

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 р.

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

« » лютого 2024 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми Фармацевтична біотехнологія

на тему: Використання дріжджових та бактеріальних систем експресії
для одержання антимікробних пептидів

Виконав: здобувач 2 курсу, групи 2

СОБЧЕНКО Софія Андріївна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

_____ (прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент РЕШЕТНЯК Л.Р.
(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) незарядженої 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

СОБЧЕНКО Софії Андріївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біосинтез антимікробного пептиду цекропіну з використанням дріжджових та бактеріальних систем експресії

керівник роботи ВОРОНЦОВ Олександр Олександрович, доц., к.т.н.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

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

2. Строк подання здобувачем роботи 05.02.2024

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Escherichia coli*; цільовий продукт: цекропін

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Розділ 1. Біотехнологічні особливості одержання цекропінів; Розділ 2. Антимікробні властивості цекропінів; Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва цекропіну А для лікарського засобу; Розділ 4. Обґрунтування післяферментаційних процесів; Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях; Розділ 6. Специфікація обладнання для одержання цекропіну А; Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення цекропіну А; Розділ 8. Контроль виробництва цекропіну А; Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу на основі цекропіну; Розділ 10. Матбаланс на серію лікарського засобу на основі цекропіну А; Розділ 11. Специфікація обладнання для виробництва таблеток на основі цекропіну А; Розділ 12. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу на основі цекропіну А; Розділ 13. Опис лікарського засобу на основі цекропіну а згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна та апаратурна схеми виділення та очищення цекропіну А – по 1 аркушу листа формату А1; Технологічна та апаратурна схеми виробництва лікарського засобу на основі цекропіну А – по 1 аркушу листа 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. Біотехнологічні особливості одержання цекропінів;	01.11.2023-20.11.2023	
2	Розділ 2. Антимікробні властивості цекропінів;	21.11.2023-30.11.2023	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва цекропіну А для лікарського засобу;	01.12.2023-05.12.2023	
4	Розділ 4. Обґрунтування післяферментаційних процесів;	06.12.2023-11.12.2023	
5	Розділ 5. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях;	12.12.2023-15.12.2023	
6	Розділ 6. Специфікація обладнання для одержання цекропіну А;	16.12.2023-17.12.2023	
7	Розділ 7. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення цекропіну А;	18.12.2023-20.12.2023	
8	Розділ 8. Контроль виробництва цекропіну А;	21.12.2023-22.12.2023.	
9	Розділ 9. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу на основі цекропіну;	23.12.2023 – 03.01.2024	
10	Розділ 10. Матбаланс на серію лікарського засобу на основі цекропіну А;	04.01.2024-05.01.2024	
11	Розділ 11. Специфікація обладнання для виробництва таблеток на основі цекропіну А;	06.01.2024-08.01.2024	
12	Розділ 12. Опис технологічної схеми отримання лікарського засобу на основі цекропіну А;	09.01.2024-12.01.2024	
13	Розділ 13. Опис лікарського засобу на основі цекропіну а згідно АНД	13.01.2024-14.01.2024	
14	Оформлення пояснювальної записки	15.01.2024-18.01.2024	
15	Оформлення графічної частини роботи	19.01.2024-20.01.2024	

Здобувач

_____ (підпис)

Софія СОБЧЕНКО

_____ (ім'я та прізвище)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Олександр ВОРОНЦОВ

_____ (ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Ця кваліфікаційна робота присвячена розробці лікарського засобу для лікування гострого та хронічного циститу на основі нового мікробного пептиду – цекропіну А. За наявними даними – цистит в 95% випадків викликається уропатогