токсинів *W. anomalus* щодо патогенних дріжджів *Candida*, їх можна розглядати як альтернативні протигрибкові засоби, і тому було проведено ряд досліджень для виявлення найбільш оптимального продуцента, здатного синтезувати токсин із найвищою антикандидозною активністю.

Так, в якості такого продуцента було запропоновано штам *W. anomalus* tp2-15, проте отриманий токсин продемонстрував досить вузький спектр активності, націлений тільки на *C. mesorugosa*, тому пошуки продуцента продовжувались далі [41].

Також вчені досліджували кілер-токсин Wa1F1-KT, продуцентом якого є штам *W. anomalus* 1F1. Зокрема, була визначена його антимікробна активність щодо чутливих і стійких до флуконазолу клінічних ізолятів і лабораторних штамів *Candida albicans* та *C. glabrata*. Після культивування продуценту отриманий токсин очищали та визначали його активність методом лункового аналізу, вносячи в кожен лунку, діаметром 8 мм, по 40 мкл неочищеного екстракту. Результати показали, що Wa1F1-KT був активний як до чутливих, так і резистентних до флуконазолу штамів *C. glabrata*, проте справляв інгібувальну дію лише на один, з-поміж усіх досліджуваних, мутантний штам *C. albicans* DSY289, що був стійким до флуконазолу. Отже, Wa1F1-KT може використовуватися як універсальний засіб проти дріжджів *C. glabrata* [56].

В наступному дослідженні [57] було оцінено антикандидозну активність кілер-токсину *W. anomalus* Cf20. У результаті було встановлено, що завдяки синтезу кілер-токсинів з високою активністю, дріжджі *Wickerhamomyces anomalus* Cf20, культивування яких проводилося в середовищі з рН 4,5, за температури 25°C протягом 96 годин, та їх безклітинний супернатант пригнічують один колекційний штам *C. glabrata* NCYC 388 та шість клінічних патогенних штамів *Candida* spp., серед яких: *C. tropicalis*, *C. krusei* та *C. albicans*. Тому дані сполуки можна

використовувати як альтернативу для лікування інфекцій, спричинених дріжджами роду *Candida*.

Крім кандидозів велику небезпеку сьогодні представляє й таке захворювання, як малярія, що викликається найпростішими паразитами *Plasmodium* та передається комарами *Anopheles*. Була розроблена нова стратегія боротьби з малярією, яка полягала у використанні мікробних симбіонтів для запобігання розвитку паразитів у кишечнику комарів та блокуванні передачі інфекції людині. В якості такого симбіонту було запропоновано дріжджі *Wickerhamomyces anomalus* F17.12, котрі були виділені з кишківника комарів роду *Anopheles* та характеризувалися здатністю до синтезу антимікробного токсину [58, 59].

Тому метою проведеного дослідження [60] було визначення можливості токсину *W. anomalus* F17.12 проявляти антиплазмодіальну активність шляхом впливу на спорогонічні стадії малярійного паразиту *Plasmodium berghei*. Для отримання кілер-токсинів, дріжджі *W. anomalus* F17.12 культивували в середовищі YPD з рН 4,5, за температури 26°C, при перемішуванні 70 об/хв протягом 36 годин. Антиплазмодіальну активність очищеного токсину *Wa*F17.12-КТ тестували на культурах спорогонічної стадії *P. berghei* методом біоаналізу з дифузійними лунками, при цьому токсин додавали в чотирьох концентраціях: 25, 60, 75 та 100 мкг/мл. Після інкубування засіяних планшет за температури 19°C протягом 24 годин, проводили оцінювання кілерної активності токсину. Отримані результати свідчать, що за концентрації 100 мкг/мл спостерігалось безперечне інгібування розвитку спорогонічних стадій паразитів до 90%. Тобто, це підтверджує, що кілер-токсин здатен впливати на ранні споронгонічні стадії *P. berghei*, викликаючи пошкодження мембран і загибель паразиту.

Такі результати спонукали проведення додаткових досліджень *in vivo* для оцінки антиплазмодіальної активності штаму *Wa* F17.12 на спорогонічні стадії паразиту *P. berghei* у комара *An. stephensi*. Кількість паразитів в середній кишці комарів, які отримували сахарний розчин з додаванням *Wa* F17.12 оцінювали через 24 години після зараження. Результати показали, що у комарів, колонізованих *W.*

anomalus F17.12, розвивалось на 62% менше паразитів, ніж в контрольній групі, котру годували лише сахарним розчином. Проведені дослідження відкривають нові перспективи для можливого використання токсину-кілера з метою запобігання розвитку малярійного паразита у комарів-переносників, що дозволить зменшити захворюваність у людей [61].

Антиплазмодіальна активність кілер-токсину, секретованого дріжджами *W. anomalus* F17.12 і їх біологічна спорідненість з самкою комара є ключовими характеристиками в можливій боротьбі з малярією. Проте впровадження такого продукту та його комерціалізація потребує додаткових випробувань, спрямованих на оптимізацію промислового культивування і зберігання отриманого продукту та оцінку токсичності. В дослідженні [62] було оцінено можливість реактивації росту штаму *W. anomalus* F17.12 і підтримки активності кілер-токсину після ліофільного висушування. Так, швидкість росту культур *Wa* F17.12 оцінювали через 4, 12, 18, 25, 32 і 60 днів зберігання при кімнатній температурі після сушки виморожуванням шляхом інкубування при оптимальних умовах протягом 36 годин. Встановлено, що швидкість росту ліофілізованого штаму не відрізнялась від звичайного зразка до 32 діб зберігання, уповільнення було виявлено після 60 діб, проте життєдіяльність продуценту навіть після 4-5 тижнів витримування в ліофілізованому стані була непорушною. Для оцінки збереження кілерної активності супернатант було протестовано щодо чутливого штаму – антимікробна активність кілер-токсину після ліофілізація була незмінною. Оцінку токсичності проводили шляхом дослідження впливу *W. anomalus* F17.12 на клітинні лінії кератиноцитів людини, які являють собою первинний бар'єр людського організму. Обробка різними концентраціями *W. anomalus* F17.12 (1000, 5000, 10000 клітин/мл) протягом 24 та 48 годин не чинила цитотоксичного впливу на кератиноцити людини і не впливала на життєздатність людських клітин. Дане дослідження є своєрідним кроком вперед для комерціалізації штаму-продуценту *W. anomalus* F17.12, зв'язаного з комарами-переносниками, в якості інноваційного інструменту для запобігання поширенню малярії.

Окрім впливу на чутливі дріжджові та паразитичні клітини, була досліджена й антибактеріальна активність деяких кілер-токсинів.

Staphylococcus aureus – це один із бактеріальних патогенів, що здатен викликати харчові отруєння у людей. М'ясо та інші харчові продукти, заражені *S. aureus*, вважаються небезпечними для здоров'я населення, оскільки даний патогенний мікроорганізм володіє стійкістю до деяких протимікробних препаратів. Метою роботи [63] було визначення антимікробної активності мікоцинів *W. anomalus* щодо штамів *S. aureus*, виділених з яловичини, свинини та курятини. Для отримання токсинів штам *W. anomalus* WA45 інкубували за температури 25°C протягом 5 діб. Культуральну рідину центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв для отримання супернатанту, який використовували в тестах визначення антимікробної активності. Метод інгібування твердої поверхні базувався на розділенні стерильної чашки на дві частини, в одну вносили одержаний супернатант, інша – слугувала для контролю. Обидві частини засівали патогенними штамами *S. aureus*. Також для визначення активності використовували метод лункового аналізу з інкубуванням чашок протягом 24 год при 36°C. В обох тестах спостерігалось повне інгібування бактерій в досить низьких концентраціях – 0,02 од/мг. Це дає підстави для використання кілер-токсинів не тільки в якості антимікробних засобів, а й нових продуктів для біоконтролю і біоконсервації м'яса та інших харчових продуктів.

Acinetobacter baumannii – це грамнегативні, мультирезистентні умовно-патогенні бактерії, що викликають занепокоєння через здатність викликати пневмонію, септицемію, шкірні інфекції, ендокардит, менінгіт тощо у ослаблених пацієнтів. Метою дослідження [64] було оцінити чутливість мультирезистентних клінічних штамів *A. baumannii* до мікоцинів *W. anomalus* WA40, WA45, WA92 та перевірити цитотоксичність отриманих токсинів. Умови культивування та визначення антимікробної активності були подібні до таких у попередньому дослідженні [56]. При цьому мікоцини продемонстрували інгібіторну активність щодо п'ятдесяти штамів *A. baumannii*. Для отримання інформації про цитотоксичність супернатантів з мікоцином було проведено тест на гемоліз

еритроцитів та токсичність щодо мікроскопічних ракоподібних *Artemia salina*. Результати показали, що токсини характеризувались низькою гемолітичною дією та відсутністю, на відміну від поліміксину, токсичності щодо *Artemia salina*. Це, в свою чергу, підтверджує перевагу мікоцинів порівняно з деякими антибіотичними речовинами.

Дещо пізніше в дослідженні [65] було встановлено, що крім протигрибкової, токсини *W. anomalus* та *T. delbrueckii* володіють й антибактеріальною активністю, зокрема щодо бактерій *E. coli* та *Staphylococcus aureus*, при цьому культивування продуцентів та тест на чутливість проводили аналогічно до таких в попередніх дослідженнях [54].

Кумис – це кисломолочний напій з кобилячого молока, що зброджується кисломолочними бактеріями та деякими видами дріжджів. Існувало припущення, що дріжджі, виділені з кумису здатні *in vitro* інгібувати ріст кишкової палички – умовно-патогенний мікроорганізм, що проявляє мультирезистентність. Три штами *S. cerevisiae* та два штами *K. marxianus* було виділено з кумису. Методом дифузійного біоналазу в агарі була протестована антибактеріальна активність супернатантів з мікоцинами виділених штамів, білкову природу яких підтверджували шляхом обробки ферментами. Крім того, антибактеріальна дія сирих екстрактів мікоцину була протестована *in vivo* на мишах, попередньо заражених *E. coli*. Результати показали, що неочищені екстракти мікоцинів *K. marxianus* володіли кращою антибактеріальною дією *in vitro* та *in vivo*, а також були ефективні щодо запобігання розвитку захворювань, спричинених кишковою паличкою, у мишей [66].

Антибактеріальною активністю також кілер-токсини, синтезовані дріжджами *P. kudriavzevii* RY55 та *D. hansenii* DSMZ70238. Так, методом лункового аналізу було встановлено, що кілер-токсини *P. kudriavzevii* RY55 є активними проти деяких потенційних бактеріальних патогенів, зокрема: *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. alcaligenes* [33]. Дріжджі *D. hansenii* DSMZ70238 також синтезували білкові екзометаболіти з високою токсичною активністю по відношенню до бактеріальних

патогенів: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumonia* та *S. pyogenes*, які мають значення для здоров'я людини. Крім того дослідження [37] було спрямоване й на вдосконалення умов культивування для отримання токсину-кілера з високою активністю. Зокрема, для покращення вироблення токсину штам *D. hansenii* культивували в аеробних умовах при різних значеннях температури (5 – 30°C) та pH (від 3,0 до 6,0). Дослідження показали, що оптимальним є інкубування продуценту в середовищі з низьким значенням pH за температури 25°C.

Умови культивування продуцентів, що забезпечували б оптимальне виробництво і активність кілер-токсинів та їх антимікробна спрямованість представлені в *таблиці 1.2*.

Проаналізовані дослідження підтверджують, що дріжджові кілер-токсини володіють досить широким спектром антимікробної активності щодо патогенних мікроорганізмів: дріжджів, бактерій, грибів й паразитичних клітин, здатних викликати різноманітні захворювання людей. Це дає підґрунтя для формування подальших досліджень з метою розробки нових антимікробних лікарських засобів, таких необхідних в час значного розвитку резистентності у патогенних мікроорганізмів до вже існуючих препаратів.

Таблиця 1.2

Особливості біотехнології та антимікробна активність кілер-токсинів

Продуцент	Умови культивування	Склад поживного середовища, г/л	Антимікробна спрямованість кілер-токсинів	Джерело
1	2	3	4	5
<i>Williopsis saturnus</i> WC91-2	22°C, 180 об/хв, 72 год, pH = 4,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20, з додаванням NaCl – 20 та гліцерину – 15% (об'ємна частка)	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Lodderomyces elongisporus</i> , <i>Metschnikowia bicuspidate</i> WCY	[36]
<i>Williopsis saturnus</i> DBVPG 4561	25°C, 140 об/хв, 24 год, pH = 4,5	Середовище YEPG: дріжджовий екстракт – 10, пептон – 10, глюкоза – 20	<i>Candida glabrata</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia guilliermondii</i>	[35]
<i>Metschnikowia saccharicola</i> DD21-1	27,5°C, 140 об/хв, 54 год, pH = 5,5	середовище YPD: дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20 з внесенням 15% гліцерину та 2% NaCl (за об'ємом)	<i>Metschnikowia bicuspidate</i> WCY	[46]
<i>Debaryomyces hansenii</i> DSMZ70238	25°C, 130 об/хв, 72 год, pH = 4,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. concentricum</i>	[37]
<i>T. delbrueckii</i> та <i>W. anomalus</i>	30°C, 150 об/хв, 72 год, pH = 4,5	Середовище YMB: дріжджовий екстракт – 3, солодовий екстракт – 3, пептон – 5, глюкоза – 10 з внесення 2% SDS	<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> і <i>Aspergillus flavus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	[53, 54]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> YF07b	20°C, 180 об/хв, 72 год	Середовище YPD: дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>M. bicuspidate</i> WCY, <i>Kluveromyces aestuarii</i>	[50]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 1F1	20°C, 150 об/хв, 72 год, pH = 4,6	середовище YPD: дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20 з внесенням 15% гліцерину (за об'ємом)	<i>C. albicans</i> DSY 289, <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>	[56]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> tp2-15	30°C, 120 об/хв, 72 год, pH = 4,5	Середовище YPD (дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20)	<i>Candida mesorugosa</i>	[47]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> F17.12	26°C, 70 об/хв, 36 год, pH = 4,5	Середовище YPD (дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20)	<i>Plasmodium berghei</i>	[60]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Cf20	20°C, 96 год, pH = 4,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт – 10, пептон – 20, глюкоза – 20	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	[57]

РОЗДІЛ 2

СУЧАСНИЙ ПІДХІД ДО ОДЕРЖАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ КІЛЕР-ТОКСИНІВ

2.1. Отримання кілерних антитіл з антимікробною активністю

Деякі дріжджові кілер-токсини демонструють широкий спектр активності, включаючи патогенні для людини мікроорганізми, а тому вважаються потенційно корисними для лікування інфекційних захворювань. Однак пряме використання кілер-токсинів як терапевтичних агентів має обмежене практичне значення [67]. За нечисленними винятками, більшість кілер-токсинів виявляють свою активність у вузьких діапазонах рН та температури, що зазвичай нижчі за фізіологічні значення, крім того, деякі з них характеризуються антигенністю та токсичністю. На сьогодні встановлено, що використання кілер-токсинів є ефективним лише при місцевому застосуванні [11].

Для подолання вищезазначених проблем, пов'язаних з прямим використанням кілер-токсинів, було започатковано багатообіцяючий антиідіотипічний підхід, в результаті якого було отримано антиідіотипічне одноланцюгове антитіло, яке являло собою внутрішній образ активного центру кілер-токсину з подібною антимікробною активністю [14, 67].

Так, відомо, що кілер-токсини чинять пряму антимікробну дію шляхом взаємодії з рецепторами клітинної стінки чутливих мікроорганізмів. Імунізація деяких організмів кілер-токсинами призводить до утворення нейтралізуючих антитіл, імітуючих рецептори чутливих клітин. Дані антитіла можуть бути використані як вакцини та індукувати утворення антиідіотипічних антитіл, які подібні до функціонального центру токсинів та діють як протимікробні молекули [9]. Тобто, антиідіотипічний підхід ґрунтувався на теорії, що взаємодія між функціональним епітопом токсина і його нейтралізуючим антитілом може відображати взаємодію кілера з його специфічним рецептором клітинної стінки.

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.		Красько М.О.			РОЗДІЛ 2 СУЧАСНИЙ ПІДХІД ДО ОДЕРЖАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ КІЛЕР- ТОКСИНІВ				Лім.	Арк.	Аркушів	
Перевір.		Красінько В.О.									39	127
Реценз.									Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Затверд.		Стабніков В.П.										

Аналогічним чином описувалась і взаємодія між антитілом, здатним нейтралізувати активність токсину та його антиідіотипічним антитілом [11].

Так, при дослідженні кілер-токсину *Wa* 96603КТ, продуцентом якого є штам *Wickerhamomyces anomalus* ATCC 96603, було встановлено, що його використання для лікування певних видів захворювань є ефективним при місцевому нанесенні на уражені ділянки, проте певні фізико-хімічні властивості перешкоджали застосуванню токсину як системного терапевтичного засобу. Крім того, було визначено, що через високу молекулярну масу – 220 кДа, *Wa* 96603КТ виявився значно антигенним, а також проявляв деяку токсичну дію на організм. Тому основна мета дослідників полягала в отриманні, завдяки антиідіотипічному підходу, імунологічних похідних *Wa* 96603КТ, здатних проявляти антимікробну активність токсину [9, 11].

Початковим етапом було одержання моноклонального антитіла (mAb КТ4), здатного нейтралізувати *Wa* 96603КТ, шляхом злиття спленоцитів мишей, імунізованих кілер-токсином. Після імунізації кроликів моноклональним антитілом спостерігалось виробництво антиідіотипічних антитіл, здатних конкурувати з *Wa* 96603КТ за сайт зв'язування з mAb КТ4, а отже й з рецепторами чутливих клітин. Подальші дослідження підтвердили здатність «кілер»-антитіл проявляти *in vitro* антикандидозну активність по відношенню до чутливих щодо токсину клітин *Candida albicans*. Тобто, очищені за допомогою афінної хроматографії ідіотипічні антитіла мали змогу розпізнавати та зв'язуватись зі специфічними рецепторами на поверхні мікробних клітин, отже могли імітувати антимікробну активність *Wa* 96603КТ, діючи, таким чином, як антибіотики. Крім того, посів на слизову оболонку кролів, мишей та крис чутливих клітин *Candida albicans* стимулювало секрецію *in vivo* кілерних антитіл у тварин, попередньо імунізованих mAb КТ4. Такі спостереження передбачали використання двох потенціальних протиінфекційних підходів: Id-вакцинація та анти-Id-терапія. З метою використання кілер-антитіл в анти-Id-терапії було проведено ряд досліджень, завдяки яким було встановлено, що молекули антиідіотипічних антитіл були більш стабільні за фізіологічних значень температури та рН, їх специфічність була продемонстрована за допомогою нейтралізації активності mAb

КТ4, крім того, кілер-антитіла були отримані в моноклональній (mKAb) та рекомбінантній (scFvKab) формах, що дозволило вирішити питання їх якісної та кількісної доступності. Враховуючи вищезазначені переваги, цікавим є подальше дослідження клінічного значення даних антитіл при певних захворюваннях [9, 11].

Так, було проведено оцінку терапевтичного потенціалу кілерних антиідіотипічних антитіл проти аспергільозу, який становить значну небезпеку для людей, що перенесли трансплантацію кісткового мозку, навіть незважаючи на досить агресивну протигрибкову терапію. Висновок про проведення дослідження *in vivo* було прийняте після попереднього дослідження активності антитіла, подібного до активного центру токсину Wa 96603КТ, щодо розвитку зростання гіф *Aspergillus in vitro*, в результаті якого було встановлено, що при інкубуванні конідій з різними концентраціями МАб К10, антитіла зв'язуються з клітинною стінкою конідій під час їх набухання, пошкоджуючи її, та інгібують проростання конідій в гіфи. В дослідженні *in vivo* кілер-антитіла вводили протягом 4 днів інтраназально мишам, що перенесли трансплантацію кісткового мозку та були попередньо заражені легеневою інфекцією *Aspergillus fumigatus*. Результати показали, що лікування МАб К10 було ефективним, оскільки при гістологічному дослідженні легень тварин спостерігалось декілька конідій *A. fumigatus*, розкиданих по паренхімі легень на ранній стадії інфекції без ознак росту грибка після цього. Отже, дослідження [68] вкотре підтверджує терапевтичну ефективність кілер-антитіл як пригрибкових агентів.

Дещо пізніше за вже відомим механізмом було отримано антиідіотипічні кілер-антитіла scFv, подібні до активного центру токсину НМ-1, продуцентом якого є дріжджі *Williopsis saturnus* var. *mrakii* IFO 0895. Тоді як токсин Wa 96603КТ має сильну цитотоксичну дію щодо *C. albicans*, токсин НМ-1 був здатен інгібувати ріст різних видів *Candida*, при цьому види, що не належать до *C. albicans* були більш чутливими. Тому протигрибкову активність очищених антитіл scFv тестували *in vitro* щодо чотирьох видів *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*. Для цього їх суспендували в 10 мкл фосфатно-сольового буфера, після чого вносили по 90 мкл антитіл в різноманітних концентраціях та інкубували протягом 12 годин при 37°C з реагентами для реплікації клітин.

Інкубовані зразки пересівали на чашки Петрі з агаром Сабуро та культивували протягом 48 годин за 30°C з наступним підрахунком кількості утворених колоній. Результати показали, що кілер-антитіл виявляють фунгіцидну дію в концентраціях від 1,56 до 12,5 мкг/мл щодо всіх ізолятів *Candida*. А отже, препарати антиідіотипічних антитіл на основі природних фунгіцидних білків є перспективними для розробки нових протигрибкових препаратів [69].

Незважаючи на те, що наразі відкрито лише незначну кількість кілер-антитіл, вони разом з кілер-токсинами стали відправною точкою для отримання кілер-пептидів, які значно привертають увагу вчених, оскільки можуть забезпечити унікальний підхід до розробки нового класу антибіотиків з антимікробною дією [69].

2.2. Від кілер-антитіл до кілер-пептидів

В результаті секвенування послідовності рекомбінантного кілер-антитіла scFvK_{ab} було синтезовано близько шести пептидів, які належали до областей, що визначали комплементарність scFvK_{ab} та 200 декапептидів, що відтворювали послідовність гіперваріабельної області антитіла. Вважалося, що отримані пептиди здатні підтримувати біологічну активність всього антитіла, функціонально імітуючи, таким чином, токсин Wa 96603KT. Для підтвердження даної теорії *in vitro* була протестована активність синтезованих пептидів щодо еталонного штаму *C. albicans* методом аналізу колонійутворювальних одиниць. Найвищою активністю характеризувався декапептид P6, крім того було встановлено, що заміна його першого залишка (E) аланіном (A) призводила до підсилення антикандидозної дії кілер-пептиду. Також пептид повністю інгібував зв'язування кілер-антитіла з клітинами *C. albicans*, таким чином підтверджуючи подібність своєї активності до антитіла, з якого був отриманий. Такі результати зацікавили вчених і тому даний пептид було обрано для проведення подальших досліджень [9, 11, 14].

Зовнішній отит, збудником якого виступають дріжджі *Malassezia pachydermatis*, є одним з найбільш поширених захворювань у собак для лікування якого необхідна системна терапія високими дозами протигрибкових засобів протягом тривалого часу. Загроза розвитку резистентності у дріжджів *Malassezia* до таких препаратів була стимулом для пошуку нових протигрибкових засобів.

Тому дослідження [63] було спрямоване на оцінку протигрибкової активності декапептиду кілера *in vitro* та *in vivo*. Так, 16 штамів *M. pachydermatis*, виділених від хворих собак, суспендували в стерильній дистильованій воді до концентрації 10^6 КУО/мл та вносили суспензію декапептиду в різних концентраціях. Після інкубування, суспензію висівали на агар Діксона та культивували при 35°C протягом 4 днів з наступним підрахунком кількості колоній. Результати показали, що всі протестовані штами збудника були чутливими до кілер-пептиду (КП), а мінімальна інгібуюча концентрація складала 1 мкг/мл. Оцінка терапевтичної активності КП *in vivo* полягала у місцевому введенні собакам, хворим на зовнішній отит, 150 мкл декапептиду у концентрації 2 мг/мл кожен день (група А) або три рази в тиждень (група В), контрольним групам вводили стерильну дистильовану воду та не активну форму пептиду (групи D і C відповідно). Лікування кілер-пептидом було ефективним, безпечним та характеризувалося зменшенням клінічних симптомів захворювання та концентрації *M. pachydermatis* у вушному каналі собак вже на 8 день введення декапептиду. Тобто, результати даного дослідження підтверджують потенціал використання кілер-пептидів в якості терапевтичного засобу проти маласезіозного отиту у собак.

Також, було проведено дослідження активності кілер-декапептиду щодо *Enterococcus faecalis*, здатного утворювати біоплівку та викликати верхівковий періодонтит, який важко піддається лікуванню через високу стійкість збудника у складі біоплівок до антимікробних агентів. Визначали вплив КП на ранні стадії розвитку біоплівок на полістиролових пластинах, а також на зрілі біоплівки з використанням *in vitro* моделі інфекції зубних кореневих каналів на дисках з гідроксиапатитом. Так, пластини з суспензіями *E. faecalis* інкубували протягом 90 хвилин (ранні стадії розвитку біоплівки) та 48 годин (формування зрілих біоплівок) при 37°C. Після чого середовище обережно змивали та обробляли пластини кілер-пептидами з різною концентрацією. Після інкубування протягом 24 годин при 37°C визначали метаболічну активність біоплівки. Результати показали, що кілер-пептид був активним щодо різних видів біоплівок та знижував їх метаболічну активність в концентрації 123,3 мкг/мл. Це дає підстави для проведення подальших досліджень з метою кращої характеристики впливу пептиду на біоплівки *E. faecalis* та

підтвердження можливості його використання як нового антимікробного агенту [71].

Токсоплазмоз – це поширене зоонозне захворювання, збудником якого є паразит *Toxoplasma gondii*. Комбінація піриметаміну та сульфодіазину є ефективною для лікування токсоплазмозу, проте ці сполуки викликають значний спектр побічних реакцій, тому необхідною є розробка альтернативних терапевтичних сполук для лікування даного захворювання. Основна мета дослідження [72] полягала в оцінці активності кілер-пептиду на позаклітинні тахізоїти (форма *T. gondii*, що швидко розмножується) в моделі *in vitro*. Так, визначення впливу кілер-пептиду на інвазію, внутрішньоклітинну проліферацію та реплікацію *T. gondii* проводили шляхом інфікування тахізоїтами клітин Vero з наступним обробленням їх кілер-пептидом в концентрації 25, 50, 100, 200 мкг/мл та подальшим визначенням його активності різними методами. Оцінка впливу КП на позаклітинні тахізоїти *T. gondii* проводилась шляхом їх культивування в присутності декапептиду в концентрації 50 та 100 мкг/мл. Результати показали, що внутрішньоклітинна проліферація *T. gondii* знижувалась на 54 та 95% при обробці клітин кілер-токсинам в концентрації 50 і 200 мкг/мл відповідно, при цьому, кілер-пептид не проявляв токсичності щодо для клітин Vero. ПЦР в реальному часі продемонструвало значне зниження ДНК паразиту в клітинах, інфікованих за присутності кілер-пептиду. За допомогою трасмісійної електронної мікроскопії було встановлено, що у більшості тахізоїтів, оброблених протягом 3 годин 50 мкг/мл КП, спостерігалась змінена морфологія зі зменшенням об'єму цитоплами, порушенням ядерної мембрани, конденсацією хроматину та втратою мітохондріальної структури. Після обробки 100 мкг/мл КП більшість тахізоїтів були повністю знищені. Отже, дане дослідження підтверджує, що кілер-пептиди є перспективними сполуками для розробки нових і безпечних препаратів з метою лікування токсоплазмозу.

Також було проведено оцінку інгібуючої активності кілер-токсину декапептидної структури щодо вірусу грипу А, який є основною причиною захворюваності на сезонні та пандемічні інфекції у всьому світі. Дослідження *in vitro* проводили з використанням епітеліальних клітин нирки мавпи. Їх

інфікували вірусом грипу А та обробляли кілер-пептидом в різних концентраціях. Результати продемонстрували, що КП в концентрації 4 мкг/мл здатен повністю інгібувати продукцію вірусу за умови його внесення протягом 4 годин після інфікування. Також, при обробці інфікованих клітин кілер-пептидом спостерігалось значне зниження синтезу вірусних білків - гемаглютиніну та мембранного білка. При цьому не спостерігалось негативних наслідків дії пептиду на життєдіяльність клітин мавпи. Дослідження *in vivo* проводили шляхом інфікування мишей вірусом грипу А з наступним внутрішньочеревним введенням кілер-пептиду в концентрації 50 або 100 мкг протягом 30 хвилин з моменту інфікування. Обробку повторювали щоденно протягом 10 днів. Більшість тварин, яким вводили плацебо, не доживали до 8 дня експерименту. Аналіз результатів підтвердив ефективність лікування кілер-пептидом, оскільки спостерігалось виживання 50% з усіх тварин, які отримали 100 мкг КП. При цьому не було виявлено суттєвої різниці у результатах при розбіжному лікуванні тварин декапептидом та амантадином – лікарським засобом, який був розроблений як інгібітор вірусу грипу [73].

Відомо, що як і кілер-токсини, антиідіотипічні антитіла та пептиди є активними щодо деяких умовно-патогенних мікроорганізмів, які становлять значну загрозу для ВІЛ-інфікованих людей. В ході довготривалих досліджень кілер-пептиду та вірусу імунодефіциту було виявлено гомологію послідовності КП з критичними сегментами в петлях ВІЛ типу 1. Такий висновок спонукав проведення досліджень з визначення інгібуючого потенціалу кілер-пептиду щодо ВІЛ за допомогою двох різних експериментальних підходів, *in vitro* та *ex vivo*. В результаті було встановлено, що декапептид (1 мкмоль) здатен пригнічувати реплікацію ендогенного ВІЛ-1 у первинних культурах моноклеарних клітин периферичної крові (РВМС), виділених від ВІЛ-інфікованого пацієнта. Також, в концентрації 1 мкг/мл кілер-пептид здатен був інгібувати реплікацію вірусу в РВМС, що були отримані від здорових донорів та екзогенно інфіковані вірусом імунодефіциту людини. Отже, кілер-пептид є першим антиідіотипічним пептидом, який проявляє інгібуючу активність та потенційний терапевтичний ефект щодо вірусів

імунодефіциту людини та грипу А, а тому є цінною провідною сполукою для розробки нового класу антимікробних засобів [14, 74].

Враховуючи, що заміна першого залишку декапептиду на аланін впливала на антимікробну активність кілер-пептиду, дослідження [75] було спрямоване на визначення антикандидозної активності похідних кілер-пептиду, отриманих шляхом видалення або заміни першого залишку – аланіну на амінокислоти з різними фізико-хімічними властивостями. Кандидацидну активність отриманих кілер-пептидів *in vitro* щодо штаму *C. albicans* SC5314 визначали методом аналізу колоніютворювальних одиниць. Оцінка токсичності та терапевтичної активності похідних КП *in vivo* проводились з використанням модельної комахи - великої воскової (стільникової) молі *G. mellonella*. Шістнадцять личинок *G. mellonella* інфікували дріжджами *C. albicans* з наступним введенням через 30 хвилин обраних пептидів (11 мкмоль/кг) або дистильованої води як контролю та оцінкою ступеня виживання личинок через 9 днів лікування. В результаті аналізу проведених досліджень було встановлено, що всі похідні кілер-пептиду виявляли антикандидозну дію *in vitro*, проте заміна першого залишку гістидином та лізином значно підвищувала фунгіцидну активність пептиду. Натомість терапевтичною активністю *in vivo*, окрім відомого кілер-пептиду, характеризувалися лише його похідні з залишком лізину та проліну. Отже, в цілому фізичні та хімічні властивості амінокислоти, що займає N-кінцеве положення в послідовності КП, впливають на протигрибкову активність пептиду. Такі висновки дають цінні знання для підвищення біологічної активності та оптимізації стабільності антимікробного пептиду.

Отримавши позитивні результати у дослідженнях кілер-пептиду, що імітує дію токсину Wa 96603KT, було прийняте рішення про синтез та дослідження пептидів, похідних від токсину НМ-1 та його антидіотичних антитіл. Антимікробна активність кілер-пептидів досліджувалась щодо дріжджів *S. cerevisiae*, *C. albicans* та *C. neoformans* методом аналізу концентрації колонієутворюючих одиниць. Встановлено, що пептид Р6, що отриманий безпосередньо з кілер-токсину, був здатний значно пригнічувати ріст *S. cerevisiae*, проте характеризувався меншою активністю щодо умовно-патогенних дріжджів.

Натомість, декапептид SP6, отриманий з рекомбінантного антитіла, виявляв значну антимікробну дію щодо дріжджів *C. albicans*. Це дало підстави дослідити його активність щодо інших видів *Candida*, зокрема *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*. Аналіз показав, що кілер-пептиду у концентрації від 0,23 до 5,57 мкг/мл було достатньо для інгубування 50% росту усіх протестованих штамів *Candida*. Крім того, пептид SP6 був активний і щодо дріжджів *S. cerevisiae* та *C. neoformans*. Враховуючи таку високу активність синтезованого декапептиду, його було обрано для подальших досліджень, що знаходяться на стадії розробки, з метою визначення терапевтичного потенціалу *in vivo* та здатності використовуватись в якості нового протигрибкового агента [76].

Отже, очікується, що легкість отримання в необмеженій кількості, низька вартість та висока біологічна і терапевтична активність кілер-пептидів поряд з низькою токсичністю дадуть початок новому поколінню протиінфекційних засобів з високою ефективністю дії [14].

РОЗДІЛ 3

ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Потреба у цільовому продукті

Кандидоз – це грибкове інфекційне захворювання, яке викликають умовно-патогенні мікроорганізми роду *Candida*. Масштаби кандидозу охоплюють широкий спектр захворювань від поверхневих та легких клінічних проявів до серйозних інфекцій [70]. Загалом виділяють кандидоз шкіри та придатків, кандидоз травних та сечостатевого органів (ротоглотковий, стравохідний, вульвовагінальний, кандидозний уретрит), дихальної системи (ларингеальний, бронхіальний, кандидозна пневмонія) та системний кандидоз [78]. Не менше 15 різних видів *Candida* spp. можуть викликати дане захворювання у людини, проте найбільш часто серед них зустрічаються такі збудники: *Candida albicans* (65,3%), *C. glabrata* (11,3%), *C. tropicalis* (7,2%), *C. parapsilosis* (6,0%), *C. krusei* (2,4%) [79]. Варто відзначити, що дріжджові гриби *Candida* як коменсальні мікроорганізми є частиною нормальної мікробіоти шкіри та кишківника людини, а тому виявляють у 60% здорових людей [80]. Натомість за певних причин дріжджі роду *Candida* можуть набувати патогенного характеру, наразі вони входять в п'ятірку основних патогенів, здатних спричиняти внутрішньо лікарняні захворювання. На сьогодні кандидоз являється найбільш частою хворобою у пацієнтів з імуносупресивними станами [77]. Препарати першого ряду, до яких відносять переважно азоли, є ефективними, проте з кожним роком стурбованість з приводу поширення захворювання росте за рахунок все частішого виявлення резистентності деяких видів *Candida* до протигрибкових засобів [80,81].

Саме тому існує необхідність у нових протигрибкових препаратах, здатних ефективно боротись з інфекціями, спричиненими дріжджами роду *Candida*. До таких, завдяки широкому спектру антикандидозної активності, були

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО- ЕКОНОМІЧНЕ ОБґРУНТУВАННЯ				Лім.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Красько М.О.										48	127
Перевір.	Красінько В.О.								Кафедра БТМ			
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В.П.											

віднесені кілер-токсини. Хоч наразі дослідження з розробки препаратів ще досі тривають, вже існує припущення про створення антибіотику на основі антитіл, які являють собою внутрішній образ активного центру токсину. Саме тому, в якості аналогу в даній роботі використовуються антимікробний засіб, що містить антибіотик групи полієнових – Ністатин, призначений для лікування захворювань, викликаних грибами роду *Candida* [82].

Ризик виникнення кандидозів варіює в залежності від наявності певних основних захворювань. Так, прояви кандидозу найчастіше зустрічаються у онкологічних хворих, в основному у пацієнтів з гематологічними захворюваннями та трансплантацією кісткового мозку, а також у ВІЛ-інфікованих людей [77,83].

Встановлено, що з роками кількість та поширеність грибкових інфекцій зростає. Це, в свою чергу, призводить й до збільшення потреб у застосуванні протигрибкових засобів [84]. Сьогодні на ринку представлений значний спектр антимікробних препаратів, призначених для лікування різних видів кандидозів. До таких в першу чергу відносять похідні азолів та ехінокандини, які випускаються в різноманітних лікарських формах як українськими, так і закордонними фармацевтичними підприємствами. До найбільш вживаних засобів належать флюконазол, який має ряд аналогів та випускається у вигляді капсул і розчину для інфузій виробниками АТ «Київмедпрепарат», ТОВ «Юрія-Фарм», «Астрафарм» (Україна), «Medochemie LTD» (Кіпр) тощо. Серед ехінокандинів виділяють ліофілізований препарат «Капсидаз» виробником якого є компанія «Fareva Mirabel» (Франція). Крім того, випускають ряд лікарських засобів у формі мазей, порошків та супозиторіїв для лікування кандидозу шкіри та статевих органів [85, 86].

Варто додати що на ринку ще не представлені препарати кілер-токсинів, проте існують аналоги – полієнові антибіотики, які є досить подібними до дріжджових токсинів за механізмом дії. До найбільш поширених серед них належить «Ністатин», що випускається у формі таблеток, супозиторій та мазей виробниками ПАТ «Лубнифарм», ПАТ «Борщагівський ХФЗ», ТОВ «Здоров'я», ПАТ «Монфарм» тощо [87].

Проте резистентність мікроорганізмів являється новою проблемою у всьому світі, що значно ускладнює вибір відповідної протигрибкової терапії [89]. Наразі дріжджі роду *Candida* демонструють численні механізми резистентності до азольних та антибіотичних препаратів, а тому в будь-якому разі існує гостра потреба у нових антикандидозних засобах, якими здатні виступати кілер-токсини [85].

3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі кілер-токсину

Усі лікарські засоби виробляються і випускаються на фармацевтичний ринок у певній лікарській формі – тобто формі, що надає лікарській речовині(-ам) зручний для практичного застосування стан, при якому досягається необхідний лікувальний або профілактичний ефект [88].

У лікарські засоби, крім діючої речовини входять також допоміжні речовини (целюлоза, крохмаль, тальк, цукор, борошно та ін.), які змінюють смак, колір, масу препарату тощо. Добове дозування лікарської речовини зазвичай вимірюється в міліграмах – така кількість лікарської речовини являє собою лише кілька дрібних крупинок, ледве видимих оком. Щоб полегшити прийом заданої кількості лікарської речовини, до неї додають баластові речовини, що збільшують об'єм лікарської форми до розмірів, добре видимих неозброєним оком. Крім того, вони можуть впливати на збереження лікарської речовини, швидкість її вивільнення з лікарської форми, що в більшості випадків дозволяє пацієнтові самотійно приймати лікарські препарати [88].

Лікарські форми залежно від консистенції можуть поділятися на рідкі (розчини, настої, відвари, настойки, екстракти, слизи, мікстури, лініменти), м'які (мазі, пасти, пластирі) і тверді (таблетки, драже, порошки). Один і той самий лікарський засіб може призначатися у різних лікарських формах, а саме у формі розчину, мазі, таблеток та ін. [88].

Переваги та недоліки різних методів введення лікарських засобів [88]

Переваги	Недоліки
Пероральне застосування	
Зручність застосування	Повільний розвиток терапевтичного ефекту
Можливість самостійного застосування препаратів пацієнтами	Індивідуальна варіабельність терапевтичних ефектів
	Можливість подразнення слизової оболонки ШКТ
Ентеральний шлях введення	
Комфортність для хворого	Варіабельність терапевтичних ефектів
Не потребується участі медичного персоналу	Неможливість введення лікарських речовин, що руйнуються в ШКТ або мають сильну подразнювальну дію
Можливість довготривалої терапії	Обмежена можливість застосування препаратів при блюванні, діареї, стані пацієнта без свідомості
Внутрішньом'язове введення	
Швидке досягнення максимальної концентрації в плазмі крові та швидкий розвиток терапевтичного ефекту	Болючість
	Можливість ушкодження судин або нервів
Можливість застосування препаратів, що руйнуються при інших шляхах введення	Залежність швидкості всмоктування від капілярного кровотоку
	Необхідність участі медичного персоналу
Підшкірний шлях введення	
Повільне всмоктування	Болючість
Можливість застосування препаратів, які руйнуються при інших шляхах введення	Залежність швидкості всмоктування від місцевого кровотоку
	Неефективність при серйозних порушеннях місцевого кровообігу, наприклад при шоці
Досягнення концентрації препарату в плазмі крові, близької до стандартної, що забезпечує стабільний терапевтичний ефект	Можливість розвитку запалення, гематоми в місці введення
	Необхідність участі медичного персоналу

Лікування кандидозу передбачає безліч лікарських форм. До них відносяться [89]:

- капсули;
- свічки;
- таблетки;
- гелі та мазі;
- спринцювальні розчини.

З пероральних препаратів у списку зазначені капсули та таблетки, які відносять до одних з найзручніших методів прийому лікарського засобу. Гелі та

мазі в загальному стосуються нашкірного нанесення препарату (у випадку вагінального кандидозу). Свічки та спринцювальні розчини також частіше використовуються при кандидозі у жінок. Але, нами передбачається виробництво універсального препарату, проти різного типу кандидозів. Тому, як лікарську форму пропонується розглянути саме тверді препарати і зробити вибір між таблетками та капсулами.

Таблетки є найпоширенішою формою лікарських засобів. Їх виготовляються шляхом подрібнення та пресування діючих, а також допоміжних речовин у тверду субстанцію з гладким покриттям. Після вживання таблетки потрапляють в шлунок, набухають, після чого розпадаються, розчиняються та всмоктуються в організм. Близько половини лікарських засобів випускають саме у формі таблеток [90].

Переваги [90]:

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

Недоліки [90]:

- з моменту попадання таблетки в ротову порожнину і рухаючись стравоходом, на неї впливає цілий ряд руйнівних факторів, тому частина поживних елементів може просто не дійти до шлунка;
- найчастіше таблетки мають неприємний смак або післясмак;
- повільно діють;
- існує більша ймовірність передозування таблетками.

Капсули — це лікарські препарати, поміщені в оболонку, що слугує своєрідним футляром. Капсули поділяють на желатинові та целюлозні. На відміну від таблеток, капсули спочатку доставляють діючу речовину в шлунок або кишечник, а вже після швидко вивільняють її [90].

Переваги [90]:

- переважно, капсули є менші за розміром, що полегшує їх ковтання;
- мають гарний вигляд;
- швидко розчиняються та діють;
- не мають неприємного смаку та запаху, що значно полегшує її прийом;
- мають вищу абсорбцію;
- за бажання капсулу можна розкрити і витягти порошкоподібну «начинку».

Недоліки [90]:

- капсули мають менший термін придатності;
- для досягнення найбільшої дози або широкого складу, виробники змушені збільшувати розмір капсули, що не завжди зручно під час приймання;
- містять нижчі дози ліків;
- мають вищу вартість.

Враховуючи всі вище наведені переваги та недоліки, можна зробити висновок, що для подальшого виробництва варто обрати таблетовану форму препарату, через її зручність у застосуванні та дешевизну, а також через можливість вміщення вищої дози діючої речовини до таблетки, на відміну від капсул, що дозволить скоротити кількість прийомів лікарського засобу.

3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки таблетованого препарату з кілер токсином

Найважливішою вимогою щодо пакування та вибору пакувальних матеріалів є належний захист від дії зовнішніх факторів (вологи, кисню повітря, мікробного забруднення) складових компонентів препарату. Для пакування таблеток використовують папір, метал, картон, скло; широкого розповсюдження набули целофан, поліетилен, поліпропілен, полістирол, полівінілхлорид та різні їх поєднання. Перспективними вважаються плівкові контурні упаковки, отримані на основі комбінування матеріалів методом термозварювання: коміркова (блістерна) і

безкоміркова (стрічкова). Для їх виготовлення використовують алюмінієву фольгу, стрічки целофанові ламіновані, полімерні плівки тощо. Для одержання коміркових упаковок найчастіше застосовується термоформувальна плівка, слабкопластифікований або непластифікований полівінілхлорид різної товщини (0,2–0,35 мм), які використовують для таблеток, що містять гігроскопічні складові. Поліпропілен використовують рідше, бо він важко піддається формуванню; полістирол добре формується, але пропускає вологу [91].

На *рис. 3.1* показано принцип одержання стрічкової упаковки. Упаковка стрічки формується навколо таблетки, коли вона падає через нагрітий зворотно-поступальний валик або нагрітий обтискний валик в зону герметизації між двома аркушами термозварюваної гнучкої плівки [92].

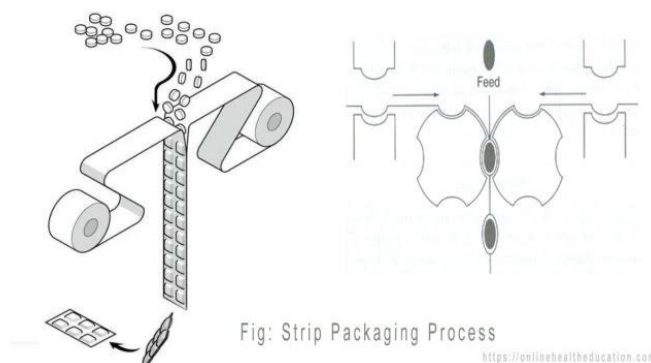


Рис. 3.1. Процес формування стрічкової упаковки для таблеток [92]

Блістерна упаковка виготовляється методом «форма-наповнення-запаювання». Спочатку за допомогою процесу термоформування або холодного формування формується напівжорсткий блістер/порожнина, потім виріб заповнюється та покривається термозварюваним матеріалом підкладки [92]. Її схематичне зображення показано на *рис. 3.2*.

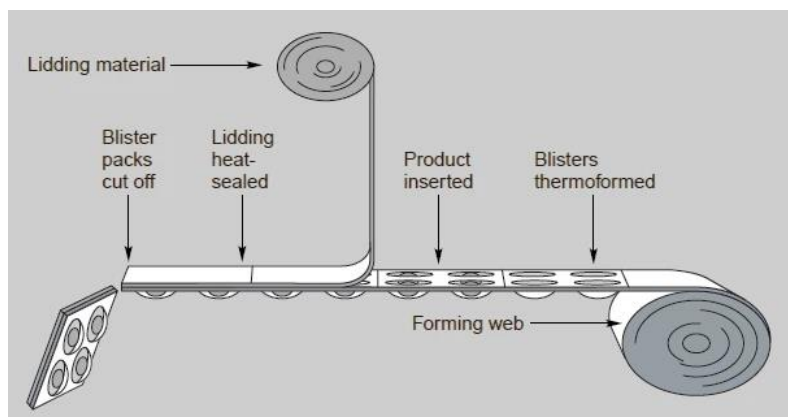


Рис.3.2. Процес формування блістерної упаковки для таблеток [92]

Через свою гнучкість, пропонується обрати стрічкову упаковку для таблеток. Вона буде займати менше місця, ніж блістерна упаковка, а також така упаковка дозволяє забезпечити легке відокремлення 1 таблетки, за потреби, в той час як більшість блістерів не мають такої можливості і для відокремлення таблетки її потрібно відрізати.

Як основний матеріал упаковки пропонується обрати алюмінієву фольгу, яка буде захищати таблетку від сонячних променів, надлишкової температури та вологості [92].

Тепер, логічно визначити кількість таблеток на одну упаковку. За одну добу людина приймає 3 таблетки. Тривалість лікування становить 10 діб. Тобто, на 1 курс, людині потрібно 30 таблеток [93]. Через це, пропонується виготовляти стрічку з 10 таблетками, щоб споживач міг зручно придбати рівну кількість таблеток на весь курс. В одній таблетці міститься 113,6 мг кілер токсину.



Рис. 3.3. Приклад вигляду первинної упаковки таблеток з кілер-токсинам
[94]

Вторинна упаковка – це зовнішня тара, яка безпосередньо не контактує з лікарським засобом, на відміну від первинної упаковки. Вторинна упаковка поділяється на кілька категорій, до яких відносять [95]:

- Коробки з картону переважно використовуються для продажу таблеток, ампул, спреїв, флаконів. Така тара екологічна і економічна, її легко утилізувати.
- Полімерна упаковка є досить зручною у використанні. В основному застосовується для упаковки шприців. Випускається різної форми і щільності.

- Вкладиші являють собою спеціальні картонні контейнери з осередками. Вони призначені для фіксації первинної упаковки (наприклад, ампул).
- Роздільники використовуються для специфічних препаратів, які готують безпосередньо перед застосуванням.
- Елементи, які поглинають вологу. Медичні препарати у вигляді порошків уразливі до вологи. Для їх зберігання потрібні особливі умови. У більшості випадків для відводу вологи використовуються вкладиші з силікагелем.

При створенні вторинної упаковки важлива роль приділена її дизайну. На фармацевтичному ринку запропоновані схожі товари, і виробникові потрібно виділити свій препарат серед аналогів [95].

Через те, що наша основна лікарська форма це таблетки, а первинна упаковка – стрічкова з алюмінієвої фольги, логічно обрати картонну коробку як вторинну упаковку, через її практичність та екологічність.

3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання кілер-токсину

Кілер-токсини – це білки чи глікопротеїни з низькою молекулярною масою, які синтезуються та виділяються деякими видами дріжджів [10]. Загалом у дріжджів розрізняють три основних фенотипи по відношенню до кілер-токсинів: фенотип вбивці, нейтральний та чутливий фенотипи. Так, перший фенотип характерний для дріжджів, які здатні продукувати кілер-токсини та є стійкими по відношенню до вироблених екзометаболітів. Нейтральні штами також є стійкими до одного або декількох кілер-токсинів, натомість вони не здатні синтезувати власного кілер-фактору. Відповідно дріжджі з третім фенотипом є чутливими до кілер-токсинів, які викликають інгібування синтезу макромолекул та руйнування клітин, що в кінцевому результаті приводить до загибелі чутливих штамів. З поміж усіх представлених, частота прояву фенотипу-вбивці в межах певного виду дріжджів коливається від 5 до 30%, а іноді може досягати й більше 50% [8,12,53].

Таблиця 3.2

Особливості одержання кілер-токсинів

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Активність токсину, од/мл	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л				
1	2	3	4	5	6	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M437	Глюкоза (NH ₄) ₂ SO ₄ Ацетат калію K ₃ PO ₄ MgSO ₄ NaCl CaCl ₂ *2H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ZnSO ₄ *H ₂ O KI MnSO ₄ *H ₂ O FeCl ₃ CuSO ₄ *5H ₂ O Біотин Борна кислота Інозитол Ніацин Кальцію пантотенат	5 5 0,36 0,5 0,25 0,1 0,1 0,00017 0,0003 0,0001 0,0004 0,00012 0,00004 0,00001 0,0005 0,01 0,01 0,001	96	185,8	Культивування здійснювали у рідкому середовищі MB за температури 20°C.	Lebionka A., Serviene E., Melvydas V. Isolation and purification of yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> K2 killer toxin. ISSN 1392-0146. Biologia, 2002. Nr. 4.
<i>Pichia kudriavzevii</i> RY55	Декстроза Дріжджовий екстракт Пептон Гліцерин	20 10 10 50	72	32	Культивування проводили в середовищі КТР за температури 30°C при перемішуванні 180 об/хв.	Bajaj BK, Raina S, Singh S. Killer toxin from a novel killer yeast <i>Pichia kudriavzevii</i> RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. J Basic Microbiol. 2013 Aug;53(8):645-56. doi: 10.1002/jobm.201200187. Epub 2012 Sep 7. PMID: 22961241.

Закінчення таблиці 3.2

1	2	3	4	5	6	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rom K-100	Глюкоза (NH ₄) ₂ SO ₄ Ацетат калію K ₃ PO ₄ MgSO ₄ NaCl CaCl ₂ *2H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ZnSO ₄ *H ₂ O KI MnSO ₄ *H ₂ O FeCl ₃ CuSO ₄ *5H ₂ O Біотин Борна кислота Інозитол Ніацин Кальцію пантотенат	5 5 0,36 0,5 0,25 0,1 0,1 0,00017 0,0003 0,0001 0,0004 0,00012 0,00004 0,00001 0,0005 0,01 0,01 0,001	96	113	Культивування здійснювали у рідкому середовищі МВ за температури 20°C.	Lebionka A., Serviene E., Melvydas V. Isolation and purification of yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> K2 killer toxin. ISSN 1392-0146. Biologia, 2002. Nr. 4.
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 1F1	Декстроза Пептон Дріжджовий екстракт Гліцерин	20 20 10 15% (об'ємна частка)	72	2326	Культивування в колбах об'ємом 500 мл зі 100 мл середовища на качалці (n = 150 об/хв; t° = 20°C).	Giovati L, Santinoli C, Ferrari E, Ciociola T, Martin E, Bandi C, Ricci I, Epis S, Conti S. Candidacidal Activity of a Novel Killer Toxin from <i>Wickerhamomyces anomalus</i> against Fluconazole-Susceptible and -Resistant Strains. Toxins (Basel). 2018 Feb 3;10(2):68. doi: 10.3390/toxins10020068. PMID: 29401638; PMCID: PMC5848169.
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1106	Глюкоза Дріжджова азотиста основа (YNB) Brij-58	10 6,7 0,1	72	1205	Культивування в шейкері у колбах об'ємом 2 л з 1 л середовища (n = 150 об/хв; t° = 20°C).	Santos A, Marquina D. Ion channel activity by <i>Pichia membranifaciens</i> killer toxin. Yeast. 2004 Jan 30;21(2):151-62. doi: 10.1002/yea.1069. PMID: 14755640.

Синтез токсинів продуцентами здійснюється коли клітини дріжджів переходять від пізньої експоненційної до ранньої стаціонарної фази росту і залежить від умов культивування (переважно за низьких температур та кислого значення pH). Важливим також є розробка оптимального складу поживного середовища з низькою вартістю, що дасть змогу мінімізувати витрати на отримання цільового продукту, забезпечивши при цьому його надсинтез [34].

На сьогодні описано близько одинадцяти різноманітних кілер-токсинів, що продукуються представниками таких родів, як *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Williopsis*, *Debaryomyces*, *Whickerhamomyces* тощо [44].

За даними, наведеними в *табл. 3.2.* можна зробити висновок, що час культивування всіх представлених продуцентів знаходиться в межах 72-96 годин. При цьому найнижчою активністю характеризується токсин, синтезований продуцентом *Pichia kudriavevii* RY55. Штамами *S. cerevisiae* виробляються токсини з приблизно однаковою активністю. Найвищу активність мають токсини, синтезовані дріжджами *Wickerhamomyces anomalus* 1F1 та *Pichia membranifaciens* CYC 1106, хоча склад поживних середовищ для їх культивування дещо відрізняється. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента розрахуємо вартість поживних середовищ для культивування обраних мікроорганізмів (*табл. 3.3*).

Таблиця 3.3

**Вартість поживних середовищ для культивування
продуцентів кілер-токсину**

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)*
1	2	3	4	5	6
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 1F1	Декстроза	20	86	1,72	1
	Пептон	20	1060	21,2	1
	Дріжджовий екстракт	10	1100	11	1
	Гліцерин	150 (мл)	170	25,5	1
	Вартість 1 л середовища – 59,4 грн				
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1106	Глюкоза	10	98	0,98	1
	Дріжджова азотиста основа (YNB)	6,7	10173	68,2	2
	Brij-58	0,1	12768	1,28	3
	Вартість 1 л середовища – 70,5 грн				

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rom K-100 та <i>S. cerevisiae</i> M437	Глюкоза	5	98	0,49	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5	60	0,3	1
	Ацетат калію	0,36	281	0,1	1
	K ₃ PO ₄	0,5	85	0,043	1
	MgSO ₄	0,25	84	0,021	4
	NaCl	0,1	65	0,007	1
	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,1	65	0,007	1
	Na ₂ MoO ₄	0,00017	1299	0,0002	1
	ZnSO ₄ *H ₂ O	0,0003	45	0,000014	1
	KI	0,0001	4500	0,0005	5
	MnSO ₄ *H ₂ O	0,0004	58	0,00003	1
	FeCl ₃	0,00012	180	0,00003	1
	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,00004	118	0,000005	1
	Біотин	0,00001	2376	0,00003	1
	Борна кислота	0,0005	100	0,00005	1
	Інозитол	0,01	1250	0,013	6
	Ніацин	0,01	400	0,004	7
	Кальцію пантотенат	0,001	799	0,0008	8
	Вартість 1 л середовища – 0,99 грн				

Примітка. * – Ціни наведено станом на грудень 2023 р. 1 – <https://prom.ua>, 2 – <https://www.carlroth.com>, 3 – <https://www.sigmaaldrich.com>, 4 – <https://agreemarket.com>, 5 – <https://reapplus.com>, 6 – <https://labormarket.com>, 7 – <https://himiko.com>, 8 – <https://flagma.ua>.

Дані, наведені в табл. 3.3. свідчать, що найдорожчим є середовище для культивування дріжджів *Pichia membranifaciens* CYC 1106 за рахунок необхідності закупок певних компонентів за кордоном. Натомість середовище для інкубування дріжджів *S. cerevisiae* Rom K-100 та *S. cerevisiae* M437 є найдешевшим з усіх представлених, проте активність синтезованих ними екзометаболітів є значно нижчою, ніж токсину *Wickerhamomyces anomalus* 1F1. Для остаточного вибору найоптимальнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 одиниці цільового продукту (табл. 3.4.).

Таблиця 3.4

**Умовна вартість 1 од кілер-токсину, синтезованого на суміші
ростових субстратів**

Біологічний агент	Концентрація кілер-токсину, од/мл	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного токсину, од/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 од цільового продукту, грн/од
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1106	1205	72	16,7	70,5	0,06

<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 1F1	2326	72	32,3	59,4	0,03
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M437	185,8	96	1,94	0,99	0,005

Так, з даних, наведених у табл. 4.3. видно, що умовна вартість 1 одиниці цільового продукту є найнижчою для кілер-токсину, синтезованого дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* M437, проте активність та кількість утвореного токсину *Wickerhamomyces anomalus* 1F1 є значно вищою, при цьому тривалість культивування даного штаму менша. Отже, можна зробити висновок, що найкращим продуцентом для культивування кілер-токсину є дріжджі *Wickerhamomyces anomalus* 1F1.

3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції

За статистичними даними на 2021 рік в Україні проживало близько 164 981 осіб, які мали хвороби крові, кровотворних органів та окремі порушення із залученням імунного механізму. З них у 40% хворих був високий ризик до виникнення супутнього захворювання – кандидозу. Отже, можемо розрахувати загальну кількість хворих на кандидоз:

$$N_{\text{хв}} = 164981 \times 40/100 = 65\,993 \text{ хворих.}$$

Станом на 2021 рік в Україні під медичним наглядом перебуває близько 155 722 ВІЛ-інфікованих людей. Серед них у 33% було встановлено кандидоз, отже загальна кількість хворих складає [83, 96]:

$$N_{\text{хв}} = 155722 \times 33/100 = 51\,389 \text{ хворих.}$$

Ністатин випускається у формі таблеток круглої форми, з двоопуклою поверхнею, вкритих плівковою оболонкою. Одна таблетка містить 500000 Од ністатину (113,6 мг), що в перерахунку складає 4400 Од/мг препарату [97].

Базовий курс лікування кандидозу: одна таблетка 3 рази на добу, добова доза становить 1 500 000 ОД, при цьому середня тривалість лікування складає 10 днів. Отже, можемо розрахувати потребу у препараті на курс для усіх хворих:

$$P_{кр} = 1500000 \times 10 \times 65993 / 4400000 = 224\,976 \text{ г} = 225 \text{ кг}$$

$$P_{вл} = 1500000 \times 10 \times 51389 / 4400000 = 175\,189 \text{ г} = 175,2 \text{ кг}$$

Узагальнені результати розрахунку потреби в препараті наведені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

**Вихідні дані для розрахунку річної потреби населення України в
препараті колагенази**

Захворювання	Доза препарату на добу, ОД	Курс лікування	Кількість хворих в Україні	Кількість препарату на річний курс лікування, кг
Кандидоз у людей з онкозахворюваннями	1 500 000 ОД	10 днів	65993	225
Кандидоз у ВІЛ-інфікованих	1 500 000 ОД	10 днів	51389	175,2
Всього				400,2

Отже, річна потреба населення України у препаратах на основі кілер-токсинів для лікування захворювань, спричинених дріжджами роду *Candida* становить 401 кг.

Враховуючи, що на ринку представлена значна кількість експортованих та вироблених в Україні протигрибкових засобів, і деякі з них все ще залишаються досить ефективними, можна зробити висновок, що обсяг виробництва має складати не більше 20% від загальної річної потреби у антикандидозних засобах.

Отже, потужність нашого виробництва складе:

$$G_{гп} = 401 \times 0,20 = 81 \text{ кг.}$$

Тобто для забезпечення потреби населення у антикандидозних засобах, в складі яких містяться кілер-токсини, потужність виробництва має бути достатньою для одержання 81 кг субстанції.

Для розрахунку кількості виробничих циклів необхідно знати тривалість виробничого циклу (Тцф), який включає тривалість ферментації з врахуванням

часу підготовки ферментера. Так, виробничий біосинтез кілер-токсину триває 72 години. Підготовка ферментера відбувається за 8 годин та включає наступні етапи: миття та огляд апарату (1,5 год), перевірка на герметичність (1 год), підігрів апарату (0,5 год), стерилізація (1 год) та охолодження апарату (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год). Кількість робочих трудоднів (Трд) складатиме 60, тоді:

$$N_{цк} = 24 \times Трд / T_{цф} = 24 \times 60 / 80 = 18 \text{ циклів}$$

Визначивши кількість циклів, можемо дізнатися кількість умовних кілограм кілер-токсину, які одержимо за цикл:

$$G_{цку} = G_{гп} / N_{цк} = 81 / 18 = 4,5 \text{ кг.}$$

Приймаючи стандартну активність кілер-токсину за 4400000 од/г препарату, можемо визначити кількість одиниць активності білку, що знаходяться одному умовному кілограмі:

$$A_{цку} = A_{ст} \times 1000 = 4400000 \times 1000 = 4\,400\,000\,000 \text{ Од фм / ум. кг препарату}$$

Кількість одиниць активності кілер-токсину в культуральній рідині з врахуванням втрат активності при виділенні в 1 товарному кілограмі можемо розрахувати за формулою:

$$A_{крт} = A_{кр} \times 10^6 (1 - E_a) / P_{кр}, \text{ звідси}$$

$A_{кр}$ – це активність препарату в культуральній рідині (2326 од /мл); E_a – сумарні втрати активності при виділенні, які становлять 0,4; $P_{кр}$ – концентрація кілер-токсину в культуральній рідині (1,5 кг/м³)

$$\text{Отже, } A_{крт} = 2326 \times 10^6 (1 - 0,4) / 1,5 = 930 \times 10^6 \text{ Од/тов.кг}$$

За одержаними значеннями визначаємо кількість товарного білку за цикл:

$$G_{цкт} = A_{цку} \times G_{цку} / A_{крт} = 4\,400\,000\,000 \times 4,5 / 930 \times 10^6 = 21,2 \text{ тов. кг /цикл}$$

Об'єм культуральної рідини, що зливається за одну ферментацію розраховується з урахуванням втрат ферменту при виділенні ($E_{св}$), які становлять 45%, отже:

$$V_{кр} = K_1 \times G_{цкт} \times C_{Ргп} / P_{кр} (1 - E_{св}) = 1,1 \times 21,2 \times 0,9 / 1,5 (1 - 0,45) = 25,44 \text{ м}^3$$

Звідси, визначаємо робочий об'єм ферментера:

$$V_{ф} = V_{кр} / (1 - E_{ф}) = 25,44 / 0,9 = 28,3 \text{ м}^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера становить:

$$V_{пф} = V_{ф} / K_{ф} = 28,3 / 0,6 = 47,2 \text{ м}^3$$

Отже, для виробничого біосинтезу кілер-токсину обираємо ферментер об'ємом 50 м³ (V_{Гф}).

Уточнюємо значення коефіцієнту заповнення ферментеру, який має бути в діапазоні 0,5 – 0,6, оскільки культивування проводиться в аеробних умовах:

$$K_{уф} = V_{ф} / V_{Гф} = 28,3 / 50 = 0,56.$$

За отриманим значенням можна зробити висновок, що об'єм ферментера було обрано вірно.

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

Кілер-токсини дріжджів – це екзометаболіти білкового походження, для яких характерна висока антагоністична активність проти чутливих мікроорганізмів [98].

В попередній роботі було обрано біосинтез кілер-токсинів проти різних видів *Candida* за допомогою дріжджів *Wickerhamomyces anomalus* 1F1 та запропоновано стадії виділення та очищення отриманої субстанції кілер-токсинів [72].

Як було раніше сказано, кілер-токсини є білковими екзометаболітними структурами, що свідчить про їх розташування не в біомасі зазначених дріжджів, а в супернатанті. Тому перша стадія виділення та очищення кілер-токсинів буде полягати у відокремленні біомаси від супернатанту (інші синоніми: надосад чи фугат).. На цій стадії варто розглянути різні способи відокремлення твердої фази від рідкої, до яких відносять: фільтрування, центрифугування, флотації та ін.

Після того як фугат буде відокремлено, необхідно переходити до стадії очищення цільового продукту, з врахуванням усіх його біохімічних та фізичних особливостей. Проте, за попередніми розрахунками було визначено, що об'єм отриманого супернатанту буде дуже великим, а це буде нести за собою додаткові витрати реагентів та більш габаритне обладнання, що буде здорожчувати виробництво білкового продукту. Тому, після відокремлення фугату наступною стадією пропонується здійснювати концентрування супернатанту.

Після того, як фугат буде зконцентровано, варто розглянути існуючі методики виділення кілер-токсинів з отриманої рідини. Оскільки цільовий продукт має білкову природу, його основною характеристикою є термолабільність, а також можливість деградації від агресивних хімічних реагентів. Тому, зазвичай, для таких продуктів використовують методи

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Красько М.О.			РОЗДІЛ 4 ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Красінко В.О.					65	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

хроматографічної очистки, яка враховує всі несприятливі чинники та намагається максимально очистити білок від забруднюючих компонентів. В основній роботі [72] для очистки кілер-токсину використовували методику ексклюзійної хроматографії.

Ексклюзійна хроматографія (SEC) розділяє молекули на основі їх розміру шляхом фільтрації через гель. Гель складається зі сферичних кульок, що містять пори певного розміру. Поділ відбувається, коли молекули різних розмірів включені або виключені з пор всередині матриці. Малі молекули дифундують у пори, і їх потік через колонку сповільнюється відповідно до їх розміру, тоді як великі молекули не потрапляють у пори та елюються в порожній об'єм колонки. Отже, молекули розділяються залежно від їх розміру, коли вони проходять через колонку, і елюються в порядку зменшення молекулярної маси [99].

Умови роботи і вибір гелю залежать від застосування і бажаної роздільної здатності. Два поширені типи поділу, які виконуються SEC, це фракціонування та знесолення (або обмін буфера). Знесолення — SEC зазвичай використовується для знесолення зразків білків або нуклеїнових кислот. Молекула, що представляє інтерес, елюється в порожній об'єм, тоді як менші молекули затримуються в порах гелю. Гель повинен мати межу виключення, значно меншу, ніж молекула, що представляє інтерес. Фракціонування — молекули різної молекулярної маси розділяються всередині гелевої матриці. За допомогою цього методу поділу молекули повинні потрапляти в діапазон фракціонування гелю [99].

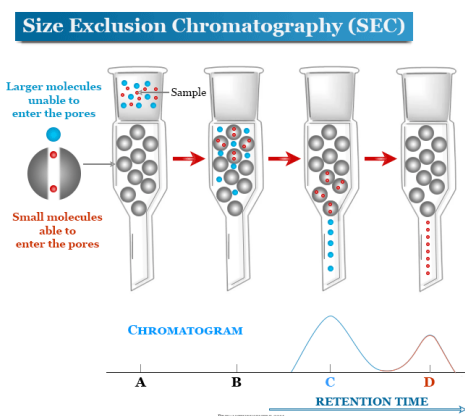


Рис.4.1. Схематичне зображення SEC [100]

В інших роботах по виділенню та очистці кілер-токсинів також використовують методику SEC. Таким чином виділяють два кілер-токсини з *Torulaspora delbrueckii* та *W. anomalus* (іранські ізоляти з ґрунту) [53], білковий токсин з *Aureobasidium pullulans* ACBL-77 [94], токсини з пробіотичних дріжджів *Yarrowia lipolytica* VIT-MN01, *Kluyveromyces lactis* VIT-MN02, *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03, *Saccharomycopsis fibuligera* VIT-MN04 та *Brettanomyces custersianus* VIT-MN05 [95], білковий продукт *Metschnikowia saccharicola* KY849584 [39] та кілер-токсини *Debaryomyces hansenii* TEM8 та TEM17 [103]. Це може казати про відпрацьованість методики для кілер-токсинів, а також про її ефективність.

Переваги ексклюзійної хроматографії полягають у наступному [104]:

- добре відокремлення великих компонентів від малих компонентів зразка за допомогою меншої кількості розчинника порівняно з іншими методами хроматографії;
- розділення не залежить від складу буфера, рН, температури та іонної сили;
- ексклюзійна хроматографія забезпечує чітке розділення аналітів;
- ця методика вимагає короткого часу аналізу;
- у цій методиці менші втрати зразка, порівняно з іншими методами хроматографії;
- швидкість потоку системи можна встановити відповідно до вимог;
- висока чутливість аналізу;
- потрібна менша кількість рухомої фази, порівняно з іншими методами;

Недоліки ексклюзійної хроматографії [105]:

- фільтрація рухомої фази необхідна, щоб запобігти перешкодам детекторам;
- основним недоліком ексклюзійної хроматографії є те, що можна розпізнати обмежену кількість піків, оскільки час роботи короткий;

- низька селективність порівняно з іншими хроматографічними методами;
- ємність зразка є ще одним серйозним недоліком.

Проаналізувавши сучасну літературу виділення та очищення кілер-токсинів, можна прийти до висновку про відсутність кращої альтернативи за метод SEC. Тому, пропонується залишити дану методику для очистки кілер-токсину з *W. anomalous* 1F1.

За роботами [72, 46, 53, 101-103], для кілер-токсинів притаманна методика знесолення. Можна виділити декілька етапів, що передбачаються для очистки кілер-токсинів хроматографічним методом:

- випадання кілер-токсину в осад;
- видалення осаду з подальшим його ресуспендуванням у відповідному буфері;
- хроматографічна очистка токсину.

Отже, після концентрування маємо осадити наш зразок, відокремити його від рідкої фракції та ресуспендувати у відповідному буфері для подальшої хроматографічної очистки.

Після того, як зразок буде очищено, його потрібно висушити. Тому, наступною стадією виділення та очищення буде саме сушіння препарату кілер-токсину. На цій стадії треба врахувати термолабільність білку, що буде спонукати до вибору більш «лагідних» методів дегідратації.

Отже, в підсумку, маємо наступну схему виділення та очищення:

- відділення супернатанту від біомаси;
- концентрування фугату;
- осадження кілер-токсину;
- відокремлення кілер-токсину від рідкої фази з подальшим ресуспендуванням у буфері;
- хроматографічна очистка кілер-токсину;
- сушіння кілер-токсину.

4.1. Обґрунтування методу відокремлення біомаси від супернатанту

Розділення культуральної рідини на тверду та рідку фази вимагає значних ресурсів, оскільки включає обробку великих обсягів суспензій. Для підвищення ефективності цього процесу та зменшення втрат цільового продукту зазвичай застосовують спеціальну підготовку культуральної рідини перед фазовим розділенням. Це призводить до зміни структури осаду, що дозволяє досягти максимального виходу продукту в ту фазу, з якої його подальше виділення стає можливим. Крім того, цей процес допомагає видалити домішки, які ускладнюють виділення цільового продукту. В залежності від вимог до ефективності відділення дисперсної фази та властивостей самої культуральної рідини для фазового розділення застосовують методи, такі як фільтрація, центрифугування, сепарація, іноді флотація [105].

Фільтрація

Принцип дії: Фільтрація полягає у просоченні рідини через фільтруючий матеріал, де тверді частки залишаються на поверхні фільтру [105].

Переваги [105]:

- простий процес;
- підходить для великих обсягів рідини та твердих часток;
- не потребує спеціального обладнання.

Недоліки [105]:

- може бути повільним для густих суспензій;
- фільтруючий матеріал може забитися, тому потребує заміни або очищення.

Центрифугування

Принцип дії: Центрифуга генерує обертову силу для відокремлення твердих та рідких фаз [105].

Переваги [105]:

- швидкий процес;
- ефективно для дрібних частинок та густих суспензій;

- можливість розділення фаз з високою відносною швидкістю обертання;

Недоліки [105]:

- під час процесу відбувається механічне руйнування клітин.

Сепарація

Принцип дії: Сепарація базується на різниці щільності часток для відокремлення фаз [105].

Переваги [105]:

- діє для рідких та газових фаз;
- висока точність відокремлення;
- зазвичай не потребує великих витрат енергії.

Недоліки [105]:

- обмежена в розділенні твердих часток;
- вимагає наявності великого обладнання;
- швидке забивання міжтарільчастого простору.

Флотація

Принцип дії: Флотація ґрунтується на приєднанні біомаси до пазирців, які піднімаються на поверхню рідини [105].

Переваги [105]:

- ефективний для обробки мікроскопічних часток;
- дозволяє виділити цінні мінерали з сировини;
- можливість керування процесом з використанням хімічних реагентів.

Недоліки:

- складний процес;
- вимагає пильної регуляції та великих витрат хімічних реагентів;
- можливий негативний вплив реагентів на біомасу.

Оскільки наш кінцевий продукт на цій стадії – це супернатант, пропонується обрати саме метод центрифугування, оскільки його недолік не має негативного впливу на наш цільовий продукт, а також через те, що це доволі простий процес, який можна автоматизувати за допомогою проточної центрифуги, тим самим зменшити втрати на цій стадії до мінімуму [105].

4.2. Обґрунтування методу концентрування фугату

Концентрування - це процес зменшення обсягу розчину або рідини, зазвичай шляхом видалення додаткової розчиненої речовини, розрідженням рідини або випаровуванням розчину. Основна мета концентрування - збільшення концентрації розчиненої речовини (солей, цукру, домішок тощо) в рідині або зменшення обсягу рідини для подальшого використання, зберігання або перевезення [105].

Існує декілька способів концентрування, включаючи [105]:

- Випаровування. Цей метод використовує підвищену температуру, щоб випаровувати розчин, залишаючи залишкову концентровану речовину. Випаровувальні апарати, такі як парові котли та евапоратори, дозволяють використовувати цей метод.
- Фільтрація – включає процес пропускання рідини через фільтруючий матеріал, що утримує тверді частки, і дозволяє зберегти чисту рідину.
- Центрифугування – використовує силу обертання для відокремлення рідини від твердих часток або інших компонентів.
- Осадження, яке полягає в осіданні твердих частинок на дно посудини та дозволяє відокремити чисту рідину.
- Мембранне фільтрування базується на використанні спеціальних мембран для відокремлення розчинених речовин за розмірами частинок.
- Дистиляція. Включає випаровування рідини та зігрівання пари з наступним збиранням та конденсацію отриманого пару для одержання конденсованої рідини.

З врахуванням термолабільності нашого кілер-токсину, використання термічних методів (випаровування та дистиляція) є недоцільним, оскільки це супроводжуватиметься значною втратою цільового продукту. Метод центрифугування більше підходить для густих рідин, а оскільки консистенція отриманого супернатанту є доволі рідкою – маємо також відмовитися від цього методу. Осадження є наступною стадією нашої очистки і для того, щоб заощадити реагенти, спочатку потрібно зменшити об'єм рідини, тому даний метод також не

маємо змоги обрати. Методи мембранного фільтрування є найліпшим варіантом серед усіх. В нашому випадку підходить використання ультрафільтраційної установки для максимального зменшення кількості втрат цільового білку.

Відомо, що ультрафільтрація забезпечує відокремлення як низькомолекулярних, так і високомолекулярних сполук. З цією метою процес очищення та концентрування буде проходити з використанням двох типів мембран, діаметр пор яких варто підбирати за молекулярною масою білку, яка складає близько 160 кДа [46]. Так, для забезпечення відділення низькомолекулярних сполук необхідно використовувати мембрану, діаметр пор якої є в три рази меншим за розміри пор кілер-токсину. Для відокремлення високомолекулярних речовин рекомендованим є застосування мембран з більшим розміром пор. Крім того основна стадія очистки – хроматографія, буде пропускати більші частинки за молекулярною масою та затримувати менші, тому для унеможливлення потрапляння додаткових речовин на наступних стадіях, пропонується обрати мембрани з діаметрами отворів 50 та 150 кДа [106]. При цьому, варто враховувати, що для ультрафільтраційних установок нерідко застосовують саме керамічні фільтри, які потребують хімічної регенерації. Зазвичай, для цього використовують трьохетапну очистку: 10% розчином хлориду натрію від усіх можливих органічних залишків, 1% розчином гідроксиду кальцію для корекції рН, та 4% розчином соди для осадження солей жорсткості [107].

4.3. Обґрунтування реагенту для осадження кілер-токсину

Осадження можна виконувати за допомогою декількох реагентів. Одним з варіантів є 40% розчин сульфату амонію [53]. Інший варіант – додавання 96% спирту в співвідношенні 2:1 [94, 101]. Ще один з можливих реагентів – це ацетон, який використовують у такому ж самому співвідношенні, що й спирт [103].

Проблема застосування сульфату амонію полягає у тому, що потрібно чекати щонайменше добу для того, щоб весь білок випав в осад. Для ацетону та спирту цей час трохи коротший та становить 12-16 годин [53, 101-103, 108]. Крім того, під час обробки сульфатом амонію відзначається дуже великий ступінь втрат цільового білку, що робить його небажаним агентом для очистки. Тому,

пропонується прорахувати економічну доцільність кожного реагенту на цій стадії. Таке порівняння показано в *таблиці 4.1*.

Таблиця 4.1

Порівняння реagentів для осадження кілер-токсину

Реагент	Частка від загального об'єму	Вартість реагенту, грн/л(кг)	Вартість реагенту на обробку 1 л розчину білка	Можливість регенерації	Джерело
Сульфат амонію	40%	82	32,8	Ні	[109]
Етанол 96-%	2 об'єми спирту до 1 об'єму зразка	60	120	Так	[110]
Ацетон	2 об'єми ацетону до 1 об'єму зразка	86,7	173,4	Так	[111]

Тож, з врахуванням порівняння з *таблиці 1.1*, найдешевшим варіантом на одноразове використання є застосування сульфату амонію, проте, в концентраті залишається велика кількість інших мінералів, з яким сульфат амонію може реагувати, через що його неможливо буде регенерувати. Також, мінусом цього реагенту є час осадження. Повертаючись до спирту та ацетону, ці реагенти можливо регенерувати шляхом ректифікації [112, 113].

З врахуванням цих особливостей, можна заощаджувати до 80% використаних розчинів [113]. Тому, залишається зробити вибір між етанолом та ацетоном. Оскільки етанол є дещо дешевшим за ацетон, обраємо саме цей реагент для осадження цільового кілер-токсину.

4.4. Обґрунтування методу відокремлення осаду кілер-токсину від спиртового розчину

Для вибору методики на цій стадії звертаємось до порівняння методів, що вказані в п. 4.1. Знову ж таки, найліпшим варіантом можна вважати центрифугування, через відсутність негативного впливу на кілер-токсин. При використанні фільтрування будуть спостерігатися високі втрати цільового продукту, який залишатиметься на фільтрувальному матеріалі, який за рахунок великого об'єму отриманого розчину може забиватися та потребувати додаткового

очищення, що супроводжуватиметься й додатковими витратами часу. Щодо флотації – дана методика також є досить довгою порівняно з центрифугування, а тому не підходить для нашого виробництва. Отже, зупиняємо вибір на центрифугуванні.

4.5. Обґрунтування буферу для ресуспендування кілер-токсину

У переважній більшості робіт, які стосуються виділення та очищення кілер-токсинів, для ресуспендування використовується натрій цитратно-фосфатний буфер в концентрації 10 мМ та з рН 4,0-4,5 [72, 53, 101, 102]. Таке рішення можна аргументувати саме рівнем рН, при якому стабільний кілер-токсин. Перше правило підбору відповідного буферу і полягає в тому, щоб визначити оптимальний рівень рН для білку [114].

Тому, пропонується залишити зазначений буфер та не виконувати будь-яких змін через відсутність відповідної інформації.

4.6. Обґрунтування буферів та смоли для хроматографії

Для хроматографії використовується декілька буферів, перший – для врівноваження колонки. Буфер для врівноваження необхідний для підтримки ефективного відновлення дисульфідних містків і алкілування тіолів, мінімізуючи при цьому повторне окислення конкуруючих тіолових пар у зразках білка, крім того він покращує роздільну здатність і запобігає появі білкових плям на 2D-гелях (електрофорез) [115].

В більшості робіт для врівноваження колонки використовують буфер 10 мМ Трис-HCl з рН 7,5 [72, 53, 101, 102], оскільки даний буферизований розчин допомагає захистити ресуспендовані РНК і ДНК від деградації, спричиненої змінами рН на етапі ресуспендування з використанням натрій-цитратного буферу (рН 4,0 – 4,5) [116].

Буфер для елюції відіграє важливу роль у кожному протоколі імунопреципітації або аналізі, який вимагає вивільнення цільового антигену з антитіла захоплення. Буфер для елюції перешкоджає та порушує взаємодію антитіло-антиген. Передумовою аналізу імунопреципітації є те, що антитіла

захоплення іммобілізовані на опорній платформі та специфічно зв'язують цільові антигени [117].

При елюції кілер-токсинів поступово використовують 2 буфери для елюції - 10 мМ Тріс-HCl (рН 7,5), що містить 0,1 і 0,5 М NaCl [72, 53, 101, 102]. Варто зазначити, що NaCl відіграє селективну функцію, а тому займає ключову роль в цих буферах [118]. Буфери для елюції зазвичай виготовляють на основі буфера для врівноваження. В іншому випадку, білок може просто денатурувати в результаті відмінностей в значеннях рН. Тому, залишаємо буфери для елюції незмінними.

Окрім буферів для хроматографії важливим є вибір смоли. Зазвичай він ґрунтується на розмірі цільового продукту. Тому, в *таблиці 4.2* показано існуючі смоли для SEC.

Таблиця 4.2.

Існуючі смоли для SEC [100]

Матеріал	Назва	Межа молекулярної маси, Да
Декстран	Sephadex G-10	0 до 700
	Sephadex G-25	1000 до 5000
	Sephadex G-50	1500 до 30000
	Sephadex G-75	3000 до 70000
	Sephadex G-100	4000 до 150000
	Sephadex G-150	5000 до 300000
	Sephadex G-200	5000 до 800000
Поліакриламід	Bio-gel P-2	100 до 1800
	Bio-gel P-6	1000 до 6000
	Bio-gel P-60	3000 до 60000
	Bio-gel P-150	15000 до 150000
	Bio-gel P-300	16000 до 400000
Agarose	Sepharose 2B	2×10^6 до 25×10^6
	Sepharose 4B	3×10^5 до 3×10^6
	Sepharose 6B	10^4 до 10^6

З врахуванням розміру цільового білку (160 кДа) [72], більш доцільним є використання смоли на декстрані - Sephadex G-50 або смоли на поліакриламіді -

Bio-gel P-60. З врахуванням того, що для виділення кілер-токсинів використовують саме декстранові смоли, для даного етапу очистки обраємо саме її.

4.7. Обґрунтування методу сушіння

Оскільки запропонований кілер-токсин є термолабільною речовиною [72], різні теплові методи сушіння спричинятимуть лише негативний вплив на білок, починаючи від втрати його активності, до повного розпадання. Цей момент зазвичай вирішується додаванням захисних компонентів, але, на жаль, відповідних актуальних досліджень щодо такого методу сушіння білкових токсинів не проведено.

Тому, із усіх можливих варіантів залишається лише метод сублімаційного сушіння. Сублімаційна сушка - це найбільш сучасний і досконалий спосіб сушіння продуктів. Незважаючи на те, що він був відкритий ще на початку двадцятого століття, широке застосування він отримав порівняно нещодавно в зв'язку з високою вартістю обладнання [119].

Суть методу полягає в тому, що при низькому атмосферному тиску вода існує тільки в твердому і газоподібному агрегатному стані, таким чином за даних умов з льоду можна отримати пар пропускаючи стадію отримання рідини [119].

Тому, враховуючи особливості кілер-токсину, зупиняємо вибір на ліофілізаційній сушарці.

РОЗДІЛ 5

ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ

Проаналізувавши літературні дані [120-123], було обрано наступні післяферментаційні стадії виділення та очищення кілер-токсинів:

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

ТП 2. Відділення біомаси

ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини

ТП 3. Концентрування супернатанту

ТП 3.1. Ультрафільтрація супернатанту

ТП 4. Осадження цільового продукту

ТП 4.1. Осадження кілер-токсину

ТП 4.2. Видалення осаду центрифугуванням

ТП 4.3. Ресуспендування осаду

ТП. 5. Очищення кілер-токсину

ТП 5.1. Хроматографічне очищення кілер-токсину

ТП 6. Сушіння цільового продукту

ТП 6.1. Сублімаційне сушіння

ТП 6.2. Подрібнення і просіювання препарату кілер-токсинів

ПМВ 7. Пакування, маркування, відвантаження

ПМВ 7.1. Фасування, пакування, маркування субстанції цільового продукту.

Вихідні дані, необхідні для проведення розподілу втрат цільового продукту по обраним післяферментаційним стадіям представлено нижче:

- об'єм культуральної рідини – $V_{кр} = 25,44 \text{ м}^3$;
- концентрація цільового продукту у культуральній рідині – $C_{фм} = 1,5 \text{ г/л}$;

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Красько М.О.			РОЗДІЛ 5 ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ	Лім.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Красінко В.О.					77	127
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

- концентрація біомаси у культуральній рідині становить $C_{\text{бм}} = 20$ г/л;
- втрати на стадіях виділення і очищення кілер-токсину складають 45%.
Початкова кількість кілер-токсинів, яка поступає з культуральної рідини складає $25,44 \times 1,5 = 38,16$ кг, натомість кінцева кількість, з врахуванням 45% втрат, має становити 21 кг.

Розподіл втрат по стадіях виділення і очищення цільового продукту та підбір необхідного обладнання наведено в *таблиці 5.1*.

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, (разом 45%)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1. Зберігання культуральної рідини						
1.	ТП 1. Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	25,44 м³	–	25,44 м³	Збірник культуральної рідини об'ємом 32 м³
ТП 2. Відділення біомаси						
2.	ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини	Біомаса	508,8 кг (25,44×20)	–	508,8 кг	Збірник для біомаси об'ємом 0,63 м³
		Кількість кілер-токсину	72,5 кг	3%	70,3 кг	–
		Фугат	24,93 м³	–	24,92 м³	Центрифуга продуктивністю 15 м³/год → за допомогою відцентрового насосу до збірника об'ємом 32 м³
ТП 3. Концентрування супернатанту						
3.	ТП 3.1. Ультрафільтрація супернатанту (ступінь концентрування $K_{уф} = 3$)	Фугат	24,92 м³	–	–	Ультрафільтраційна установка продуктивністю 12 м³/год
		Пермеат	–	–	16,63 м³	На утилізацію
		Кількість кілер-токсину	70,3 кг	8%	64,7 кг	–
		Концентрат	8,3 м³	–	8,2 м³	Перекачується за допомогою відцентрового насосу продуктивністю 5 м³/год до реактора-змішувача 32 м³
ТП 4. Осадження цільового продукту						
4.	ТП 4.1. Осадження кілер-токсину	Концентрат	8,3 м³	–	–	Реактор-змішувач об'ємом 32 м³
		Етиловий спирт 96% (2:1)	16,6 м³	–	–	Збірник об'ємом 20 м³
		Маса осаду кілер-токсинів	64,7 кг	11%	57,6 кг	–
		Водно-спиртова суміш, що містить осад кілер-токсинів	–	–	24,8 м³	Перекачується за допомогою відцентрового насосу

Продовження таблиці 5.1

1	2	3	4	5	6	7
4.	ТП 4.1. Осадження кілер-токсину	Водно-спиртова суміш, що містить осад кілер-токсинів	—	—	24,8 м³	продуктивністю 12 м³/год до центрифуги
5.	ТП 4.2. Видалення осаду центрифугуванням	Водно-спиртова суміш, що містить осад кілер-токсинів	24,8 м³	—	—	Центрифуга продуктивністю 15 м³/год
		Вологий осад кілер-токсинів (50% вологості)	57,6 кг	3%	55,9 кг	Збірник об'ємом 100 л
		Фугат	—	—	24,7 м³	На утилізацію
6.	ТП. 4.3. Ресуспендування осаду	10 мМ натрій цитратно-фосфатний буфер, рН 4,5 (1:3)	168 л	—	—	Збірник об'ємом 0,40 м³
		Вологий осад кілер-токсинів	55,9 кг	1%	55,3 кг	
		Розчин кілер-токсинів	—	—	223,5 л	
ТП 5. Очищення кілер-токсинів						
7.	ТП 5.1. Хроматографічне очищення кілер-токсинів	10 мМ Трис-НСl буфер для врівноваження колонки (1:3)	166 л	—	166 л	На утилізацію
		Розчин кілер-токсинів	223,5 л	—	—	Хроматографічна установка зі швидкістю потоку 180 л/год
		10 мМ Трис-НСl (рН 7,5) для елюювання	55,3 л	—	—	
		10 мМ Трис-НСl (рН 7,5) з 0,1 М NaCl для елюювання	55,3 л	—	—	
		10 мМ Трис-НСl (рН 7,5) з 0,5 М NaCl для елюювання	55,3 л	—	—	
		Кількість кілер-токсину	55,3 кг	12%	48,6 кг	
		Очищений розчин кілер-токсинів	—	—	214,5 л	

Закінчення таблиці 5.1

1	2	3	4	5	6	7
ТП 6. Сушіння цільового продукту						
8.	ТП 6.1. Сублімаційне сушіння	Очищений розчин кілер-токсинів	214,5 л	—	—	Сублімаційна сушарка місткістю 100 кг продукту
		Кількість кілер-токсинів	48,6 кг	—	—	
		Сухий осад кілер-токсинів (10% вологи)	—	5%	21,43 кг	Переносна ємність об'ємом 40 л
9.	ТП 6.2. Подрібнення і просіювання препарату кілер-токсинів	Сухий осад кілер-токсинів	21,42	—	—	Молотковий млин продуктивністю 40 кг/год
		Подрібнена субстанція кілер-токсинів	—	1%	21,21	Переносна ємність об'ємом 40 л
ПМВ 7. Пакування, маркування, відвантаження						
10.	ПМВ 7.1. Пакування, маркування, відвантажування субстанції цільового продукту	Подрібнена субстанція кілер-токсинів	21,21 кг	—	—	Ручне фасування в поліетиленові пакети, настільний зварювач пакетів
		Упакований в поліетиленові пакети (по 20 г) цільовий продукт	—	1%	21 кг	

РОЗДІЛ 6 **СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА** **ОЧИЩЕННЯ КІЛЕР-ТОКСИНІВ**

Таблиця 6.1

Специфікація обладнання ділянки виділення та очищення кілер-токсинів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
3-1 3-5	Збірник об'ємом 32 м ³	2	Збірник об'ємом 32 м ³ , внутрішній діаметр – 3400 мм, товщина стінки – 30 мм, виготовлений з нержавіючої сталі AISI 304L, оснащений лопатевою мішалкою з частотою перемішування 100 об/хв. Вироблений на замовлення в «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [124].
НВ-2 НВ-4 НВ-6 НВ-10 НВ-12	Відцентровий насос продуктивністю 12 м ³ /год	5	Максимальна продуктивність – 12 м ³ , виготовлений з нержавіючої сталі AISI 316, робоча температура до 110°C, максимальний тиск – 3,0 бар. Виробник: «Asco Pompe», Італія [125].
Ц-3 Ц-13	Шнекова центрифуга	2	Центрифуга Ecomash SHS 310 з максимальною продуктивністю 15 м ³ /год, діаметр ротора – 310 мм, частота обертання – 4000 об/хв, фактор розділення – 2755 x g, потужність електродвигуна приводу ротора – 18,5 кВт, потужність електродвигуна приводу шнека – 7,5 кВт. Габаритні розміри: довжина – 2180 мм, ширина – 1610 мм, висота – 880 мм. Виробник: ТОВ «НТЦ Екомаш», Україна [126].
УФ-7	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка Toray UFS 272T-S, максимальна продуктивність – 12 м ³ /год, кількість картриджів – 2 шт., матеріал фільтрувальних елементів – поліетерсульфон, діаметр пор мембран – 50 і 150 кДа, площа фільтрації – 144 м ² , робочий тиск – 1,0 – 7,0 атм, перепад тиску – 0,2-2,0 атм. Габаритні розміри: довжина – 1700 мм, ширина – 700 мм. Виробник: «Toray», Японія [127].

					НУХТ БТЕК 02.02. КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Красько М.О.			РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КІЛЕР-ТОКСИНІВ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Красінько В.О.					82	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Продовження таблиці 6.1

НВ-8 НВ-16	Відцентровий насос продуктивністю 5 м³/год	1	Відцентровий насос продуктивністю 83 л/хв, виготовлений з нержавіючої сталі AISI 316, робоча температура до 70°C, максимальний тиск – 3,0 бар. Виробник: «FINISH THOMPSON», США [125].
РЗ-9	Реактор-змішувач	1	Реактор з нержавіючої сталі AISI 316L об'ємом 32 м³, внутрішній діаметр – 3200 мм, площа поверхні теплообміну – 36 м², обладнаний лопатевою мішалкою з частотою перемішування 130 об/хв, максимальний тиск в корпусі – 0,3 МПа. Виробник: ТОВ «Azovhimservis», Україна [128].
З-11	Збірник об'ємом 20 м³	1	Збірник об'ємом 20 м³, виготовлений з нержавіючої сталі AISI 304L, внутрішній діаметр – 2400 мм, оснащений лопатевою мішалкою з частотою перемішування 100 об/хв. Габаритні розміри: довжина – 2800 мм, ширина – 2800 мм, висота – 5800 мм. Виробник: «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [129].
Е-14	Пересувна ємність об'ємом 100 л	1	Ємність об'ємом 100 л з відкритою кришкою кламп, виготовлена з нержавіючої сталі. Габаритні розміри: висота – 83 см, діаметр – 40 см, товщина кришки – 3 мм, товщина стін – 1 мм, товщина дна – 3 мм. Виробник: «Смакуй», Україна [130].
З-15	Збірник об'ємом 0,4 м³	1	Збірник об'ємом 0,4 м³, виготовлений з нержавіючої сталі AISI 304L, внутрішній діаметр – 800 мм, оснащений паровою сорочкою, якірною мішалкою з частотою перемішування 50 об/хв та лопатевою мішалкою з частотою перемішування 100 об/хв. Габаритні розміри: довжина – 1380 мм, ширина – 1380 мм, висота – 2530 мм, вага – 730 кг. Виробник: «ГК Єврохіммаш К.О.» (Україна) [129].
Хр-17	Хроматографічна установка	1	Хроматографічна установка CoPrime C196730. Швидкість потоку – 180 л/год, діапазон тиску рідини від 0 до 4 бар, діапазон температури рідини – 4-30°C. Габаритні розміри: ширина – 851 мм, довжина – 1680 мм, висота – 2035 мм, вага – 390 кг [131].
Е-18	Пересувна ємність об'ємом 300 л	1	Ємність об'ємом 300 л, виготовлена з нержавіючої сталі AISI 304. Габаритні розміри: висота – 99 см, діаметр – 66 см. Виробник: Італія [132].

Закінчення таблиці 6.1

ЛС-19	Ліофільна сушарка	1	Ліофільна сушарка LyoCompast, площа полиць – 4,32 м ² , розмір полиць – 800 × 900 мм, кількість полиць – 6 шт., відстань між полицями – 90 мм, ємність конденсатора – 80 кг, температура конденсатора – -85°C, діапазон температури на полицях від -60 до +85°C. Габаритні розміри: ширина – 1750 мм, висота – 3300 мм. Виробник: «Coolvacuum», Іспанія [133].
ДР-20	Молотковий млин	1	Молотковий млин Trinitі LS-20 продуктивністю 40 кг/год, виготовлений з нержавіючої сталі AISI 304. Частота обертання ротору – 2840 об/хв, потужність двигуна – 2,2 кВт, обладнана 6 ситами розміром від 50 до 250 мм, вага млина – 25 кг, габаритні розміри (см): 26×37,5×59. Виробник: «Trinitі», Китай [134].
Е-21	Пересувна ємність об'ємом 40 л	1	Ємність об'ємом 40 л з купольною кришкою кламп, виготовлена з нержавіючої сталі. Габаритні розміри: висота – 33 см, діаметр – 40 см, товщина кришки – 3 мм, товщина стін – 1 мм, товщина дна – 3 мм, висота купольної кришки – 15 см. Виробник: «Смакуй», Україна [135].

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КІЛЕР-ТОКСИНІВ

Технологічна схема післяферментаційних стадій одержання субстанції кілер-токсинів включає проведення технологічних процесів (зберігання культуральної рідини, відділення біомаси шляхом центрифугування, концентрування цільового продукту ультрафільтрацією з наступним осадженням кілер-токсинів етанолом, відділення осаду центрифугуванням, ліофільне висушування субстанції кілер-токсинів), а також фасування, пакування, маркування кілер-токсинів у поліетиленові пакети.

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

ТП 1.1. Зберігання культуральної рідини *Wickerhamomyces anomalus* 1F1

Після виробничого біосинтезу культуральну рідину об'ємом 25,44 м³ зберігають за температури 4±1°C у збірнику об'ємом 32 м³ (З-1). При цьому, оптимальну температуру зберігання підтримують шляхом подачі у сорочку збірника холодоагенту, а саме розчину розсолу. В подальшому культуральну рідину передають на стадію ТП 2.1.

ТП 2. Відділення біомаси *Wickerhamomyces anomalus* 1F1

ТП 2.1. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину (від ТП 1) за допомогою відцентрового насосу (НВ-2) перекачують до шнекової центрифуги (Ц-3). Для відокремлення біомаси від культуральної рідини центрифугування проводять при 4000 об/хв за температури 4°C протягом 100 хв (1,7 години), сила центрифугування складає 2755 x g. Отримана біомаса (508,8 кг) вивантажується за допомогою шнеку та передається на стадію утилізації. Фугат культуральної рідини за допомогою відцентрового насосу (НВ-4) перекачується до збірника об'ємом 32 м³ (З-5).

ТП 3. Концентрування супернатанту

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.		Красько М.О.			РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПРОЦЕСІВ ВИДІЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ КІЛЕР-ТОКСИНІВ				Літ.	Арк.	Аркушів	
Перевір.		Красінько В.О.									85	127
Реценз.									Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Затверд.		Стабніков В.П.										

ТП 3.1. Ультрафільтрація супернатанту

Фугат культуральної рідини об'ємом 24,9 м³ (від ТП 2.1) перекачують за допомогою відцентрованого насосу (НВ-6) до ультрафільтраційної установки (УФ-7) продуктивність 12 м³/год. Для очищення супернатанту від сторонніх високо- і низькомолекулярних сполук та забезпечення його концентрування розчин пропускають послідовно через фільтрувальні мембрани з розміром пор 50 та 150 кДа під тиском 1,5 – 2,5 МПа протягом 2 годин. Одержаний пермеат зливається та відправляється на утилізацію. Концентрований розчин надходить на стадію осадження кілер-токсинів ТП 4.1.

ТП 4. Осадження цільового продукту

ТП 4.1. Осадження кілер-токсинів

Концентрат кілер-токсинів об'ємом 8,2 м³ (від ТП 3.1) перекачується за допомогою відцентрового насосу (НВ-8) до реактора-змішувача об'ємом 32 м³ (РЗ-11). Для забезпечення процесу осадження за допомогою відцентрового насосу (НВ-10) зі збірника об'ємом 20 м³ (З-9) у той же реактор-змішувач (РЗ-11) перекачують охолоджений до 4°C 96% розчин етилового спирту об'ємом 16,6 м³. Отриманий розчин інкубують за температури 0-4°C, яка забезпечується шляхом подачі у сорочку реактора розчину розсолу, протягом двох годин при постійному, але повільному перемішуванні 50 об/хв. Після цього водно-спиртову суміш, що містить осад кілер-токсинів за допомогою відцентрового насосу (НВ-12) перекачують на стадію ТП 4.2.

ТП 4.2. Відокремлення осаду центрифугуванням

Осад кілер-токсинів відокремлюють шляхом центрифугування водно-спиртової суміші об'ємом 24,8 м³ (від ТП 4.1) у шнековій центрифугі (Ц-13) з охолодженням при 4000 об/хв за температури 4°C протягом 100 хв. Отриманий фугат у вигляді водно-спиртової суміші подається на стадію регенерації спирту з наступною утилізацією рідких відходів. Вологий осад масою 55,9 кг вивантажується за допомогою шнеку у переносну ємність (Е-14) об'ємом 100 л та подається на стадію ресуспендування осаду ТП 4.3.

ТП 4.3. Ресуспендування осаду кілер-токсинів

Вологий осад масою 55,9 кг (від ТП 4.2) завантажується у збірник об'ємом 400 л (Р-15), що містить 168 л 10 мМ натрій цитратно-фосфатного буферу (рН 4,5). Ресуспендування осаду здійснюється при перемішуванні 100 об/хв до повного розчинення цільового продукту. Однорідний розчин кілер-токсинів за допомогою відцентрового насосу (НВ-16) передається на стадію очищення кілер-токсинів ТП 5.

ТП 5. Очищення кілер-токсину

ТП 5.1. Хроматографічне очищення кілер-токсину

На хроматографічну колонку (Хр-17), попередньо врівноважену 10 мМ трис-НСІ буферним розчином (рН 7,5), подається за допомогою відцентрового насосу (НВ-16) з реактора (Р-15) розчин кілер-токсинів (від ТП 4.3). Після сорбції кілер-токсинів на колонці, проводять їх елюювання шляхом почергової подачі на колонку 10 мМ трис-НСІ буферу та двох розчинів 10 мМ трис-НСІ буферу, що містять 0,1 і 0,5 М натрію хлориду відповідно. Хроматографічне очищення кілер-токсинів здійснюється протягом 2 годин. Фракції, які не містять кілер-токсинів, відправляються на утилізацію. Очищені фракції, що містять кілер-токсини зливають в переносну ємність (Е-18) та подаються на стадію ліофільного висушування ТП 6.

ТП 6. Отримання висушеної субстанції кілер-токсинів

ТП 6.1. Ліофільне висушування кілер-токсинів

Очищений розчин кілер-токсинів (від ТП 5.1) розливають у лотки на полицях ліофільної сушарки (ЛС-19) та заморожують за температури -80°C . Після герметизації сублімаційної камери в ній створюють вакуумом 0,13 – 0,4 мбар, ліофільне висушування осаду здійснюють за температури -42°C протягом 72 год до вологості 10%. Висушений осад кілер-токсинів масою 21,2 кг передають на стадію подрібнення та просіювання. По закінченню процесу проводять контроль вологості, активності та концентрації білка у ліофільно-висушеній субстанції кілер-токсинів.

ТП 6.2. Подрібнення і просіювання препарату кілер-токсинів

Висушений осад кілер-токсинів (від *ТП 5.1*) із лотків ліофільної сушарки вручну завантажують до бункера молоткового млина (ДР-20). Суміш подрібнюють протягом 30 хвилин з частотою обертання ротора 2840 об/хв. Далі подрібнену субстанцію пропускають через сита, якими обладнана дробарка, з діаметром пор від 250 до 50 мкм та збирають порошок кілер-токсинів розміром 50 мкм у переносну ємність об'ємом 40 л (Е-21).

ТП 7. Пакування, маркування, відвантаження

ТП 7.1. Пакування, маркування, відвантаження субстанції кілер-токсинів

Висушену субстанцію кілер-токсинів масою 21 кг вручну пакують в поліетиленові пакети по 0,5 кг та запаюють з використанням електричного зварювача. Далі пакети маркують самоклеюною етикеткою із зазначенням назви препарату та виробника, дати виготовлення, номеру партії, умов та терміну зберігання. Промарковані пакети фасують в картонні коробки та відвантажують на склад для зберігання за температури $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ до реалізації.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ГОТОВОЇ СУБСТАНЦІЇ КІЛЕР-ТОКСИНІВ

На заключних післяферментаційних етапах одержання субстанції кілер-токсинів важливим є проведення контролю готової до реалізації продукції. До основних показників, що підлягають дослідженню, відносять: вміст вологи і концентрація білку в готовому продукті, а також активність субстанції кілер-токсинів.

8.1. Визначення концентрації білку кілер-токсинів у готовій субстанції

Визначення концентрації білка у ліофілізованому порошку здійснюється за методом Бредфорда – це швидкий і високоточний метод, який базується на використанні барвника Кумасі брильянтового синього G-250, який здатен зв'язуватись з білками у розчині, що супроводжується зміною його забарвлення. Даний метод є більш простим, швидким та чутливим порівняно з методом Лоурі, що також нерідко використовується для визначення концентрації білків [136, 137].

Суть методу. Барвник G-250 існує у двох різних формах – катіонній, що характеризується червоним забарвленням та аніонній – має синє забарвлення. Барвник у катіонній формі надає кислому розчину без вмісту білків характерного червоно-коричневого відтінку. При зв'язуванні барвника з амінокислотами білка, що несуть позитивний заряд, колір розчину змінює забарвлення на синє за рахунок переходу барвника G-250 в аніонну форму в результаті пригнічення його протонування позитивними зарядами амінокислот. Тобто метод Бредфорда заснований на утворенні комплексу між барвником та білками в розчині. Варто відмітити, що білково-барвний комплекс викликає зсув максимуму поглинання барвника з 465 до 595 нм, таким чином кількість барвника, зв'язаного з білком, можна кількісно визначити шляхом вимірювання поглинання розчину при 595 нм. Загалом принцип дії методу Бредфорда для вимірювання концентрації білку

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Красько М.О.			РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ГОТОВОЇ СУБСТАНЦІЇ КІЛЕР- ТОКСИНІВ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Красінько В.О.					89	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

можна описати реакцією, представленою на *рисунку 8.1* [136, 138].

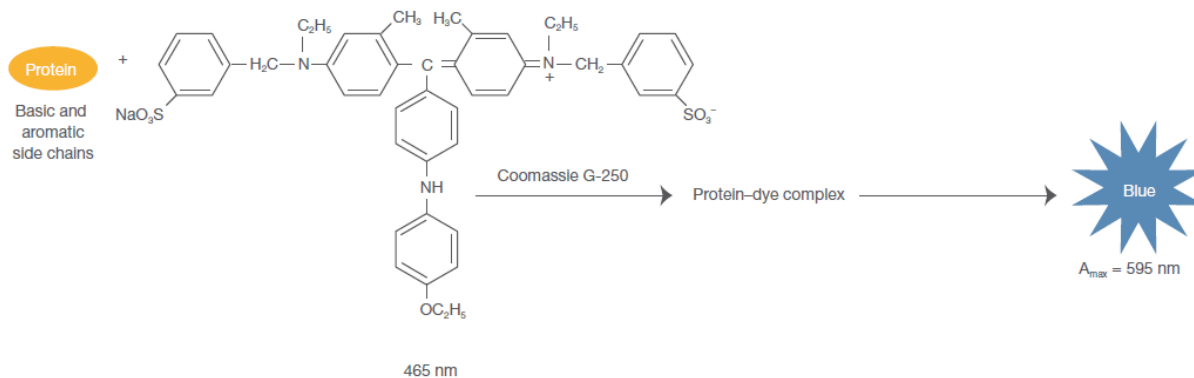


Рис. 8.1. Схема реакції аналізу білка методом Бредфорда [139]

Зазвичай для проведення стандартної процедури аналізу за Бредфордом використовуються пробірки для отримання необхідних зразків, а також кювети та спектрофотометр. Проте на сьогодні більш доцільним є проведення аналізу з використанням мікропланшетів та їх зчитувачів для визначення оптичної густини, що дозволить значно скоротити час проведення дослідження з визначення концентрації білків та потребує меншого об'єму реагентів [140].

Реактиви: набір Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit, який має в складі 1 л реактиву Бредфорда (включає барвник кумасі брильянтовий синів, метанол, фосфатну кислоту та дистильовану воду) та дві аліквоти у флаконах (по 2 мл кожна) стандартних розведень розчину бичачого сироваткового альбуміну у концентраціях: 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 мг/мл, які розведені в 0,9% NaCl або 0,05% NaN₃. Всі реактиви є стабільними протягом 1 року при зберіганні за 4°C [141].

Підготовка проби кілер-токсинів. До 100 мг субстанції кілер-токсинів вносять 1 мл стерильної дистильованої води, ретельно перемішують [142].

Методика виконання аналізу Бредфорда. Піпеткою зі змінним одноразовим наконечником відбирають по 5 мкл проби кілер-токсинів та стандартних розведень розчину бичачого сироваткового альбуміну (2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 мг/мл) і вносять у лунки прозорого мікропланшету у трьох повторностях, після чого до зразків за допомогою піпетки додають по 250 мкл реактиву Бредфорда. Вміст лунок ретельно перемішують за допомогою шейкера

протягом 60 секунд та інкубують 10 хвилин за кімнатної температури. Далі 96-лунковий прозорий мікропланшет поміщають в спектрофотометричний зчитувач для визначення оптичної густини зразків при довжині хвилі 595 нм. За отриманими даними будують калібрувальну криву (приклад наведено на *рисунку 8.2*) та визначають концентрацію білка в досліджуваному зразку [138, 141].

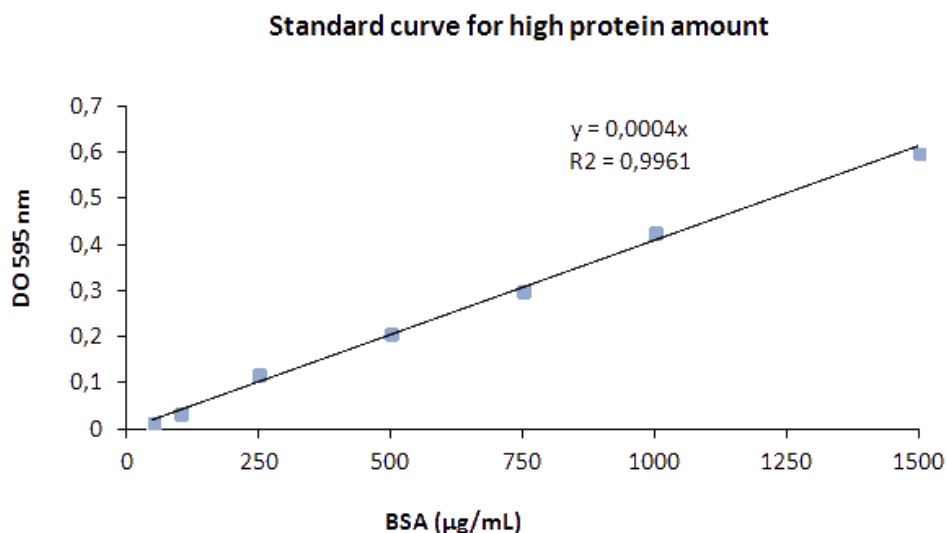


Рис. 8.2. Калібрувальна крива для визначення концентрації білка

Відомо, що дана методика має деякі обмеження, зокрема барвник не зв'язується з білками, які за молекулярною масою є менші 3 кДа, проте враховуючи, що кілер-токсини *W. anomalus* 1F1 володіють молекулярною масою близько 160 кДа, використання даного аналізу є доцільним [138, 140].

8.2. Визначення активності готової субстанції кілер-токсинів

Визначення активності кілер-токсинів в готовому продукті щодо чутливих тест-штамів є важливим для підтвердження ефективності отриманої субстанції, яка в подальшому може бути потенційним активним фармацевтичним інгредієнтом (АФІ) для лікуванні кандидозів.

За літературними даними на сьогодні найбільш поширеним методом для визначення кілерної активності є метод дифузії в агар, який включає нанесення досліджуваних розчинів на чашки (метод «циліндрів»), паперові диски чи в лунки, розміщені на поверхні чи врізані в агаризовані середовища, попередньо засіяні чутливими тест-штамами [143]. В результаті проведених досліджень [144] було

встановлено, що для визначення фунгіцидної активності найбільш чутливим є метод «лунок», який полягає в дифузії кілер-токсинів з досліджуваного зразка в товщу поживного агаризованого середовища з наступним пригніченням росту чутливих тест-штамів та утворенням чітких зон інгібування навколо досліджуваного зразка [145].

Підготовка проби кілер-токсинів. Субстанцію кілер-токсинів масою 100 мг розчиняють в 1 мл стерильної дистильованої води та доводять рН розчину до 4,6 шляхом внесенням 50 мМ буферу натрій фосфату та лимонної кислоти. Утворений зразок фільтрують через мембрану з розміром пор 0,22 мкм [146].

Підготовка чутливих тест-штамів. Активність субстанції кілер-токсинів тестували щодо еталонного штаму *C. lusitaniae* NEQAS 6208 та клінічних ізолятів, стійких до флюконазолу *C. albicans* DSY289 і *C. glabrata* DSY565. Тест-штамами дріжджів засівали скошені агаризовані середовища YPD та інкубували в термостаті за температури 30°C протягом 12 годин. Після цього нічні культури ресуспендували в стерильній дистильованій воді до кінцевої концентрації 10⁵ КУО/мл, отриману суспензію використовували в лунковому дифузійному аналізі для визначення кілерної активності [147].

Методика виконання. В стерильні чашки Петрі розливали по 30 мл розплавленого агаризованого середовища, г/л: дріжджовий екстракт – 20, пептон – 20, глюкоза – 10, агар – 30, метиленовий синій – 0,03. Чашки залишали на горизонтальній поверхні до застигання агару, після чого вносили 0,1 мл суспензії чутливих тест-штамів та рівномірно розподіляли по поверхні середовища шпателем Дригальського. Засіяні чашки залишали на 15 хвилин за кімнатної температури. Далі за допомогою стерильного пробкового бура вирізали лунки діаметром 8 мм, агарові пробки видаляли стерильним пінцетом. В утворені лунки вносили по 40 мкл попередньо підготовленої проби кілер-токсинів. Чашки Петрі інкубували протягом 48 годин за температури 25°C та вимірювали діаметри зон інгібування росту. Визначення проводили у трьох повторностях [147, 148].

Кілерну активність виражали в умовних одиницях/мл, при цьому одна умовна одиниця визначається як концентрація кілер-токсинів, що викликає зону

інгібування діаметром 1 мм [147]. За проведеними дослідженнями було встановлено, що активність субстанції кілер-токсинів складає 1396_{умОд/мл}.

8.3. Визначення вологості субстанції кілер-токсинів

Залишкова вологість є критичним параметром, який впливає на стабільності АФІ в лікарських засобах, тому необхідним є контроль даного показника в готовій субстанції кілер-токсинів [149].

Вимірювання залишкової вологи ліофільно-висушеної субстанції здійснюється термогравіметричним методом, який базується на висушуванні зразка шляхом нагрівання за певної температури протягом деякого часу з постійним контролем маси речовини, при цьому в процесі вимірювання відбувається випаровування залишкової вологи, що супроводжується зменшенням маси зразка. Це дозволяє розрахувати вміст вологи у досліджуваній речовині лише за даними вимірювання маси – вміст вологи обернено пропорційний сухій масі речовини. Аналіз здійснюється з використанням вологоміру ADGS-50, виробником якого є фірма «AXIS» (Польща). Даний вологомір оснащений лабораторними вагами та пристроєм для сушіння досліджуваних зразків, принцип його роботи полягає у автоматичному вимірюванні маси зразка перед, під час та після висушування, розрахунок вмісту вологи здійснюється автоматично за попередньо обраною формулою [150, 151].

Методика виконання. Перед початком роботи проводять калібрування ваг для забезпечення точного вимірювання маси зразку. Далі обладнання попередньо прогрівають за температури 60°C протягом 30 хвилин. Для досягнення стабільної ваги проводять подальше нагрівання аналізатора вологи до 105°C протягом 2 хвилин. Після цього ваги вологоміра автоматично тарують за допомогою шальки з фольги, яку в подальшому використовують для зважування зразка. Після закінчення підготовки вологоміра до роботи в шальку вносять наважку субстанції кілер-токсинів масою 5 г та поміщають її до аналізатора з наступним висушуванням до постійної маси за температури 105°C протягом 22,5 хвилин. Визначення вологості досліджуваного зразка здійснюється автоматично [151, 152].

Вміст води в ліофільно-висушеної субстанції кілер-токсинів має складати не більше 10%.

8.4. Мікробіологічна чистота субстанції кілер-токсинів

Мікробіологічна чистота є важливим параметром, який характеризує безпечність лікарського засобу [153]. При цьому мікробіологічна оцінка субстанції для виробництва лікарського засобу є важливою та актуальною, оскільки мікробна контамінація може знижувати або повністю усувати терапевтичний ефект АФІ чи сприяти зміні хімічних, фізичних та органолептичних властивостей лікарського препарату [154]. Враховуючи, що готова субстанція кілер-токсинів призначена до використання у фармацевтичній галузі для виробництва нестерильних лікарських засобів для орального застосування, вона має відповідати певним вимогам з мікробіологічної чистоти, наведеним в Державній Фармакопеї України, а саме:

- загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів має складати не більше 10^3 бактерій та не більше 10^2 грибів у 1 грамі;
- відсутність бактерій роду *Enterobacteriaceae* у 1 грамі;
- відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 грамі;
- відсутність *Staphylococcus aureus* у 1 грамі.

Підготовку проби та визначення мікробіологічної чистоти субстанції кілер-токсинів проводять згідно методик, наведених у Державній Фармакопеї України, видання 1, р. 2.6.12, 2.6.13 [155].

Таблиця 8.1

Карта постадійного контролю виділення та очищення кілер-токсинів

Номер контрольної точки та назва стадії	Об'єкт контролю та показник, що визначається	Засоби та методи контролю	Періодичність перевірки та відбору проб	Нормативні значення показника
1	2	3	4	5
Кт 1.1 Зберігання культуральної рідини <i>W. anotalus</i> 1F1	Культуральна рідина Температура зберігання	Термометр	Температура визначається безперервно під час зберігання рідини	$t = 4 \pm 1^\circ\text{C}$

Кт 2.1 <i>Центрифугування культуральної рідини</i>	Культуральна рідина Температура, час, швидкість обертів ротора	Термометр, годинник, технічний тахометр	Температура, час та швидкість обертів визначаються безперервно під час центрифугування	$t = 4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 100 \text{ хв}$, $\omega = 4000$ об/хв
Кт 3.1 <i>Ультрафільтрація супернатанту</i>	Фугат культуральної рідини Тиск, ступінь концентрування, час, діаметр пор мембран	Манометр, годинник, технічний паспорт мембран для контролю розміру пор	Тиск, час і ступінь концентрування визначається безперервно під час процесу, контроль діаметру пор мембран перед процесом	$P = 1,5$ МПа, $\tau = 120 \text{ хв}$, $d_1 = 50$ кДа, $d_2 = 150$ кДа, $K = 3$
Кт 4.1 <i>Осадження кілер- токсинів</i>	Концентрат культуральної рідини Температура етанолу, об'ємна частка етанолу, температура інкубування, час, частота обертів мішалки	Термометр, спиртомір, годинник, тахометр	Температура та об'ємна частка етанолу визначають перед процесом, температура інкубування, час та частота обертів мішалки визначаються безперервно під час процесу осадження	$t_{\text{етанол}} =$ 4°C , $\phi = 96\%$, $t = 0-4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 2 \text{ год}$, $\omega = 50$ об/хв
Кт 4.2 <i>Відокремлення осаду центрифугуванням</i>	Водно-спиртова суміш Температура, час, швидкість обертів ротора	Термометр, годинник, технічний тахометр	Температура, час та швидкість обертів визначаються безперервно під час центрифугування	$t = 4^{\circ}\text{C}$, $\tau = 100 \text{ хв}$, $\omega = 4000$ об/хв
Кт 4.3 <i>Ресуспендування осаду кілер- токсинів</i>	Розчин кілер- токсинів Швидкість обертів ротора, однорідність розчину	Технічний тахометр, Візуальний контроль	Частота обертів мішалки визначається безперервно, однорідність розчину контролюється візуально протягом всього процесу ресуспендування	$\omega = 100$ об/хв

Кт 5.1 <i>Хроматографічне очищення кілер-токсину</i>	Очищений розчин кілер-токсинів Тривалість процесу	Годинник	Час контролюється безперервно під час хроматографічного очищення	$\tau = 2$ год
Кт 6.1 <i>Ліофільне висушування кілер-токсинів</i>	Вологий осад кілер-токсинів Температура заморожування, температура ліофілізації, тиск, тривалість, вологість, активність і концентрація білка	Термометр, манометр, годинник, аналізатор вологості, спектрофотометр, система для електрофорезу	Температура, тиск, час визначаються безперервно під час висушування, ідентифікація кілер-токсинів, вологість, активність, концентрація білка визначається після процесу ліофільного висушування	$t_1 = -80^{\circ}\text{C}$, $t_2 = -42^{\circ}\text{C}$, $P = 0,13-0,4$ мбар, $\tau = 72$ год, $W = 10\%$ $A = 1396$ Од/мл, $C = 1,5$ мг/мл
Кт 6.2 <i>Подрібнення і просіювання препарату кілер-токсинів</i>	Ліофілізований порошок кілер-токсинів Частота обертання ротора, тривалість процесу, розмір часток	Годинник, тахометр, сито з розміром 50 мм	Частота обертання ротора та тривалість процесу контролюються безпосередньо під час подрібнення, розмір часток контролюється під час процесу просіювання	$\tau = 30$ хв, $\omega = 2840$ об/хв, $d = 50$ мкм
Кт 7.1 <i>Пакування, маркування, відвантаження субстанції кілер-токсинів</i>	Висушена субстанція кілер-токсинів Вага упакованого продукту, герметичність поліетиленових пакетів, правильність маркування, температура зберігання	Термометр, технічні ваги, візуальний контроль	Масу упакованої субстанції, герметичність поліетиленових пакетів та правильність маркування контролюють під час та після процесу пакування і маркування. Температуру визначають безперервно під час зберігання субстанції	$m = 0,5$ кг, цілісність пакетів, правильність маркування, $t = 4 \pm 1^{\circ}\text{C}$

РОЗДІЛ 9

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ КАНДИДОЗУ

9.1. Розрахунок річної потужності виробництва препарату проти кандидозу та кількості серій на рік

За один цикл одержується 21,2 кг очищеного кілер-токсину. За попередніми розрахунками відомо, що 1 таблетка містить 113,6 мг кілер токсину. Отже, кількість таблеток на 1 серію становить:

$$\frac{21\,200\,000}{113,6} \approx 184\,620 \text{ таблеток}$$

Річна потреба у кілер токсині складає 401 кг. Тоді, річна потужність фармацевтичного виробництва складатиме:

$$\frac{401\,000\,000}{113,6} \approx 3\,529\,930 \text{ таблеток}$$

Знаючи річну потужність та кількість таблеток, яка припадає на 1 цикл розраховуємо кількість серій на рік:

$$\frac{3\,529\,930}{184\,620} \approx 19 \text{ серій}$$

9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря

9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря

Для виробництва нестерильних лікарських засобів можуть використовуватися приміщення з різними класами чистоти і при їх виборі необхідно враховувати вимоги до отриманої, в результаті виробництва, продукції, а також всі можливі ризики, пов'язані з контамінацією. Переважно для виробництва нестерильних лікарських засобів використовують приміщення з класом чистоти D або C. Враховуючи, що запропонований лікарський засіб містить в собі кілер-токсин, який має антибактеріальні властивості та може

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<i>РОЗДІЛ 9 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ КАНДИДОЗУ</i>	Лім.	Арк.	Аркушів
Розроб.		<i>Красько М.О.</i>						
Перевір.		<i>Красінко В.О.</i>					97	127
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		<i>Стабніков В.П.</i>						

контактувати і втрачати свою активність через мікроорганізми навколишнього середовища, для виробництва антимікробних таблеток варто обрати клас чистоти С, а не D, в результаті чого виробництво буде здійснювати в більш строго регламентованих умовах до дозволить знизити можливий та небажаний рівень контамінації.

Клас чистоти С - це клас чистоти, який застосовується на певних, менш критичних, стадіях виробництва стерильних лікарських засобів, а також для виробництва нестерильних лікарських засобів. У приміщеннях класу С підтримується повітрообмін, що забезпечує зниження концентрації мікроорганізмів до 1000-10000 колонійутворюючих одиниць (КУО) на кубічний метр повітря [156].

Для забезпечення класу чистоти С застосовуються такі заходи [156]:

Контроль за входом персоналу. Персонал повинен проходити санітарну обробку перед входом у приміщення. На входах та виходах у виробничі зони встановлюються повітряні шлюзи.

Застосування чистого одягу та взуття. Персонал повинен одягатися в чистий одяг та взуття, для запобігання занесення забруднювачів.

Використання чистих матеріалів та обладнання. Матеріали та обладнання повинні бути чистими та не містити мікроорганізмів. Варто зазначити, що задля зменшення ризику можливої контамінації варто використовувати обладнання, що легко підлягає очищенню та дезінфекції.

Застосування ефективних методів очищення та дезінфекції. Приміщення, обладнання та матеріали повинні регулярно очищатися та дезінфікуватися.

Виробництво таблеток у приміщеннях класу С передбачає такі етапи [156]:

1. Приготування сировини. Сировина повинна бути ретельно очищена та просушена.
2. Формування таблеток. Таблетки формуються на спеціальному обладнанні.
3. Завершення виробництва. Таблетки упаковуються та маркуються.

На всіх етапах виробництва таблеток необхідно дотримуватися вимог класу чистоти С. Це допоможе забезпечити якість лікарських засобів та запобігти їхньому контамінації мікроорганізмами. Клас чистоти С є достатнім для виробництва більшості нестерильних лікарських засобів. Однак для деяких видів таблеток, наприклад, для таблеток, які містять чутливі до мікроорганізмів активні речовини, може знадобитися вищий клас чистоти [156].

Підготовка повітря для класу чистоти С включає в себе такі етапи [157]:

Фільтрація повітря. Повітря, яке надходить у приміщення класу С, фільтрується за допомогою фільтрів різних типів. Фільтри затримують мікроорганізми, пил, частинки масла та інші забруднення.

Контроль вологості повітря. Вологість повітря може сприяти росту мікроорганізмів. Тому повітря, яке надходить у приміщення класу С, осушується або зволожується до певного рівня.

Контроль температури повітря. Температура повітря також може впливати на ріст мікроорганізмів. Тому температура повітря в приміщеннях класу С контролюється та підтримується на певному рівні.

Вентиляція повітря. У приміщеннях класу С підтримується постійний повітрообмін. Це допомагає видалити забруднення з повітря та запобігти їхньому накопиченню.

Для забезпечення класу чистоти С застосовуються різні типи фільтрів. Фільтри грубої очистки затримують великі частинки, такі як пил, волосся та сміття. Фільтри тонкої очистки затримують дрібні частинки, такі як мікроорганізми та пил. Фільтри ультратонкої очистки затримують найдрібніші частинки, такі як бактерії та віруси. Вибір типу фільтрів залежить від вимог до чистоти повітря. Для забезпечення класу чистоти С застосовуються фільтри тонкої та ультратонкої очистки [157].

Осушування повітря проводиться за допомогою адсорбційних осушувачів. Адсорбційні осушувачі використовують різні речовини для поглинання вологи з повітря. Найпоширенішими речовинами є силікагель, цеоліт та активоване вугілля [157].

Контроль температури повітря проводиться за допомогою термостатів або ж теплообмінників. Термостати/теплообмінники підтримують температуру повітря на заданому рівні [157].

Вентиляція повітря в приміщеннях класу С забезпечується за допомогою систем вентиляції. Системи вентиляції можуть бути природними, при яких переміщення повітря здійснюється за рахунок різниці температур атмосферного повітря та повітря в приміщенні або різниці тисків між нижніми та верхніми рівнями приміщень, а також механічними, що передбачає використання різноманітних систем та приладів, зокрема вентиляторів, електродвигунів тощо. Механічні системи вентиляції є більш ефективними, ніж природні [157].

Важливою умовою забезпечення класу чистоти С є регулярний контроль якості повітря. Контроль якості повітря проводиться за допомогою різних методів, таких як мікробіологічний аналіз, аналіз пилу та аналіз вологості [157].

За дотримання всіх вимог, підготовка повітря для класу чистоти С допоможе забезпечити якість лікарських засобів та запобігти їхньому контамінації мікроорганізмами [157].

9.2.2. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу фармацевтичного виробництва таблеток є важливим фактором забезпечення якості лікарських засобів. Персонал повинен бути навчений і сертифікований для роботи у чистих приміщеннях. Підготовка персоналу фармацевтичного виробництва таблеток включає в себе такі етапи [157]:

- Медичний огляд. Персонал повинен пройти медичний огляд, щоб переконатися, що він здоровий і не є носієм інфекційних захворювань.
- Теоретична підготовка. Персонал повинен пройти теоретичну підготовку з питань гігієни, безпеки та якості виробництва лікарських засобів.
- Практична підготовка. Персонал повинен пройти практичну підготовку з питань роботи у чистих приміщеннях, зокрема, з питань санітарної обробки, використання чистого одягу та взуття та запобігання контамінації.

Медичний огляд проводиться для того, щоб переконатися, що персонал не є носієм інфекційних захворювань, які можуть призвести до контамінації лікарських засобів [157].

Теоретична підготовка включає в себе такі теми [157]:

- Основи гігієни.
- Безпека праці у фармацевтичного виробництві.
- Якість виробництва лікарських засобів.

Практична підготовка включає в себе такі навички [157]:

- Санітарна обробка рук.
- Використання чистого одягу та взуття.
- Запобігання контамінації.

Після закінчення підготовки персонал повинен пройти сертифікацію. Сертифікація проводиться для того, щоб підтвердити, що персонал володіє необхідними знаннями та навичками для роботи у чистих приміщеннях [157].

Сертифікація персоналу фармацевтичного виробництва таблеток проводиться за допомогою різних методів, таких як тестування, інтерв'ю та оцінка практичних навичок [157].

За дотримання всіх вимог, підготовка персоналу фармацевтичного виробництва таблеток допоможе забезпечити якість лікарських засобів та запобігти їхньому контамінації. Нижче наведено деякі конкретні приклади заходів, які можуть бути застосовані для підготовки персоналу фармацевтичного виробництва таблеток [157]:

- Проведення навчальних семінарів та тренінгів.
- Надання персоналу доступу до навчальних матеріалів та ресурсів.
- Розробка систем контролю та оцінки знань та навичок персоналу.

Важливо, щоб підготовка персоналу фармацевтичного виробництва таблеток була регулярною та систематичною. Це допоможе забезпечити, що персонал завжди має актуальні знання та навички, необхідні для роботи у чистих приміщеннях [157].

9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів

Дезінфекційні засоби класифікуються за діючою речовиною на такі групи [158]:

1. Галогени (хлор, бром, йод). Галогени мають широкий спектр антимікробної дії, включаючи бактерії, віруси, гриби та спори. Найбільш поширеним представником цієї групи є хлорвмісні дезінфікуючі засоби, такі як хлорне вапно, хлорамін.
2. Альдегіди (формальдегід, глутаральдегід, фенолформальдегідний концентрат). Альдегіди мають бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію. Найбільш поширеним представником цієї групи є формальдегід.
3. Окисники (перекис водню, перманганат калію). Окисники мають бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію. Найбільш поширеним представником цієї групи є перекис водню.
4. Спиртовмісні дезінфікуючі засоби (етиловий спирт, ізопропіловий спирт). Спиртові дезінфікуючі засоби мають бактерицидну та віруліцидну дію. Найбільш поширеним представником цієї групи є етиловий спирт.
5. Поверхнево-активні речовини (ПАР) (четвертинні амонієві сполуки, аміноспирти, фенольні ПАР). ПАР володіють бактерицидною, віруліцидною, фунгіцидною та спороцидною дією. Найбільш поширеними представниками цієї групи є четвертинні амонієві сполуки (ЧАС).
6. Дезінфекційні засоби на основі похідних гуанідину (бігуаніди). Дезінфекційні засоби на основі похідних гуанідину мають бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію. Найбільш поширеним представником цієї групи є бігуаніди.
7. Феноли (фенол, крезоли). Феноли володіють бактерицидною, віруліцидною, фунгіцидною та спороцидною дією. Найбільш поширеним представником цієї групи є фенол.

8. Кислоти (хлорна кислота, соляна кислота, оцтова кислота). Кислоти мають бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію. Найбільш поширеним представником цієї групи є хлорна кислота.
9. Луги (натрій гідроксид, калій гідроксид). Луги мають бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію. Найбільш поширеним представником цієї групи є натрію гідроксид.

Для виробництва таблеток найкраще підходять дезінфікуючі засоби з широким спектром антимікробної дії, які не викликають корозії обладнання та не впливають на властивості таблеток. Виробництво працює всього 60 днів, тому треба обрати щонайменше 2 типи препаратів з різними діючими речовинами для уникнення утворення стійкості мікроорганізмів навколишнього середовища. До таких дезінфікуючих засобів відносяться:

ЧАС (четвертинні амонієві сполуки). ЧАС мають широкий спектр антимікробної дії, включаючи бактерії, віруси, гриби та спори. Вони не викликають корозії обладнання та не впливають на властивості таблеток [159].

Бігуаніди. Бігуаніди мають широкий спектр антимікробної дії, включаючи бактерії, віруси, гриби та спори. Вони не викликають корозії обладнання та не впливають на властивості таблеток [160].

Одним із прикладів біогуанідів є метформін, який є препаратом для лікування цукрового діабету 2 типу. Метформін є похідним гуанідину і має антибактеріальну, протигрибкову та противірусну дію [160].

Іншим прикладом біогуанідів є гексаметилентетрамін, який використовується як дезінфікуючий засіб. Гексаметилентетрамін має бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та спороцидну дію.

До біогуанідів також відносяться [160]:

- диметилгуанідин;
- триметилгуанідин;
- пентаметилгуанідин;
- гексаметилентетрамін;
- гексаметилентетрамін динатрієва сіль;

➤ гексаметилентетрамін калієва сіль.

Вибір дезінфекційних засобів показано в табл. 9.1.

Таблиця 9.1.

Вибір дезінфекційних засобів для потреби виробництва таблеток на основі кілер-токсинів

Тип	Назва	Ціна за 1 л, грн	Концентрація робочого розчину, %	Ціна за 1 л робочого розчину, грн	Джерело
ЧАС	Септодор Форте	1283	0,05	0,064	[161]
	Пентасол 331	50,4	0,25	0,013	[162]
	ВАС	75	0,25	0,019	[163]
Бігуаніди	БІО-ДС	125	0,05	0,006	[164]
	Мультисепт плюс	592	0,25	0,132	[165]
	Гуанполісепт	285	2	0,57	[166]

З таблиці 9.1. очевидним є використання Пентасолу 331 та БІО-ДС як основних дезінфекційних препаратів через їх низьку вартість та вищу ефективність за низьких концентрацій робочих розчинів. З врахуванням масштабності виробництва, економія на таких речах може заощадити чималу суму, а також забезпечити необхідну чистоту приміщень та обладнання.

9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Як первинна упаковка виступає м'який блістер, виконаний з фольги. Особливої підготовки для цього пакування немає, оскільки використовується великий рулон алюмінієвої фольги, який формується вже під час упакування готових таблеток до нього.

9.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Для виробництва нестерильних таблеток потрібна вода очищена. Вода очищена повинна відповідати вимогам ДСТУ 42-3.7-2013 «Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації» [167].

Вода очищена це вода для виготовлення лікарських препаратів, при виробництві яких до води не висувають вимоги щодо стерильності та/або апірогенності. Вода очищена, що задовільно пройшла випробування на ендотоксини, може бути використана при виробництві розчинів для діалізу. Основні вимоги до якості води очищеної, яка використовується для виробництва нестерильних таблеток [167]:

1. Хімічна чистота

Вода очищена повинна бути вільною від домішок, які можуть негативно впливати на якість таблеток. До таких домішок відносяться органічні речовини (наприклад, органічні розчинники, залишки лікарських речовин), неорганічні речовини (наприклад, солі, мікроелементи, важкі метали), радіонукліди.

2. Фізичні властивості

Вода очищена повинна відповідати певним фізичним властивостям, таким як: загальна жорсткість, хімічна жорсткість, мінералізація, рН

Вода очищена виробляється на спеціалізованих підприємствах. Її якість контролюється відповідно до вимог ДСТУ [167].

Очищення водопровідної води для отримання води очищеної проводиться за допомогою багатоступеневої технології, яка включає в себе наступні стадії [167]:

1. Первинне очищення

Вода очищається від більш дрібних механічних домішок, а також від органічних речовин, таких як мул, гнилі речовини та інші. Для цього використовують такі методи, як:

- Фільтрація
- Адсорбція
- Знезараження

Фільтрація - це процес видалення з води твердих частинок за допомогою фільтра. Фільтрами можуть бути піскові фільтри, вугільні фільтри, мембранні фільтри та інші.

Адсорбція - це процес поглинання речовини поверхнею твердого тіла. Для адсорбції домішок з води використовують такі адсорбенти, як активоване вугілля, цеоліт, алюмінієвий гідроксид та інші.

Знезараження - це процес знищення мікроорганізмів у воді. Для знезараження використовують такі методи, як:

- Хлорування
- Озонування
- Ультрафіолетове опромінення

Хлорування - це процес додавання в воду хлору або хлоровмісних сполук. Хлор руйнівню діє на мікроорганізми, але при цьому може утворюватися хлорорганічні сполуки, які є токсичними.

Озонування - це процес додавання в воду озону. Озон руйнівню діє на мікроорганізми, а також на деякі органічні речовини.

Ультрафіолетове опромінення - це процес опромінення води ультрафіолетовим світлом. Ультрафіолетове світло також руйнівню діє на мікроорганізми.

Оскільки це першочергова стадія, пропонується обрати більш простий та дешевий метод серед усіх зазначених, а саме первинна фільтрація крізь піщаний фільтр.

2. Вторинне очищення

На другій стадії вода очищається від органічних речовин, які можуть залишитися після первинного очищення. Для цього використовують такі методи, як:

- Коагуляція
- Фільтрація
- Адсорбція

Коагуляція - це процес утворення з органічних речовин зважених частинок, які потім видаляються з води за допомогою фільтрації. Для коагуляції використовують такі реагенти, як хлорид алюмінію, сульфат заліза та інші.

Коагуляція застосовується найчастіше, а тому пропонується залишити саме цю методику очищення.

3. Третинне очищення

На третій стадії вода очищається від мінеральних солей, важких металів та радіонуклідів. Для цього використовують такі методи, як:

- Адсорбція
- Діонізація
- Зворотній осмос

Діонізація - це процес видалення з води іонів мінеральних солей. Діонізація проводиться за допомогою електролітичної установки.

Метод зворотного осмосу - це метод очищення води, який використовує напівпроникну мембрану, яка пропускає молекули води, але затримує розчинені в ній речовини. Метод зворотного осмосу має ряд переваг перед іншими методами очищення води:

Висока ефективність очищення. Метод зворотного осмосу дозволяє видалити з води практично всі розчинені в ній речовини.

Широкий спектр застосування. Метод зворотного осмосу може використовуватися для очищення води з різних джерел, включаючи воду з колодязів, свердловин, водопровідну воду та морську воду.

Простота експлуатації. Системи зворотного осмосу не вимагають складного обслуговування.

Тож, останньою стадією очистки обираємо саме зворотній осмос.

5. Контроль якості

Після очищення вода проходить контроль якості. Вода вважається очищеною, якщо вона відповідає вимогам ДСТУ 42-3.7-2013 «Лікарські засоби. Якість води для застосування у фармації». Очищена вода зберігається в спеціальних резервуарах, які захищені від забруднення [167].

9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Для запуску виробництва таблеток необхідно передбачити наявність необхідної сировини та здійснити її підготовку для подальшого таблетування.

Оскільки запропонований лікарський засіб має плівкове покриття, також варто передбачити стадію приготування суспензії, в яку входять усі необхідні реагенти. Враховуючи, що сама таблетка та її покриття містять велику кількість сухих компонентів в складі, варто передбачити наявність фармацевтичних змішувачів для одержання однорідних сухих сумішей.

До складу допоміжних речовин діючої речовини входять наступні компоненти: целюлоза мікрокристалічна, повідон, натрію кроскармелоза, магнію стеарат [168]. Зазвичай, целюлоза мікрокристалічна виступає в ролі розпушувача та зв'язуючої речовини та міститься в таблетці від 20 до 90% від загальної ваги, оскільки таблетка ще матиме плівкове покриття, пропонується використовувати саме 50% від маси таблетки (яка складає 0,5 г) [169]. Повідон використовується як стабілізатор, пролонгатор в межах 5% від загального об'єму таблетки, тому залишаємо цю кількість незмінною для одержання ефективного препарату [170]. Кількість натрію кроскармелоза для таблеток, одержаних прямим пресуванням становить 2% від ваги таблетки, тому будемо використовувати саму таку кількість. Ця речовина використовується в якості ще одного розпушувача. Проте відомо, що таблетки, одержані прямим пресуванням з цією речовиною можуть спокійно зберігатися протягом 14 місяців при 30 °C, звідси можна зробити висновок, що дана речовина відіграє роль консерванта [171]. Стеарат магнію використовується як ковзна речовина у кількості 0,25-5%. Оскільки для таблеток використовується ще й плівкове покриття, потреба у великій кількості цієї речовини відсутня, тому будемо додавати 0,25% від загальної маси таблетки [172].

До плівкового покриття відносяться наступні речовини: гідроксипропілметилцелюлоза, коповідон, поліетиленгліколь, тригліцериди середнього ланцюга, полідекстроза, титану діоксид (E 171), заліза оксид червоний (E 172), заліза оксид жовтий (E 172) [168]. Гідроксипропілметилцелюлоза у якості плівкоутворювача використовується в концентрації 5-10%. Пропонується вносити 10% від загальної маси таблетки [173]. Коповідон, як вініловий ефір, також застосовують в якості плівкоутворювача з метою створення препаратів з контрольованим вивільненням діючих речовин. Його додають в кількості 0,5-5%.

Тож, будемо додавати 2% для забезпечення контрольованого вивільнення препарату [174]. Поліетиленгліколь в якості плівкоутворювача використовують в концентраціях менше 5%, тому, через високу кількість препаратів суміжного характеру, будемо додавати 2,5% від загальної маси таблетки цього реагенту [175]. Тригліцериди середнього ланцюга додають у невисоких концентраціях, до 1% від загальної маси. Тому, пропонується додати 0,5% від загальної маси таблетки [176]. Полідекстрозу використовують в об'ємі до 5%, тому, пропонується використовувати 2,5% від загальної маси одержуваних таблеток [177]. Титану діоксид використовують у невеликих кількостях через його подразнювальну дію, тому будемо використовувати 0,25% від загальної маси таблеток [178]. Заліза оксид червоний та жовтий використовуються як барвник і протектор від УФ-світла, тому їх пропонується додавати в кількостях по 0,5% кожного [179].

В остатку маємо наступний склад 1 таблетки:

Кілер токсин – 113,6 мг (22,72%)

Целюлоза мікрокристалічна – 100 мг (50%)

Повідон – 25 мг (5%)

Натрію кроскармелоза – 10 мг (2%)

Стеарат магнію – 1,25 мг (0,25%)

Гідроксипропілметилцелюлоза – 50 мг (10%)

Коповідон – 10 мг (2%)

Поліетиленгліколь – 12,5 мг (2,5%)

Тригліцериди середнього ланцюга – 2,5 мг (0,5 %)

Полідекстроза – 12,5 мг (2,5%)

Титану діоксид - 1,25 мг (0,25%)

Заліза оксид червоний – 2,5 мг (0,5%)

Заліза оксид жовтий - 2,5 мг (0,5%)

Маса таблетки: 498,6 мг (99,72%).

Щоб таблетка відповідала заявленій масі, можна збільшити кількість целюлози мікрокристалічної (в загальному, 50,28%) для досягнення маси 0,5 г. Отже, тепер можемо визначити об'єм основної суміші та суміші для

плівкоутворення на 1 серію препарату. За 1 серію одержується 21,2 кг кілертоксинів, а тому загальна таблеткова маса становитиме:

$$\frac{21,2 \times 100}{22,72} \approx 93,31 \text{ кг}$$

З них 80,25% припадатиме на основну та становитиме – 74,88 кг, та 19,75% на плівкоутворювальну суміш – 18,43 кг. Таким чином, потрібно підібрати змішувач об'ємом завантаження 80 кг для основної суміші та змішувач об'ємом 20 кг для плівкоутворювальної суміші.

Для запропонованої технології для змішування основної маси може підійти змішувач барабанного типу об'ємом 200 л SYN-200. Робочий об'єм завантаження становить 190 л, а робоча вага завантаження – 50-108 кг. Швидкість головного вала становить від 0 до 15 об/хв [180].

Також, від цього ж виробника можна обрати змішувач барабанного типу SYN-50. Робочий об'єм завантаження становить 45 л, а робоча вага завантаження – 15-27 кг. Швидкість головного вала становить від 0 до 20 об/хв [180].



Рис.9.1. Зображення барабанного змішувача моделі SYN-50 та SYN-200 [180]

Після одержання основної маси її піддають прямому пресуванню за допомогою таблет-пресу. За одну серію одержується близько 184 620 таблеток, отже опираємось саме на цю кількість для вибору відповідного обладнання. Для

запропонованих потреб можна використати автоматичний таблет-пресс Gzpd-41. Його продуктивність – від 22 140 до 221 400 таблеток/год. Матриці та пуансони для пресу таблеток виготовлені зі сталі нержавіючої типу AISI 316L. Обладнання відповідає вимогам GMP та ISO 9001 [181].



Рис.9.2. Автоматичний таблет-пресс Gzpd-41 [181]

Перед тим, як приступити до покриття відповідним покриттям, з компонентами, які формують плівку утворюють суспензію з води очищеної. Для цього використовують реактори-змішувачі. Для запропонованої технології, необхідно підібрати реактор з робочим об'ємом 40 л (оскільки до сухих компонентів буде додаватись вода в пропорції 1:1). З цією метою можна використати сталевий реактор SSGR-50L. Реактор виготовляється зі сталі нержавіючої типу AISI 316L. Оснащений механічною мішалкою та сорочкою. Відповідає вимогам GMP та ISO 9001. Робочий коефіцієнт заповнення – 0,8, що повністю покриває наші потреби [182].

DOVMXTECH



Рис.9.3. Реактор-змішувач SSGR-50L [182]

Після одержання спресованої таблетованої маси та суміші плівкового покриття, можна переходити до наступної стадії, а саме до самого покриття таблеток. Це відбувається в промисловому обладнанні, яке нерідко називають коутер. Для запроектованого виробництва можна використовувати промисловий коутер моделі YC-SC-125. Об'єм завантаження апарату - 116-194 л. Робоча вага завантаження - 80-135 кг [183].



Рис.9.4. Промисловий коутер моделі YC-SC-125 [183]

Після того, як таблетки будуть вкриті плівкою, їх можна запаковувати в стрічковий блістер. Для створення такої плівки машини такого типу використовують алюмінієву стрічку та ламінатну плівку. З врахуванням того, що в 1 стрічку вкладається 10 таблеток, за 1 серію одержується 18 462 шт. Для пакування у блістери пропонується використовувати стрічковий апарат SHW-160. Продуктивність – 400-600 шт. таблеток/хв. При цьому, апарат обладнаний різакон для розрізання утворених стрічок по відповідній кількості таблеток в упаковці [184].



Рис.9.5. Стрічковий пакувальник SHW-160 [184]

Після одержання стрічок з таблетками їх потрібно упакувати в коробки та вкласти інструкцію. Для цих цілей можна використати промислову фасувальну лінію Р 91, яка складає коробки, упаковує стрічки таблеток та інструкції, а також наносить додаткову інформацію стосовно номеру партії та дати фасування (або виготовлення, в залежності від забитих параметрів). Продуктивність лінії – 90 коробок/хв. В одну коробку вкладається 3 блістери. Тому, має вийти 6154 коробок [185].



Рис.9.6. Автоматична фасувальна лінія Р 91 [185]

З врахуванням кількості коробок лікарського препарату потрібно передбачити обладнання, яке буде пакувати їх в групову упаковку. Для цього можна використати автоматичну лінію по груповій упаковці ZENIT. Продуктивність – до 6 групових упаковок за 1 хв. Наприкінці циклу має вийти 62 групові упаковки (по 100 шт. готового лікарського препарату в коробці) [186].

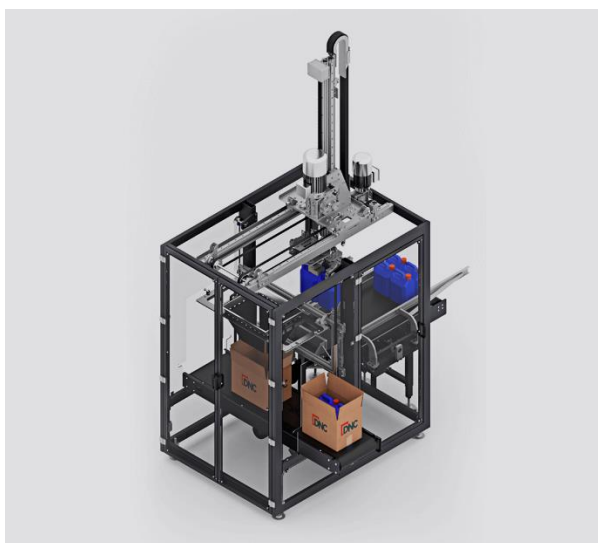


Рис.9.7. Лінія групової упаковки ZENIT [186]

РОЗДІЛ 10

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ТАБЛЕТОК ПРОТИ КАНДИДОЗУ

Специфікація обладнання, яке використовується для виробництва препарату проти кандидозу, де АФІ виступає кілер-токсин показано в табл.10.1.

Таблиця 10.1.

Специфікація обладнання фармацевтичного виробництва лікарського засобу проти кандидозу

Позиція	Найменування	Кіль- кість	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник виконаний з нержавіючої сталі та оснащений металевою сіткою. Висота – 15 м. Виробник: «Darco», Україна [187]
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний фільтр грубої очистки. Клас очистки – G4. Ступінь очищення повітря 65-90%. Матеріал фільтру – поліетиленове мікроволокло. Виробник: «Alter Air», Україна [188]
В-3	Вентилятор	1	Вентилятор відцентровий OBR 200 M-2K. Продуктивність – 1800 м³/год. Енергоспоживання – 0,45 кВт. Оберти двигуна – 2770 об/хв. Матеріал корпусу – сталь. Виробник: «Турбовент», Україна [189]
К-4	Електрокалорифер	1	Електрокалорифер СФО-25Д. Продуктивність – 1800 м³/год. Енергоспоживання – 25 кВт. Габарити (мм): 650*300*200. Виробник: «Промтехком», Україна [190]
П-5	Парозволожувач	1	Парозволожувач DT Group MDC300. Продуктивність – 300 м³/год. Діапазон вологості - 30-95 %. Виробник: «DT Group», Литва [191]
Ф-6	Фільтр тонкої очистки повітря	1	Фільтр тонкої очистки Futura F7. Клас очистки - F7. Габарити фільтру (мм): 400x220x48. Виробник: «Jablotron», Чехія [192]
Ф-7	Фільтр надтонкої очистки	1	НЕРА фільтр. Клас чистоти – H12. Габарити фільтру (мм): 305x610x78. Матеріал – мікроскловолокло. Виробник: «technoparts», Україна [193]

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ									
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ТАБЛЕТОК ПРОТИ КАНДИДОЗУ				Літ.	Арк.	Аркушів			
Розроб.		Красько М.О.										114	127 114	
Перевір.		Красінько В.О.							Кафедра БТМ					
Реценз.														
Н. Контр.														
Затверд.		Стабніков В.П.												

Д-8 Д-23	Об'ємно-ваговий дозатор	2	Дозатор електронний для рідини. Робочий тиск від 0,5 атм до 10 атм. Похибка дозування не більш ніж 0,5%. Встановлення доз від 10 мл до 9999 л. Виробник: «АгроТех», Україна [194]
Ф-9	Фільтр піщаний для попередньої очистки води	1	Фільтр піщаний PLS 0420. Продуктивність – 9 м ³ /год. Тип підключення до комунікацій – боковий. Матеріал корпусу фільтра – поліетилен. Виробник: «Atlaspool», Китай [195]
3-10 3-13	Збірник для коагуляції речовин з води Збірник для зберігання води очищеної	2	Стальний реактор об'ємом 1000 л DFG1000. Матеріал сталь типу 316L. Оснащений перемішувачем та подвійною сорочкою. Зовнішній діаметр – 1100 мм. Швидкість перемішування – 80 об/хв. Виробник: «WUXI ZHANGHUA PHARMACEUTICAL EQUIPMENT CO., LTD.», Китай [196]
Н-11 Н-14	Насос перистальтичний	2	Перистальтичний насос МР-1150-25. Максимальна температура: 80°C. Максимальний робочий тиск - до 8 бар. Продуктивність – 1076 л/год. Виробник: «DEBEM», Італія [197]
3-12	Установка зворотнього осмосу	1	Установка зворотнього осмосу RO-6000. Продуктивність до 6000 л/год. Габарити: 800*1400*3800 мм. Робочі температури +5-+30°C. Виробник: не вказано, Україна [198]
Д-15 Д-20	Дозатор ваговий	2	Ваговий дозатор ВД-4н. Автоматичний дозатор, який може зважувати до 50 кг. Точність до 0,1 г. Матеріал – нержавіюча сталь. Виробник: ABC TECH, Україна [199]
ЗМ-16	Змішувач для основної суміші	1	Фармацевтичний змішувач об'ємом 200 л SYN-200. Робоча вага завантаження – 50-108 кг. Швидкість головного вала від 0 до 15 об/хв. Виробник: «XINGGAN», Китай [180]
Е-17 Е-19 Е-27	Пересувна ємність об'ємом 100 л	3	Ємність об'ємом 100 л з відкритою кришкою кламп, виготовлена з нержавіючої сталі. Габаритні розміри: висота – 83 см, діаметр – 40 см, товщина кришки – 3 мм, товщина стін – 1 мм, товщина дна – 3 мм. Виробник: «Смакуй», Україна [200].
ТП-18	Таблетпрес	1	Автоматичний таблет-прес Gzpd-41. Продуктивність – від 22 140 до 221 400 таблеток/год. Габарити: 1180×1180×2035 мм. Виробник: «Huizhou Pingfang Trading Co., Ltd.», Китай [181]

ЗМ-21	Змішувач для плівкоутворюючої суміші	1	Фармацевтичний змішувач об'ємом 50 л SYN-50. Робоча вага завантаження – 15-27 кг. Швидкість головного вала від 0 до 20 об/хв. Виробник: «XINGGAN», Китай [180]
Е-22	Пересувна ємність об'ємом 40 л	1	Ємність об'ємом 40 л з купольною кришкою кламп, виготовлена з нержавіючої сталі. Габаритні розміри: висота – 33 см, діаметр – 40 см, товщина кришки – 3 мм, товщина стін – 1 мм, товщина дна – 3 мм, висота купольної кришки – 15 см. Виробник: «Смакуй», Україна [135].
Р-24	Реактор-змішувач для плівкоутворюючої суспензії	1	Реактор-змішувач SSGR-50L. Реактор виготовляється зі сталі нержавіючої типу AISI 316L. Оснащений механічною мішалкою та сорочкою. Відповідає вимогам GMP та ISO 9001. Габарити: 750*650*2450 мм. Виробник: «DOVMXTECH», Китай [182]
Н-25	Насос перистальчний	1	Перистальтичний шланговий насос ВНЗ-V. Продуктивність – 100 л/год. Робочий тиск – 1,5 бар. Регулювання продуктивності: 10-100%. Виробник: «ETATRON D.S.», Італія [201]
К-26	Коутер	1	Коутер YC-SC-125. Об'єм завантаження апарату - 116-194 л. Робоча вага завантаження - 80-135 кг. Виробник: «Yenchen», Тайвань [183]
СП-28	Стрічковий автоматичний пакувальник	1	Стрічковий пакувальник SHW-160. Продуктивність – 400-600 шт. таблеток/хв. Габарити: 1150*850*1630 мм. Виробник: «HaiWang», Китай [184]
А-29	Автоматична фасувальна лінія	1	Автоматична фасувальна лінія Р 91. Продуктивність – 90 коробок/хв. Виробник: «Romaco», Німеччина [185]
АГ-30	Автоматична лінія групової упаковки ZENIT	1	Лінія групової упаковки ZENIT. Продуктивність – до 6 групових упаковок за 1 хв. Виробник: «AutoPack», США [186]

РОЗДІЛ 11

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ КАНДИДОЗУ

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1 Забір атмосферного повітря

Повітря забирається повітрязабірником (ПЗ-1) з висоти 15 метрів, щоб зменшити кількість пилових часток і біологічних агентів.

ДР 1.2 Перший ступінь очищення повітря

Одержане повітря проходить крізь фільтр грубої очистки (Ф-2). При цьому, коефіцієнт проскоку твердої фази складає 5-10 мкм. Після цього, повітря подається на вентилятор (В-3) з метою його нагнітання, а потім подається на нагрівання до електрокалориферу (К-4). У цьому апараті контролюється не лише температура, а й вологість повітря. Після всіх маніпуляцій повітря подається на парозволожувач (П-5).

ДР 1.3 Другий ступінь очищення повітря

Після проходження парозволожувача (П-5) повітря потрапляє до фільтру тонкої очистки (Ф-6), де затримуються частинки розміром 0,1-0,3 мкм. Ступінь очистки повітря на даному етапі складає 99,97 %.

ДР 1.4. Третій ступінь очищення повітря

Повітря від фільтру тонкого очищення (Ф-6) подається до фільтру надтонкого очищення типу НЕРА (Ф-7). Фільтруючий матеріал затримує від 0,5 до 2 мкм частинок. Ступінь чистоти повітря досягає 99,9995%. Далі повітря подається до приміщень класу чистоти С.

ДР 2. Приготування води очищеної

ДР 2.1. Механічна фільтрація

Через автоматичний лічильник води (Д-8) на піщаний фільтр (Ф-9) поступає вода водопровідна. Вода проходить крізь фільтр, зменшуючи кількість

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 11 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ПРОТИ КАНДИДОЗУ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Красько М.О.					117	127
Перевір.		Красінько В.О.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

механічних домішок та потрапляє самоплином до збірнику (З-10).

ДР 2.2. Пом'якшення води

Пом'якшення води здійснюється шляхом додавання у воду гідрату оксиду кальцію – 142,8 г, каустичної соди – 92,4 г та кристалічного карбонату натрію – 1 кг (З-10), попередньо зважених на технічних вагах. Після трьох годин взаємодії накипоутворюючих сполук при 90 °С із зазначеними реагентами утворюються осад. Збірник витримують у стані спокою ще 3 години, після чого, перистальтичним насосом (Н-11) подають воду до установки зворотнього осмосу (З-12).

ДР 2.3. Зворотній осмос

Отриману воду від ДР 2.2. пропускають через напівпроникну мембрану установки зворотнього осмосу (З-12). Тривалість очищення – 15 хв. Одержана вода під тиском від установки зворотнього осмосу передається до збірнику (З-13) на зберігання. Воду зберігають при температурі 4-8 °С шляхом подачі води охолодженої до збірника.

ТП 3. Змішування сумішей для таблеток

ТП 3.1. Змішування основної суміші

На ваговому дозаторі (Д-15) зважують 21,2 кг кілер-токсину, 46,92 кг целюлози мікрокристалічної, 4,66 кг повідону, 1,87 кг натрію кроскармелози та 233 г стеарату магнію, наважки пересипаються в барабан змішувача (ЗМ-16). Вмикається швидкість – 15 об/хв. Тривалість змішування – 1 година. Після чого, готову суміш пересипають в металеву ємність (Е-17) та передають на пресування.

ТП 3.2. Змішування плівкоутворюючої суміші

На ваговому дозаторі (Д-20) зважують 9,33 кг гідроксипропілметилцелюлози, 1,87 кг коповідону, 2,33 кг поліетиленгліколю, 2,33 кг полідекстрази, 233 г титану діоксиду, 466 г заліза оксиду червоного та 466 г заліза оксида жовтого. Наважки пересипаються в барабан змішувача (ЗМ-21). Вмикається швидкість – 15 об/хв. Тривалість змішування – 1 година. Після чого, готову суміш пересипають в металеву ємність (Е-22) та передають на стадію створення суспензії.

ТП 4. Таблетування основної маси під таблет-пресом

В бункер таблет-пресу (Т-18) з ємності (Е-17) висипають основну суміш лікарського засобу. Вмикають апарат, після чого починається пресування напівготової продукції. Перед цим встановлюють продуктивність в 30 000 таблеток/год. Тривалість пресування – 6 годин. Після цього, напівготовий лікарський засіб в кількості 184 620 таблеток завантажується в ємність (Є-19) та переноситься на стадію покриття.

ТП 5. Приготування плівкового покриття

До реактора-змішувача (З-24) подається суміш для утворення плівки від ТП 3.2 (Є-22). Після цього, за допомогою мірного циліндру на 0,5 л до реактору наливають 470 мл тригліцеридів середнього ланцюга. Після цього, за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-23) до реактору поступає вода очищена в об'ємі 18,43 л від ДР 2.3. зі збірник (З-13). Вмикається мішалка на обертах 50 об/хв. Тривалість перемішування – 1 година. Після цього, суспензія подається на коутер (К-26) за допомогою перистальтичного насосу (Н-25)

ТП 6. Покриття таблеток плівковою оболонкою.

До бункера коутеру (К-26) поступають пресовані таблетки від ТП 4 (Є-19). Також, за допомогою перистальтичного насосу (Н-25) до апарату підводиться суспензія плівкового покриття від ТП 5, який поступає через форсунку апарату та поступово обволікує таблетки, які знаходяться в бункері коутеру (К-26). Також, до коутеру подається повітря від ДР 1.7. для швидкого висихання та утворення плівкової оболонки. Тривалість покриття складає 2 години. Після цього, вже готовий лікарський засіб вивантажується в ємність (Є-27) та переноситься на стадію пакування в стрічку. Також, декілька таблеток вилучаються на перевірку їх якості за АНД.

ПМФ 7. Пакування готових таблеток в стрічкову упаковку

До бункеру стрічкового автоматичного пакувальника (СП-28) подаються готові таблетки з ємності (Є-27). Встановлюється швидкість апарату 600 таблеток/хв. Також, до бабін під'єднують алюмінієву фольгу та ламінатну стрічку. Покриття потрапляє в частину лінії, де злюплюється, після чого потрапляє на

матрицю з таблеткою, тим самим утворюючи герметичні комірки. Наприкінці, апарат розрізає стрічки на блістери по 10 таблеток. Вихід – 18 562 блістери. Тривалість стрічування становить 5 годин. Після чого, готові стрічки конвеєром передаються на фасування.

ПМФ 8. Фасування стрічок по коробкам

До автоматичної фасувальної лінії (А-29) конвеєром надходять стрічки з готовим препаратом. Встановлюється швидкість 90 коробок/хв. Автомат упаковує по 3 стрічки в коробку, а також вкладає туди інструкцію. Додатково автомат маркує коробки номером партії та датою виготовлення препарату, а також номером реєстрації за реєстраційним досьє. Тривалість – 2 години. Після цього, готові коробки конвеєром передаються на останню стадію групового пакування. Вихід коробок на цій стадії – 6154 шт.

ПМФ 9. Групове пакування лікарського засобу

Конвеєром лікарський препарат потрапляє до автомата групового пакування (АГ-30). Встановлюється швидкість – 6 коробок (групових)/хв. Машина фасує коробки по 100 шт. в кожну велику коробку. Тривалість – 15 хвилин. Наприкінці одержується 62 коробки, на яких вручну наносять інформацію про серію препарату та дату його виготовлення. Коробки передаються на склад на зберігання при температурі не вище 25 °С.

РОЗДІЛ 12

ОПИС ТАБЛЕТОВАНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ КІЛЕР ТОКСИНУ ЗГІДНО АНД

Ця аналітично нормативна документація поширюється на лікарський засіб, який являє собою таблетки кілер токсину, вкриті плівковою оболонкою.

Склад:

1 таблетка містить 113,6 мг кілер токсину *W. anomalus* 1F1

Допоміжні речовини: допоміжні речовини: целюлоза мікрокристалічна, повідон, натрію кроскармелозу, магнію стеарат; плівкоутворювальне покриття: гідроксипропілметилцелюлоза, коповідон, поліетиленгліколь, тригліцериди середнього ланцюжка, полідекстроза, титану діоксид (Е 171), заліза оксид червоний (Е 172), заліза оксид жовтий (Е 172).

Призначення. Лікування кандидозу.

Форма випуску. По 10 таблеток в стрічці.

Специфікація на лікарський засіб наведена в табл. 12.1.

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Визначають візуально.

Круглі, двояковипуклі таблетки, вкриті плівковою оболонкою, від білого до жовтуватого-білого кольору.

2. Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу.

Випробування проводять згідно вимог ДФУ/ЄФ, 2.9.5 з використанням автоматичної тест системи Автоматична система AutoTest 4 (див рис. 12.1).

Кожна з випробуваних одиниць таблеток повинні бути в регламентованих межах за масою - $500 \text{ мг} \pm 5 \%$ (від 475 мг до 525 мг).

					НУХТ БТЕК 02.02.07 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 12 ОПИС ТАБЛЕТОВАНОГО ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ КІЛЕР ТОКСИНУ ЗГІДНО АНД	Лім.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Красько М.О.						
Перевір.		Красінько В.О.					121	127
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Таблиця 12.1.

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Найменування показників контролю	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Круглі, двояковипуклі таблетки, вкриті плівковою оболонкою, від білого до жовтуватого білого кольору	За п. 1 АНД, візуально
Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу	500 мг $\pm$ 5 % (від 475 мг до 525 мг)	За п. 2 АНД, ДФУ/ЄФ, 2.9.5
Висота	4,5 мм $\pm$ 0,2 мм (від 4,3 мм до 4,7 мм)	За п. 3 АНД
Діаметр	9 мм $\pm$ 0,2 мм (від 8,8 мм до 9,2 мм)	За п. 4 АНД
Стійкість до роздавлювання	не менше 30 Н	За п. 5 АНД, ДФУ/ЄФ, 2.9.8
Розпадання	не більше 60 хв	За п. 6 АНД, ДФУ/ЄФ, 2.9.1
Кількісне визначення	Вміст кіле токсину в одній таблетці має бути від 110 мг до 120 мг в перерахунку на середню масу таблетки	За п. 7 АНД, ДФУ/ЄФ, 2.7.2. Тест В.
Однорідність дозованих одиниць	$AV \leq 15,0 \%$	За п. 8 АНД, ДФУ/ЄФ, 2.9.40
Розчинення	не менше Q70 за 45 хв	За п. 9 АНД, ДФУ/ЄФ, 2.9.3,
Мікробіологічна чистота	ТАМС (загальне число аеробних організмів) – не більше 10^3 КУО/мл ТУМС (загальне число дріжджових та плісневих грибів) – не більше 10^2 КУО/мл	За п. 10 АНД, ДФУ/ЄФ, 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4.



Рис. 12.1. Автоматична система для випробувань таблеток [202].

3. Висота

Випробування проводять з автоматичної тест системи Автоматична система AutoTest 4 (див рис. 12.1).

Висота має бути $4,5 \text{ мм} \pm 0,2 \text{ мм}$ (від 4,3 мм до 4,7 мм).

4. Діаметр

Випробування проводять з використанням автоматичної тест системи Автоматична система AutoTest 4 (див рис. 12.1).

Висота має бути $9 \text{ мм} \pm 0,2 \text{ мм}$ (від 8,8 мм до 9,2 мм).

5. Стійкість до роздавлювання

Випробування виконують згідно вимог ДФУ/ЄФ, 2.9.1

Випробування проводять з використанням автоматичної тест системи Автоматична система AutoTest 4 (див рис. 12.1).

Стійкість до роздавлювання має бути не менше 30 Н.

6. Розпадання

Випробування виконують згідно вимог ДФУ/ЄФ, 2.9.1

Випробування проводять з використанням приладу для визначення розпадання таблеток ED-2L (див рис. 12.2).



Рис. 12.2. Прилад для визначення розпадання таблеток ED-2L [203]

Умови випробування: Температура рідини становить 36–38 °С.

Методика дослідження. У кожному з шести трубок кошика поміщають одну таблетку або капсулу. Корзинка приєднується до механічного пристрою. Кошик занурюють у рідину. Об'єм рідини має бути таким, щоб, коли кошик знаходиться у крайньому верхньому положенні, сітка була мінімум на 15 мм нижче поверхні рідини; коли ж кошик знаходиться в найнижчому положенні, сітка була на 25 мм вище дна посудини, а верхні відкриті кінці скляних трубок — над поверхнею рідини. Вмикають прилад, по закінченні зазначеного часу кошик виймають і досліджують стан таблеток. Препарат витримав випробування, якщо всі таблетки розпалися. Вважають, що зразки розпалися, якщо на сітці: 1) немає залишку; 2) є залишок, який складається з м'якої маси, що не має відчутно твердого ядра, котре не змочується; 3) є лише фрагменти покриття (таблетки) або лише фрагменти оболонки на сітці, або, якщо були використані диски, фрагменти оболонки, які прилипли до нижньої поверхні диска.

Розпадання таблеток має бути не більше 60 хв.

7. Кількісне визначення

Випробування виконують згідно вимог та за методами зазначеними в ДФУ/ЄФ, 2.7.2. Тест В за турбідометричним методом.

Для цього використовують наступні умови [204]:

Стандартний зразок кілер токсином з визначеною концентрацією – 113,6 мг.

Розчинник – вода.

Тест культура - *C. lusitaniae* NEQAS 6208, *C. albicans* SC5314, DSY289 та *C. glabrata* DSY562, DSY565.

Інкубація при 37°C при перемішуванні 220 об/хв.

Розрахований вміст кілер токсину в одній таблетці має бути від 110 мг до 120 мг в перерахунку на середню масу таблетки.

8. Однорідність дозованих одиниць.

Розраховують приймальне число, як описано в ДФУ/ЄФ, табл. 2.9.40-2. Приймальне число має відповідати вимогам ДФУ/ЄФ, 2.9.

9. Розчинення

Випробування виконують згідно вимог ДФУ/ЄФ (2.6.3). використовуючи прилад з лопаттю. Об'єм середовища розчинення – 950 мл, температура - $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, швидкість обертання лопаті – 50 об/хв, час розчинення – 45 хв. Проби відбирають на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 хвилини та визначають вміст кілер токсину, відповідним методом кількісного визначення п.7.

Вивільнення кілер токсину з таблетки має бути не менше Q70 (75%) за 45 хв.

10. Мікробіологічна чистота

Випробування виконують згідно вимог ДФУ/ЄФ (2.6.12, 2.6.13, 5.1.4).

Підготовка зразку: Таблетки розчиняють (розведення 1:10) у фосфатному буферному розчині з рН 7,2. Зразок переносять на мембранний фільтр, фільтрують та відмивають мембранний фільтр підходящим об'ємом промивної рідини.

Для визначення загального числа аеробних мікроорганізмів мембранні фільтри переносять на 2 чашки Петри і додають від 15 мл до 20 мл соєво-казеїнового агару температурою не вище 45°C .

Після застигання агару чашки інкубують при температурі від 30°C до 35°C протягом 5 діб.

Для визначення загального числа дріжджових і плісневих грибів мембранні фільтри висівають на 2 чашки Петрі і додають від 15 мл до 20 мл Сабуро-декстрозного агару температурою не вище 45°C .

Після застигання агару чашки інкубують при температурі від 20°C до 25°C протягом 7 діб.

Виконують негативний контроль.

Підрахунок числа КУО в 1 г виконується згідно формули:

$$\sum k \times x / n, \text{ де:}$$

$\sum k$ – кількість колоній на чашках;

n – кількість чашок, що використовується при контролі (для ТАМС – 2, для ТУМС – 2);

x – показник розведення (для ТАМС – 50, для ТУМС – 20)

При відсутності колоній на чашках результати визначають:

в 1 г ТАМС < 10³ КУО; ТУМС < 10² КУО.

Випробування для визначення *Escherichia coli*

Мембранний фільтр переносять в 100 мл соєво-казеїнового бульйону.

Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 до 24 год

Струшують контейнер, 1 мл соєво-казеїнового бульйону вносять в 100 мл бульйону Мак-Конки. Інкубують при температурі від 42 °С до 44 °С від 24 до 48 год.

Після закінчення терміну інкубування виконують пересів на поверхню агару Мак-Конкі. Інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С від 18 до 72 год.

Виконують негативний контроль.

При наявності росту на агарі Мак-Конкі виконують ідентифікацію.

Пакування.

По 10 штук в алюмінієвій стрічці.

По 1 стрічці разом з інструкцією по використанню вкладають у пачку.

Маркування.

На пачці має бути зазначене торгове найменування, склад, спосіб застосування, термін придатності, спосіб застосування, штрих-код, виробник.

Транспортування.

При температурі від 2°С до 8°С у спеціалізованому транспорті.

Зберігання.

Зберігати у недоступному для дітей місці при температурі не вище 25 °С.

Термін придатності.

2 роки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B. C. (2020). Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*, 9(6), 312. doi: 10.3390/antibiotics9060312
2. Bondaryk, M., Kurzątkowski, W., & Staniszevska, M. (2013). Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii*, 30(5), 293-301. doi: 10.5114%2Fpdia.2013.38358
3. Jauregizar, N., Quindós, G., Gil-Alonso, S., Suárez, E., Sevillano, E., & Eraso, E. (2022). Postantifungal effect of antifungal drugs against *Candida*: What do we know and how can we apply this knowledge in the clinical setting?. *Journal of Fungi*, 8(7), 727. doi: 10.3390/jof8070727
4. Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., ... & Ciani, M. (2019). Yeast killer toxins: From ecological significance to application. *Critical reviews in biotechnology*, 39(5), 603-617. doi: 10.1080/07388551.2019.1601679
5. Alturki, S. N., Al-Saud, N. S., Alhenjin, A. M., & Hassan, S. M. (2019). Study of Yeast Killer Toxins and Their Interactions. *International Journal Advanced of Research*, 7(5), 314-320.
6. Gil-Rodríguez, A. M., & Garcia-Gutierrez, E. (2021). Antimicrobial mechanisms and applications of yeasts. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 114, pp. 37-72). Academic Press. doi: 10.1016/bs.aambs.2020.11.002
7. Giovati L, Santinoli C, Ferrari E, Ciociola T, Martin E, Bandi C, Ricci I, Epis S, Conti S. Candidacidal Activity of a Novel Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* against Fluconazole-Susceptible and -Resistant Strains. *Toxins (Basel)*. 2018 Feb 3;10(2):68. doi: 10.3390/toxins10020068.
8. El-Banna, Amr A. and Malak A. El-Sahn. "Yeasts Producing Killer Toxins: An Overview.". *Alex. J. Fd. Sci and Technol*. Vol. 8, No. 2, pp. 41-53, 2011.

9. Giovati L, Ciociola T, De Simone T, Conti S, Magliani W. *Wickerhamomyces* Yeast Killer Toxins' Medical Applications. *Toxins* (Basel). 2021 Sep 15;13(9):655. doi: 10.3390/toxins13090655. PMID: 34564659; PMCID: PMC8470119.
10. Bajaj, B.K., Singh, S. (2017). *Biology of Killer Yeast and Technological Implications*. In: Satyanarayana, T., Kunze, G. (eds) *Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_7
11. Magliani W, Conti S, Travassos LR, Polonelli L. From yeast killer toxins to antibiobodies and beyond. *FEMS Microbiol Lett*. 2008 Nov;288(1):1-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01340.x. PMID: 18785931.
12. Mannazzu I, Domizio P, Carboni G, Zara S, Zara G, Comitini F, Budroni M, Ciani M. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Crit Rev Biotechnol*. 2019 Aug;39(5):603-617. doi: 10.1080/07388551.2019.1601679. Epub 2019 Apr 25. PMID: 31023102.
13. Liu GL, Chi Z, Wang GY, Wang ZP, Li Y, Chi ZM. Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2015 Jun;35(2):222-34. doi: 10.3109/07388551.2013.833582. Epub 2013 Oct 9. PMID: 24102112.
14. Polonelli L, Magliani W, Ciociola T, Giovati L, Conti S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2011 Jan;99(1):35-41. doi: 10.1007/s10482-010-9496-3. Epub 2010 Aug 18. PMID: 20714805.
15. Santos A, San Mauro M, Bravo E, Marquina D. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* (Reading). 2009 Feb;155(Pt 2):624-634. doi: 10.1099/mic.0.023663-0. PMID: 19202111.
16. Цапко С.О., Красінько В.О. Кілерна активність дріжджів, виділених із рослинної сировини // Збірник матеріалів V Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія: досягнення і перспективи розвитку» (м. Пінськ, Республіка Білорусь, 25-26 листопада 2021 р.). – С. 46-48.

17. Schmitt, M., Breinig, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol* 4, 212–221 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1347>
18. Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S. et al. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ* 17, 763–773 (2010). <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.219>
19. Klassen, R., Schaffrath, R., Buzzini, P., Ganter, P.F. (2017). Antagonistic Interactions and Killer Yeasts. In: Buzzini, P., Lachance, MA., Yurkov, A. (eds) *Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_9
20. Rodríguez-Cousiño N, Maqueda M, Ambrona J, Zamora E, Esteban R, Ramírez M. A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded rna virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Mar;77(5):1822-32. doi: 10.1128/AEM.02501-10. Epub 2011 Jan 14. PMID: 21239561; PMCID: PMC3067279.
21. Becker B, Schmitt MJ. Yeast Killer Toxin K28: Biology and Unique Strategy of Host Cell Intoxication and Killing. *Toxins*. 2017; 9(10):333. <https://doi.org/10.3390/toxins9100333>
22. Irma Orentaite, Minna M. Poranen, Hanna M. Oksanen, Rimantas Daugelavicius, Dennis H. Bamford, K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research*, Volume 16, Issue 2, March 2016. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow003>
23. Gier S, Schmitt MJ, Breinig F. Expression of K1 Toxin Derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* Mimics Treatment with Exogenous Toxin and Provides a Useful Tool for Elucidating K1 Mechanisms of Action and Immunity. *Toxins* (Basel). 2017 Oct 27;9(11):345. doi: 10.3390/toxins9110345. PMID: 29076990; PMCID: PMC5705960.
24. Gier S, Simon M, Gasparoni G, Khalifa S, Schulz MH, Schmitt MJ, Breinig F. Yeast Viral Killer Toxin K1 Induces Specific Host Cell Adaptions via Intrinsic Selection Pressure. *Appl Environ Microbiol*. 2020 Feb 3;86(4):e02446-19. doi: 10.1128/AEM.02446-19. PMID: 31811035; PMCID: PMC6997729.

25. Giesselmann, E., Becker, B. & Schmitt, M.J. Production of fluorescent and cytotoxic K28 killer toxin variants through high cell density fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* 16, 228 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0844-0>
26. Gier S, Simon M, Nordström K, Khalifa S, Schulz MH, Schmitt MJ, Breinig F. Transcriptome Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Viral Killer Toxin K1. *Front Microbiol.* 2019 May 16;10:1102. doi: 10.3389/fmicb.2019.01102. PMID: 31156606; PMCID: PMC6531845.
27. Comitini, F., Mannazzu, I. & Ciani, M. *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific β -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microb Cell Fact* 8, 55 (2009). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-55>
28. Giselle A. M. Soares and Hélia H. Sato. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. *Braz. J. Microbiol.* Vol. 31(4):291-297. DOI: 10.1590/S1517-83822000000400010
29. de Ullivarri MF, Mendoza LM, Raya RR. Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014 Nov;106(5):865-78. doi: 10.1007/s10482-014-0256-7. Epub 2014 Aug 22. PMID: 25145824.
30. Melvydas V, Bružauskaitė I, Gedminienė G, Šiekštelė R. A Novel *Saccharomyces cerevisiae* Killer Strain Secreting the X Factor Related to Killer Activity and Inhibition of *S. cerevisiae* K1, K2 and K28 Killer Toxins. *Indian J Microbiol.* 2016 Sep;56(3):335-43. doi: 10.1007/s12088-016-0589-1. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27407298; PMCID: PMC4920767.
31. Melvydas, V., Serviėne, E., Cernishova, O., & Petkuniene, G. (2007). A novel X factor secreted by yeast inhibits *Saccharomyces cerevisiae* K1, K2 and K28 killer toxins. *Biologija*, 53(2).
32. Chen WB, Han YF, Jong SC, Chang SC. Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Dec; 66(12):5348-52. doi: 10.1128/AEM.66.12.5348-5352.2000. PMID: 11097913; PMCID: PMC92467.

33. Bajaj BK, Raina S, Singh S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J Basic Microbiol.* 2013 Aug;53(8):645-56. doi: 10.1002/jobm.201200187. Epub 2012 Sep 7. PMID: 22961241.
34. Hodgson, Valerie J., et al. "Anti-Candida Activity of a Novel Killer Toxin From the Yeast *Williopsis Mrakii*." *Microbiology* (Reading, England), vol. 141 (Pt 8), 1995, pp. 2003-2012.
35. Buzzini P, Corazzi L, Turchetti B, Buratta M, Martini A. Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiol Lett.* 2004 Sep 15;238(2):359-65. doi: 10.1016/j.femsle.2004.07.060. PMID: 15358421.
36. Wang XX, Chi Z, Peng Y, Wang XH, Ru SG, Chi ZM. Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiol Res.* 2012 Oct 12;167(9):558-63. doi: 10.1016/j.micres.2011.12.001. Epub 2011 Dec 29. PMID: 22209575.
37. Al-Qaysi SAS, Al-Haideri H, Thabit ZA, Al-Kubaisy WHAA, Ibrahim JAA. Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Mycocin Produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *Int J Microbiol.* 2017;2017:2605382. doi: 10.1155/2017/2605382. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28757872; PMCID: PMC5512030.
38. Marquina D, Barroso J, Santos A, Peinado JM. Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiol Res.* 2001;156(4):387-91. doi: 10.1078/0944-5013-00117. PMID: 11770858.
39. da Silva S, Calado S, Lucas C, Aguiar C. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT. *Microbiol Res.* 2008;163(2):243-51. doi: 10.1016/j.micres.2007.04.002. Epub 2007 Aug 29. PMID: 17761407.
40. Guo FJ, Ma Y, Xu HM, Wang XH, Chi ZM. A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2013 Apr;103(4):737-46. doi: 10.1007/s10482-012-9855-3. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23180377.

41. Tay ST, Lim SL, Tan HW. Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. BMC Complement Altern Med. 2014 Nov 8;14:439. doi: 10.1186/1472-6882-14-439. PMID: 25380692; PMCID: PMC4246603.
42. Buzdar MA, Chi Z, Wang Q, Hua MX, Chi ZM. Production, purification, and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. Appl Microbiol Biotechnol. 2011 Sep;91(6):1571-9. doi: 10.1007/s00253-011-3220-8. Epub 2011 May 6. PMID: 21547457.
43. Chunming Tan, Lin Wang, Yong Xue, Shuo Lin, Gang Yu, Shaoling Yang, Purification and molecular characterization of a *Metschnikowia saccharicola* killer toxin lethal to a crab pathogenic yeast, FEMS Microbiology Letters, Volume 365, Issue 10, May 2018, fny038, <https://doi.org/10.1093/femsle/fny038>
44. Belda I, Ruiz J, Alonso A, Marquina D, Santos A. The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. Toxins (Basel). 2017 Mar 23;9(4):112. doi: 10.3390/toxins9040112. PMID: 28333108; PMCID: PMC5408186.
45. Wang L, Yue L, Chi Z, Wang X. Marine killer yeasts active against a yeast strain pathogenic to crab *Portunus trituberculatus*. Dis Aquat Organ. 2008 Aug 7;80(3):211-8. doi: 10.3354/dao01943. PMID: 18814546.
46. Tan, C., Wang, L., Xue, Y., Yu, G., Yang, S., & Lin, S. (2018). Marine killer yeast *Metschnikowia saccharicola* active against pathogenic yeast in crab and an optimization of the toxin production. African Journal of Biotechnology, 17(21), 668-679.
47. Hua MX, Chi Z, Liu GL, Buzdar MA, Chi ZM. Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. Extremophiles. 2010 Nov;14(6):515-21. doi: 10.1007/s00792-010-0331-6. Epub 2010 Oct 26. PMID: 20972898.
48. Stopiglia CD, Heidrich D, Sorrentino JM, Vieira FJ, Landell MF, Valente P, Scroferneker ML. Susceptibility of species within the *Sporothrix schenckii* complex to a panel of killer yeasts. J Basic Microbiol. 2014 Jun;54(6):578-84. doi: 10.1002/jobm.201200516. Epub 2013 May 17. PMID: 23686831.

49. Radhamany D, Sunil Rao P, Kotigadde S. Bioregulatory role of *Wickerhamomyces anomalus* killer toxin against pathogenic members of the genus *Candida*. Department of microbiology. 2019; 9 (4):155-160. doi: 10.5799/jmid.657890.
50. Banjara N, Nickerson KW, Suhr MJ, Hallen-Adams HE. Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. Int J Food Microbiol. 2016 Apr 2;222:23-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016. Epub 2016 Jan 25. PMID: 26828815.
51. Fredericks LR, Lee MD, Eckert HR, Li S, Shipley MA, Roslund CR, Boikov DA, Kizer EA, Sobel JD, Rowley PA. Vaginal Isolates of *Candida glabrata* Are Uniquely Susceptible to Ionophoric Killer Toxins Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother. 2021 Jun 17;65(7):e0245020. doi: 10.1128/AAC.02450-20. Epub 2021 Jun 17. PMID: 33972245; PMCID: PMC8218651.
52. Tan HW, Tay ST. Anti-*Candida* activity and biofilm inhibitory effects of secreted products of tropical environmental yeasts. Trop Biomed. 2011 Apr;28(1):175-80. PMID: 21602784.
53. Abu-Mejdad, N.M.J.A., Al-Saadoon, A.H., Al-Badran, A.I. et al. Optimum conditions of killer toxins produced by *Torulaspora delbrueckii* and *Wickerhamomyces anomalus* and their action as antifungal agents. Bull Natl Res Cent 44, 148 (2020). <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00407-8>
54. Abu-Mejdad, N.M.J.A., Al-Badran, A.I. & Al-Saadoon, A.H. Purification and characterization of two killer toxins originated from *Torulaspora delbrueckii* (Lindner) and *Wickerhamomyces anomalus* (E.C.Hansen) Kurtzman, Robnett, and Basehoar-Powers. Bull Natl Res Cent 44, 48 (2020). doi.org/10.1186/s42269-020-00308-w
55. Paris AP, Persel C, Serafin CF, de Cássia Garcia Simão R, Gandra RF. Susceptibility of *Candida albicans* Isolated from Blood to *Wickerhamomyces anomalus* Mycocins. Curr Microbiol. 2016 Dec;73(6):878-884. doi: 10.1007/s00284-016-1135-4. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27638312.
56. Giovati L, Santinoli C, Ferrari E, Ciociola T, Martin E, Bandi C, Ricci I, Epis S, Conti S. Candidacidal Activity of a Novel Killer Toxin from *Wickerhamomyces*

anomalus against Fluconazole-Susceptible and -Resistant Strains. *Toxins* (Basel). 2018 Feb 3;10(2):68. doi: 10.3390/toxins10020068. PMID: 29401638; PMCID: PMC5848169.

57. Fernández de Ullivarri M, Bulacios GA, Navarro SA, Lanza L, Mendoza LM, Chalón MC. The killer yeast *Wickerhamomyces anomalus* Cf20 exerts a broad anti-*Candida* activity through the production of killer toxins and volatile compounds. *Med Mycol*. 2020 Nov 10;58(8):1102-1113. doi: 10.1093/mmy/myaa011. PMID: 32196549.

58. Cappelli A, Ulissi U, Valzano M, Damiani C, Epis S, Gabrielli MG, Conti S, Polonelli L, Bandi C, Favia G, Ricci I. A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One*. 2014 May 1;9(5):e95988. doi: 10.1371/journal.pone.0095988. PMID: 24788884; PMCID: PMC4006841.

59. Cecarini V, Cuccioloni M, Bonfili L, Ricciutelli M, Valzano M, Cappelli A, Amantini C, Favia G, Eleuteri AM, Angeletti M, Ricci I. Identification of a Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* with β -Glucanase Activity. *Toxins* (Basel). 2019 Sep 28;11(10):568. doi: 10.3390/toxins11100568. PMID: 31569379; PMCID: PMC6832412.

60. Valzano M, Cecarini V, Cappelli A, Capone A, Bozic J, Cuccioloni M, Epis S, Petrelli D, Angeletti M, Eleuteri AM, Favia G, Ricci I. A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. *Malar J*. 2016 Jan 11;15:21. doi: 10.1186/s12936-015-1059-7. PMID: 26754943; PMCID: PMC4709964.

61. Cappelli, A., Valzano, M., Cecarini, V. et al. Killer yeasts exert anti-plasmodial activities against the malaria parasite *Plasmodium berghei* in the vector mosquito *Anopheles stephensi* and in mice. *Parasites Vectors* 12, 329 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3587-4>

62. Cappelli A, Amantini C, Maggi F, Favia G, Ricci I. Formulation and Safety Tests of a *Wickerhamomyces anomalus*-Based Product: Potential Use of Killer Toxins of a Mosquito Symbiotic Yeast to Limit Malaria Transmission. *Toxins* (Basel). 2021 Sep 23;13(10):676. doi: 10.3390/toxins13100676. PMID: 34678969; PMCID: PMC8538654.

63. Calazans, G. F., SILVA, J. C. D., Delabeneta, M. F., Paris, A. P., Yassuda Filho, P., Auler, M. E., & Gandra, R. F. (2020). Antimicrobial activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from meats. *Food Science and Technology*, 41, 388-394.

64. Junges DSB, Delabeneta MF, Rosseto LRB, Nascimento BL, Paris AP, Persel C, Loth EA, Simão RCG, Menolli RA, Paula CR, Gandra RF. Antibiotic Activity of Wickerhamomyces anomalus Mycocins on Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. Microb Ecol. 2020 Aug;80(2):278-285. doi: 10.1007/s00248-020-01495-9. Epub 2020 Feb 15. PMID: 32072187.
65. Abu-Mejdad, N. M. J. A., Al-Badran, A. I., Al-Saadoon, A. H., & Minati, M. H. (2020). A new report on gene expression of three killer toxin genes with antimicrobial activity of two killer toxins in Iraq. Bulletin of the National Research Centre, 44, 1-9.
66. Chen, Y., Aorigele, C., Wang, C., Simujide, H., & Yang, S. (2015). Screening and extracting mycocin secreted by yeast isolated from koumiss and their antibacterial effect. Journal of Food and Nutrition Research, 3(1), 52-56.
67. Meinhardt, F., & Klassen, R. (2009). Yeast killer toxins: Fundamentals and applications. Physiology and genetics: selected basic and applied aspects, 107-130.
68. Cenci E, Mencacci A, Spreca A, Montagnoli C, Bacci A, Perruccio K, Velardi A, Magliani W, Conti S, Polonelli L, Romani L. Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. Infect Immun. 2002 May;70(5):2375-82. doi: 10.1128/IAI.70.5.2375-2382.2002. PMID: 11953373; PMCID: PMC127930.
69. Selvakumar D, Miyamoto M, Furuichi Y, Komiyama T. Inhibition of fungal beta-1,3-glucan synthase and cell growth by HM-1 killer toxin single-chain anti-idiotypic antibodies. Antimicrob Agents Chemother. 2006 Sep;50(9):3090-7. doi: 10.1128/AAC.01435-05. PMID: 16940106; PMCID: PMC1563539.
70. Claudia Cafarchia, Davide Immediato, Giancarlo Di Paola, Walter Magliani, Tecla Ciociola, Stefania Conti, Domenico Otranto, Luciano Polonelli, In vitro and in vivo activity of a killer peptide against *Malassezia pachydermatis* causing otitis in dogs. Medical Mycology, Volume 52, Issue 4, May 2014, Pages 350–355. <https://doi.org/10.1093/mmy/myt016>
71. Mergoni G, Manfredi M, Bertani P, Ciociola T, Conti S, Giovati L. Activity of Two Antimicrobial Peptides against *Enterococcus faecalis* in a Model of Biofilm-

Mediated Endodontic Infection. *Antibiotics* (Basel). 2021 Oct 7;10(10):1220. doi: 10.3390/antibiotics10101220. PMID: 34680801; PMCID: PMC8532894.

72. Giovati, L., Santinoli, C., Mangia, C., Vismarra, A., Belletti, S., D'Adda, T., & Kramer, L. H. (2018). Novel activity of a synthetic decapeptide against *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Frontiers in Microbiology*, 9, 753.

73. Conti G, Magliani W, Conti S, Nencioni L, Sgarbanti R, Palamara AT, Polonelli L. Therapeutic activity of an anti-idiotypic antibody-derived killer peptide against influenza A virus experimental infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Dec;52(12):4331-7. doi: 10.1128/AAC.00506-08. Epub 2008 Sep 29. PMID: 18824612; PMCID: PMC2592895.

74. Magliani, W., Conti, S., Maffei, D. L., Ravanetti, L., & Polonelli, L. (2007). Antiidiotypic-derived killer peptides as new potential tools to combat HIV-1 and AIDS-related opportunistic pathogens. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)*, 6(4), 263-272.

75. Ciociola, T., Pertinhez, T. A., De Simone, T., Magliani, W., Ferrari, E., Belletti, S., & Giovati, L. (2021). In vitro and in vivo anti-*Candida* activity and structural analysis of killer peptide (KP)-derivatives. *Journal of Fungi*, 7(2), 129.

76. Kabir ME, Karim N, Krishnaswamy S, Selvakumar D, Miyamoto M, Furuichi Y, Komiyama T. Peptide derived from anti-idiotypic single-chain antibody is a potent antifungal agent compared to its parent fungicide HM-1 killer toxin peptide. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011 Dec;92(6):1151-60. doi: 10.1007/s00253-011-3412-2. Epub 2011 Jun 21. PMID: 21691785.

77. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 2014 Feb 13;10:95-105. doi: 10.2147/TCRM.S40160. PMID: 24611015; PMCID: PMC3928396.

78. Кандидоз. [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://isida.ua/zdorove-malyisha/disease/kandidoz/>

79. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Sep 2;4(9):a019778. doi: 10.1101/cshperspect.a019778. PMID: 25183855; PMCID: PMC4143104.

80. Pappas, P., Lionakis, M., Arendrup, M. et al. Invasive candidiasis. Nat Rev Dis Primers 4, 18026 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>
81. Radhamany D, Sunil Rao P, Kotigadde S. Bioregulatory role of *Wickerhamomyces anomalus* killer toxin against pathogenic members of the genus *Candida*. Department of microbiology. 2019; 9 (4):155-160. doi: 10.5799/jmid.657890.
82. Keszthelyi A, Hamari Z, Pfeiffer I, Vágvölgyi C, Kucsera J. Comparison of killer toxin-producing and non-producing strains of *Filobasidium capsuligenum*: proposal for two varieties. Microbiol Res. 2008;163(3):267-76. doi: 10.1016/j.micres.2008.01.002. Epub 2008 Apr 1. PMID: 18387285.
83. Урогенітальні захворювання, що спричинені *Candida* spp. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.dec.gov.ua>
84. Кандидоз шкіри та ознаки його розпізнавання. [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://www.ukrinform.ua/rubric-other_news
85. Флуконазол, інструкція по застосуванню. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/260575/>
86. Капсидаз, ліофілізат для розчину для інфузій. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://compendium.com.ua/dec/267503/>
87. Ністатин – інструкція, показання, склад, спосіб застосування. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk>
88. Основні поняття клінічної фармакології. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/cardiology-uk/section-6-uk/glava-1-osnovni-ponyattya-klinichnoyi-farmakologiyi/#toc3>
89. Капсули від молочниці. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://apteka.net.ua/medykamenty/preparaty-vid-molochnytsi/f/forma-vipusku:kapsuli>
90. Що краще: капсули чи таблетки? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://3i.ua/scho-krasche-kapsuli-chi-tabletki>
91. Фасування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/340/fasuvannya>

92. Блістерна та стрічкова упаковка з алюмінієвої фольги. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ua.hw-aluminum.com/pharmaceutical-foil/blister-and-strip-packaging.html>
93. Ністатин, інструкція, застосування препарату. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua>
94. Automatic High Speed Strip Packing Machine. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.icapsulepack.com/strip-packing-machine/>
95. Вторинна упаковка таблеток – опис і особливості. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://balenko.com/vtorynna-upakovka-tabletok-opys-i-osoblyvosti/>
96. Державна служба статистики України. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://www.ukrstat.gov.ua/>
97. Ністатин, інструкція, застосування препарату. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua>
98. Цапко, С., & Красінько, В. (2021). Кілер-токсини дріжджів як новітні природні антимікробні сполуки для харчової продукції. Грааль Науки, (2-3), 196-201. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.02.04.2021.037>
99. Introduction to Size Exclusion Chromatography. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bio-rad.com/en-ua/applications-technologies/introduction-size-exclusion-chromatography?ID=LUSMV015>
100. Size Exclusion Chromatography. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.priyamstudycentre.com/2022/02/size-exclusion-chromatography.html>
101. Moura, V. S., Pollettini, F. L., Ferraz, L. P., Mazzi, M. V., & Kupper, K. C. (2021). Purification of a killer toxin from *Aureobasidium pullulans* for the biocontrol of phytopathogens. Journal of Basic Microbiology, 61(2), 77-87. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000164>
102. Ragavan, M. L., & Das, N. (2020). Production and purification of killer toxin from probiotic yeasts and its effect on foodborne pathogens. Journal of microbiology, biotechnology and food sciences, 10(3), 350-353. <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2020.10.3.350-353>

103. Çorbacı, C., & Uçar, F. B. (2018). Purification, characterization and in vivo biocontrol efficiency of killer toxins from *Debaryomyces hansenii* strains. *International journal of biological macromolecules*, 119, 1077-1082. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.121>
104. Advantages and disadvantages of size exclusion chromatography. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://chrominfo.blogspot.com/2020/04/advantages-and-disadvantages-of-size.html>
105. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.
106. Marine Geochemistry - Laboratory Methods. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sedgeochem.uni-bremen.de/dalton.html>
107. О. Ф. Луговський, А. І. Зілінський, А. В. Шульга, І. А. Гришко. (2020). Можливості регенерації фільтруючих перегородок. *Mechanics and Advanced Technologies*, (2 (89)): 55-64. DOI: 10.20535/2521-1943.2020.89.211225
108. Bedir, T. B., & Kuleaşan, H. (2021). A natural approach, the use of killer toxin produced by *Metschnikowia pulcherrima* in fresh ground beef patties for shelf life extention. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109154>
109. Сульфат амонію. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1231811732-sulfat-ammoniya-klebrig.html>
110. Етанол спирт технічний, етанол. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1654306779-etilovyj-spirt-tehnicheskij.html>
111. Ацетон+ Хімрезерв 1кг (налив). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1600235927-atseton-himrezerv-1kg.html>
112. Патент 32500 UA, МПК C12F 1/06, C08B 37/06. Спосіб регенерації етанолу/ Марценюк О. С., Малежик І. Ф., Мельник Л. М., Сергєєв А. Д., Немирович П. М. Опубл. 15.12.2000, Бюл. №7.
113. PILODIST 107 Регенерація розчинника. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dlu.com.ua/PILODIST-107>

114. Protein Purification Buffer. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sepmag.eu/blog/protein-purification-buffer>
115. Equilibration Buffer for IPG Strips. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.gbiosciences.com/Protein-Research/Equilibration-Buffer-for-IPG-Strips>
116. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Protocols/crna-tracrna-resuspension-buffer-protocol.pdf>
117. Elution Buffer. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sepmag.eu/blog/elution-buffer>
118. Why is NaCl or KCl elution done after elution with phosphate buffer in protein purification? [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.researchgate.net/post/Why_is_NaCl_or_KCl_elution_done_after_elution_with_phosphate_buffer_in_protein_purification
119. Сублімаційна сушка продуктів. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ten24.com.ua/ua/blog/sublimatsionnaya-sushka-produktov/>
120. Soares, G. A., & Sato, H. H. (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. Brazilian Journal of Microbiology, 31, 291-297.
121. Santos A, San Mauro M, Bravo E, Marquina D. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. Microbiology (Reading). 2009 Feb;155(Pt 2):624-634. doi: 10.1099/mic.0.023663-0. PMID: 19202111.
122. Moura VS, Pollettini FL, Ferraz LP, Mazzi MV, Kupper KC. Purification of a killer toxin from *Aureobasidium pullulans* for the biocontrol of phytopathogens. J Basic Microbiol. 2021 Feb;61(2):77-87. doi: 10.1002/jobm.202000164. Epub 2020 Dec 29. PMID: 33373080.
123. Buzzini P, Corazzi L, Turchetti B, Buratta M, Martini A. Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. FEMS Microbiol Lett. 2004 Sep 15;238(2):359-65. doi: 10.1016/j.femsle.2004.07.060. PMID: 15358421.

124. Апарати із змішуючим пристроєм. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://euromash.kiev.ua>
125. Відцентрові насоси промислові. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://ascopumps.com.ua>
126. Ecomass – центрифуги. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.ecomass.com.ua>
127. Система ультрафільтрації Toray UFS 272T-S. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/>
128. Реактор нержавіючий хімічний 32 м³. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://ua.all.biz/uk/reaktor-nerzhaviyuchyj-himichnyj-32m3>
129. Апарати сталі емальовані з механічним перемішуючим пристроєм [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://euromash.kiev.ua/ru>
130. Ємність 100 л з відкритою кришкою кламп. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://smakui.ua/ua/>
131. CoPrime Biochromatography System. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.merckmillipore.com/i>
132. Ємність з нержавіючої сталі 300 л. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p239123380-emkost-pisch-nerzh.html>
133. LyoCompact - GMP production equipment for small scale production. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.coolvacuum.com/>
134. Молотковий млин Trinitі LS-20. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1546360722-molotkovaya-melnitsa-trinit.html>
135. Ємність 40л з купольною кришкою кламп. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://smakui.ua/ua>
136. Estimation of protein concentration by Bradford's method. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.google.com//Experiment-4.pdf>
137. Kruger, N.J. (1994). The Bradford Method for Protein Quantitation. In: Walker, J.M. (eds) Basic Protein and Peptide Protocols. Methods in Molecular Biology™, vol 32. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:9>

138. Quick Start™ Bradford Protein Assay – Bio-Rad. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.google.com/https://www.bio-rad.com>
139. Bradford Assay. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.thermofisher.com/ua/>
140. Nouroozi, R. V., Noroozi, M. V., & Ahmadizadeh, M. (2015). Determination of protein concentration using Bradford microplate protein quantification assay. *Disease and Diagnosis*, 4(1), 11-17.
141. Quick Start™ Bradford Protein Assay Kits From Bio-Rad. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.biocompare.com>
142. Carboni G, Fancello F, Zara G, Zara S, Ruiiu L, Marova I, Pinna G, Budroni M, Mannazzu I. Production of a lyophilized ready-to-use yeast killer toxin with possible applications in the wine and food industries. *Int J Food Microbiol*. 2020 Dec 16;335:108883. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108883. Epub 2020 Sep 9. PMID: 32956955.
143. Boyan Bonev and others. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 61, Issue 6, June 2008, Pages 1295–1301, <https://doi.org/10.1093/jac/dkn090>
144. Попова Е. М., Куйбіда М. А., Приліпко В. О. Оптимізація умов визначення фунгіцидної активності фенольних речовин полину гіркого (*Artemisia absinthium*). // Проблеми екологічної біотехнології. – 2015. - №1. УДК 632.952:616-093.
145. Метод дифузії в агар. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://um.co.ua/3/3-3/3-33188.html>
146. Tay ST, Lim SL, Tan HW. Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Nov 8;14:439. doi: 10.1186/1472-6882-14-439. PMID: 25380692; PMCID: PMC4246603.
147. Giovati L, Santinoli C, Ferrari E, Ciociola T, Martin E, Bandi C, Ricci I, Epis S, Conti S. Candidacidal Activity of a Novel Killer Toxin from *Wickerhamomyces*

anomalus against Fluconazole-Susceptible and -Resistant Strains. *Toxins* (Basel). 2018 Feb 3;10(2):68. doi: 10.3390/toxins10020068. PMID: 29401638; PMCID: PMC5848169.

148. Abu-Mejdad, N.M.J.A., Al-Badran, A.I. & Al-Saadoon, A.H. Purification and characterization of two killer toxins originated from *Torulaspora delbrueckii* (Lindner) and *Wickerhamomyces anomalus* (E.C.Hansen) Kurtzman, Robnett, and Basehoar-Powers. *Bull Natl Res Cent* 44, 48 (2020). <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00308-w>

149. Residual Moisture Determination in Lyophilized Drug Product. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmtech.com>

150. Kalandarov, P. I. (2021). Estimate of precision of thermogravimetric method of measuring moisture content: estimate of precision and effectiveness gained with the use of the method in the agro-industrial complex. *Measurement Techniques*, 64, 522-528.

151. Настанова щодо експлуатування вологоміра ADGS-50. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://chemtest.com.ua/previews/ADGS-50>.

152. Li, E., & Mira de Orduña, R. (2010). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in applied microbiology*, 50(3), 283-288.

153. Roshchina, M.V., Gunar, O.V. & Builova, I.A. On the Possibility of Reducing the Sample Size for Microbiological Examination of Some Pharmaceutical Substances. *Pharm Chem J* 55, 970–973 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11094-021-02524-8>

154. Ratajczak M, Kubicka MM, Kamińska D, Sawicka P, Długaszewska J. Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharm J*. 2015 Jul;23(3):303-7. doi: 10.1016/j.jsps.2014.11.015. Epub 2014 Dec 8. PMID: 26106278; PMCID: PMC4475860.

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

156. КЛАСИФІКАЦІЯ ВИРОБНИЧИХ ПРИМІЩЕНЬ. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/>

157. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій для студентів спеціальності 133 “Галузеве машинобудування» спеціалізація «Обладнання фармацевтичних та біотехнологічних виробництв» / Уклад.: В.М. Поводзинський, В.Ю. Шибєцький – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251с.
158. ДЕЗІНФЕКТАНТИ або ДЕЗІНФЕКЦІЙНІ ЗАСОБИ. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2423>
159. Четвертинні амонієві сполуки. [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://medical-enc.com.ua/ammoni_soedinenia.htm
160. ТОП-5 препаратів для дезінфекції. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://zvuk.org.ua/blog/top-5-preparativ-dlia-dezinfektsii>
161. Септодор Форте, 1000 мл. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/p610886216-septodor-forte-1000.html>
162. Пентасол 331. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/p1097551908-moyuschie-dezinfitsiruyuschie-sredstvo.html>
163. Білизна анти бак дезінфікуючий миючий засіб, 1 л. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://profiplus.in.ua/ua/p776641697-belizna-anti-bak.html>
164. БІО-ДС (БІО-ДС) — УНІВЕРСАЛЬНЕ ДЕЗІНФЕКЦІЯ У ФОРМІ КОНЦЕНТРАТУ (ДЕЗІНФЕКЦІЯ, ДВК, СТЕРИЛІЗАЦІЯ), 1 Л. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://dom-online.com.ua/ua/>
165. Мультисепт плюс. [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://www.kvipst.com.ua/catalog/material_dlia_dezinfekcii/orolin_multicept_plus_2l/
166. Гуанполісепт. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://xn--80aditftnv.xn--j1amh.ua/guanpolisept-kontsentrat-1-l/>
167. Мицук, О. А., Мідяний, С. В., & Мазурак, О. Т. (2008). Сучасні технології підготовки питної води. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Гжицького, 10(2-4 (37)), 130-137.

168. Ністатин таблетки покриті оболонкою 500000 ОД №20, Борщагівський ХФЗ. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://apteka.net.ua/drugs/nistatyn-tabletky-pokryti-obolonkoyu-500000-od-no20#instruction>
169. ЦЕЛЮЛОЗА МІКРОКРИСТАЛІЧНА. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/97>
170. ПОВІДОН. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/860/povidon>
171. Натрію кроскармелоза. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1196/natrij-kroskarmeloza>
172. МАГНІЙ СТЕАРАТ. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1293/magnij-stearat>
173. ГІДРОКСИПРОПІЛМЕТИЛЦЕЛЮЛОЗИ ФТАЛАТ. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3239/>
174. КОПОВІДОН. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3685/kopovidon>
175. ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЬ. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/881/polietilenglikol>
176. ТРИГЛІЦЕРИДИ СЕРЕДНЬОГО ЛАНЦЮГА. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/7612/trigliceridi-serednogo-lancyuga>
177. ПОЛІДЕКСТРОЗА. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/879/polidekstroza>
178. ТИТАН ДІОКСИД. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2205/titan-dioksid>
179. ЗАЛІЗА ОКСИД. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/7121/zaliza-oksid>
180. 100L 200L 300L 500L Vacuum Homogenizer Food Pharmaceutical Chemical 3D Swing Powder Mixer. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://czxggz.en.made-in-china.com/product/>

181. Gzpd-560 Automatic High Speed Tablet Press Machine Quotation. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://pharmach.en.made-in-china.com/productimage/c>
182. Lab 10L 20L 30L 50L реактор из нержавеющей стали с одной рубашкой | ДОВМКСТЕК. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.dovmxtech.com/products/lab-10l-20l-30l-50l-single-jacketed->
183. Tablet Coating Machine. [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://www.yenchen.com.tw/en/product/tablet_coating_machine-171.html
184. Strip Packaging Machine. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <http://hwpackagingmachine.com/shw-160-strip-packaging-machine.html>
185. P 91 series cartoners. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://www.romaco.com/products/product-details/p-91-series>
186. Automatic Case Packer for Large Products – ZENIT. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://auto-pack.co.uk/machinery/automatic-case->
187. Повітрозабірник CZnP ML Ø100-160. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://kaminin.ua/product/vozdunuzabornik-cznp-ml-100160-4294.html>
188. Панельні повітряні фільтри для грубого очищення. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry->
189. Відцентровий вентилятор Турбовент OBR 200M-2K. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://turbovent.com.ua/ua/p1164725796-tsentrobeznyj-ventilyator-turbovent.html>
190. ЭЛЕКТРОКАЛОРИФЕРЫ СФО (ПНЕ). [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://mpptk.com.ua/product/elektrokalorifery-sfo-pne/>
- 191.осушувач повітря DT Group MDC300. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://osushuvachi.com.ua/promyslovi-osushuvachi-povitria/adsorbciynij-rotornij-osushuvach-povitrya-mdc-300>
192. Фильтр тонкой очистки Futura F7. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://dbuy.ua/ru/product/filbtr-tonkoy-ochistki-futura/>

193. НЕРА фільтр 305*610*78 H12 ФяС. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://tehno-parts.com.ua/ua/hepa-filtr-30561078-h12-fias>
194. Дозатор води та рідин. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://agro-teh.com.ua/ua/p370228267-dozator-vody-zhidkosteji>.
195. Фільтр піщаний пластиковий, бокове підключення ECOSTAR. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://ge-ua.net/product/filtr-pishhani-j-plastikovij-bokove-pidklyuchennya-ecostar/>
196. 1000L Reactor Stainless Steel Continuous Stirred Tank Reactor 10000 Litre Reactor. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://wuxizhanghua.en.made-in-china.com/product/XSwmkZMocFYv/>
197. Шлангові насоси МР-11. [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://www.debem.com.ua/ukr/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-11/
198. Система обратного осмоса RO-6000. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://filterpro.com.ua/p>
199. Ваговий дозатор для сипучих 1-50 кг ВД-4н. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://abctech.com.ua/ua/p1435795602-vesovoj-dozator-dlya.html>
200. Ємність 100 л з відкритою кришкою кламп. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://smakui.ua/ua/>
201. Перистальтичний насос ВН3-V. [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://www.etatron.com.ua/pumps/peristaltic_pumps/bh3-v/
202. Автоматическая система AutoTest 4. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dlu.com.ua/>
203. Прилад для визначення розпадання таблеток ED-2L фірми ELECTROLAB. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/tester-tabletok>
204. Tan, C., Wang, L., Xue, Y., Lin, S., Yu, G., & Yang, S. (2018). Purification and molecular characterization of a Metschnikowia saccharicola killer toxin lethal to a crab pathogenic yeast. *FEMS microbiology letters*, 365(10), fny038. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny038>

Дані щодо апробації роботи

Міністерство освіти і науки України

Національний університет харчових технологій

89

**Міжнародна наукова
конференція молодих учених,
аспірантів і студентів**

**"Наукові здобутки молоді –
вирішенню проблем
харчування людства у XXI
столітті"**

3-7 квітня 2023 р.

Частина 1

Київ НУХТ 2023

29. Антикандидозна активність кілер-токсинів *Wickerhamomyces anomalus*

Мар'яна Красько, Вікторія Красінко

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Останніми роками значно зросла кількість опортуністичних грибкових інфекцій, викликаних дріжджами *Candida albicans* та деякими не-*albicans* видами *Candida*: *C. glabrata*, *C. mesorugosa*, особливо у людей з ослабленим імунітетом. Крім того викликає занепокоєння виявлення резистентності деяких видів збудників до протигрибкових засобів, зокрема до азолів [1, 2]. Тому виникла потреба у пошуку альтернативних сполук, ефективних проти дріжджів роду *Candida*.

Матеріали і методи. Використано закордонні наукові праці для пошуку найбільш оптимального продуцента, здатного синтезувати кілер-токсини із найвищою антикандидозною активністю.

Результати.

Кілер-токсини – це білки, здебільшого глікопротеїни, які синтезуються різними видами дріжджів та є летальними для чутливих клітин, зокрема для деяких патогенних для людини мікроорганізмів, наприклад, дріжджів роду *Candida*. [1]. Здатність синтезувати кілер-токсини притаманна багатьом видам дріжджів, у тому числі і представникам роду *Wickerhamomyces*. Так, в якості такої сполуки розглядався кілер-токсин, синтезований штамом *W. anomalus* tp2-15. Проте отриманий токсин демонстрував досить вузький спектр активності, націлений тільки на *C. mesorugosa*, тому пошуки продовжувались далі [3].

Через певний час було досліджено активність токсину *WalF1-KT*, продуцентом якого є штам *W. anomalus* 1F1, як проти чутливих, так і азолостійких клінічних ізолятів, а також лабораторних штамів *C. albicans* та *C. glabrata*. Результати показали, що при 25°C *WalF1-KT* був активний щодо чутливих до флуконазолу та резистентних штамів *C. glabrata*, проте не впливав на більшість штамів *C. albicans*, протестованих у дослідженні [1].

Натомість токсин *W. anomalus* Cf20 характеризувався високою антикандидозною активністю щодо одного колекційного штаму *C. glabrata* та шести клінічних патогенних штамів *Candida* spp., серед яких *C. albicans*, *C. tropicalis* та *C. krusei* [2].

Висновки. Враховуючи антимікробну активність токсинів *W. anomalus* щодо патогенних дріжджів *Candida*, їх можна розглядати як перспективні активні протикандидозні засоби.

Література

1. Giovati L, Santinoli C, Ferrari E, Ciociola T, Martin E, Bandi C, Ricci I, Epis S, Conti S. (2018), Candidacidal Activity of a Novel Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* against Fluconazole-Susceptible and -Resistant Strains. *Toxins (Basel)*. 3;10(2):68. doi: 10.3390/toxins10020068.
2. Fernandez de Ullivarri M, Bulacios GA, Navarro SA, Lanza L, Mendoza LM, Chalon MC. (2020), The killer yeast *Wickerhamomyces anomalus* Cf20 exerts a broad anti-*Candida* activity through the production of killer toxin and volatile compounds. *Med Mycol*. 10;58(8):1102-1113.
3. Tay ST, Lim SL, Tan HW. (2014), Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *BMC Complement Alter Med*. 8;14:439. doi: 10.1186/1472-6882-14-439.

Молоді учні, аспіранти і студенти, представлені до нагородження дипломами другого ступеня за досягнення високих результатів у науковій діяльності та активну участь в роботі 89-ї Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»,

Факультет біотехнології та екологічного контролю

Горбенко Ірина Сергіївна	ЕК-IV-5
Васильченко Яна Анатоліївна	ЕК-I-3
Стеценко Анастасія Вадимівна	ФБ-1-2М
Красько Мар'яна Олегівна	ФБ-1-2М
Тарасенко Ліна Олександрівна	ФБ-1-2М
Іванченко Юлія Миколаївна	ПБ-1-1М
Вербіян Володимир Михайлович	БТ-3-1
Воробей Анна Миколаївна	БТ-4-1
Дзюба Марія Володимирівна	БТ-4-1
Васильєва Олександра Леонідівна	БТ-3-2
Грищенко Марина Іванівна	БТ-4-1
Клименко Максим Андрійович	БТ-1-1
Самойленко Вікторія Вікторівна	БТ-1-1
Савчук Олександра Олександрівна	БТ-2-1
Москаленко Руслана Олександрівна	БТ-2-4
Клименко Максим Андрійович	БТ-1-1



Candidacidal Activity of a Novel Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* against Fluconazole-Susceptible and -Resistant Strains

Laura Giovati ¹ , Claudia Santinoli ¹, Elena Ferrari ¹, Tecla Ciociola ¹ , Elena Martin ², Claudio Bandi ^{2,3}, Irene Ricci ⁴, Sara Epis ^{2,3} and Stefania Conti ^{1,*} 

¹ Department of Medicine and Surgery, University of Parma, 43125 Parma, Italy; laura.giovati@unipr.it (L.G.); claudia.santinoli@libero.it (C.S.); elena.ferrari@unipr.it (E.F.); tecla.ciociola@unipr.it (T.C.)

² Department of Biosciences, University of Milan, 20133 Milan, Italy; elena.martin@unimi.it (E.M.); claudio.bandi@unimi.it (C.B.); sara.epis@unimi.it (S.E.)

³ Pediatric Clinical Research Center Romeo and Enrica Invernizzi, Ospedale “Luigi Sacco”, 20157 Milan, Italy

⁴ School of Biosciences and Veterinary Medicine, University of Camerino, 62032 Camerino, Italy; irene.ricci@unicam.it

* Correspondence: stefania.conti@unipr.it; Tel.: +39-0521-903492

Received: 1 December 2017; Accepted: 1 February 2018; Published: 3 February 2018

Abstract: The isolation and characterization from the sand fly *Phlebotomus perniciosus* of a *Wickerhamomyces anomalus* yeast strain (Wa1F1) displaying the killer phenotype was recently reported. In the present work, the killer toxin (KT) produced by Wa1F1 was purified and characterized, and its antimicrobial activity in vitro was investigated against fluconazole- susceptible and -resistant clinical isolates and laboratory strains of *Candida albicans* and *C. glabrata* displaying known mutations. Wa1F1-KT showed a differential killing ability against different mutant strains of the same species. The results may be useful for the design of therapeutic molecules based on Wa1F1-KT and the study of yeast resistance mechanisms.

4. Materials and Methods

4.1. Yeast Strains

Strains belonging to the species *W. anomalus*, *W. saturnus* var. *mrakii*, *C. lusitaniae*, *C. albicans*, and *C. glabrata* were used in this study. *W. anomalus* 1F1 isolated from *P. perniciosus* [15], *W. anomalus* ATCC 96603 (a KT-producing strain formerly referred to as UP25F) [32], and *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 [34] were used for the production of Wa1F1-KT, Wa96603-KT, and Wm41986-KT, respectively. The KT non-producing, KT-susceptible, *W. anomalus* UM3 strain was also used in this study as a negative control for KT expression [32].

The activity of Wa1F1-KT was tested against the reference *C. albicans* strain SC5314, two wild-type *C. albicans* clinical isolates (DSY544 and DSY347) [27,30], two *C. albicans* mutant strains resistant to fluconazole (DSY775, derived from DSY544, and DSY289, derived from DSY347) [27,29,30], two wild-type *C. glabrata* clinical isolates susceptible (DSY562) and resistant (DSY565) to fluconazole [28], and four *C. glabrata* fluconazole-resistant strains derived from DSY562 by mutations in the gene *CgPDR1* (SFY93, SFY105, SFY115, SFY116) [31]. The reference strain *C. lusitaniae* NEQAS 6208, known to be susceptible to the activity of Wa1F1-KT [15], was also used as a positive control for KT activity.

Yeasts maintained in sterile distilled water were subcultured on Sabouraud Dextrose Agar plates.

4.2. Media

KT-producing strains were grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% dextrose), then subcultured for KT production in YPD medium with 15% glycerol, buffered at pH 4.6 with 0.1 M citric acid and 0.2 M Na₂HPO₄. For the KT activity assay, YPD medium was added with 3% agar, and 0.003% methylene blue, and adjusted to pH 4.6 with 0.1 M citric acid and 0.2 M Na₂HPO₄.

4.3. Production of KTs

For the production of crude extracts, a seed culture of the *W. anomalus* and *W. saturnus* var. *mrakii* strains was incubated at 20 °C for 24 h with shaking at 150 rpm in YPD medium. Flasks (500-mL volume) containing 100 mL of YPD buffered at pH 4.6, with 15% glycerol, were inoculated with 1 mL of the seed culture and incubated at 20 °C for 72 h with shaking (150 rpm). After this period, the cells were removed by centrifugation (5000× g, 10 min, 4 °C); the supernatant was filtered through 0.45 µm pore size membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and concentrated (50-fold) through an Amicon Ultra-15 (10-kDa cutoff) filter unit (Merck Millipore) by centrifugation at 4000× g, 4 °C. Accordingly, a concentrated extract of YPD medium used for KT production was prepared. The concentrated crude extracts were stored at 4 °C until use.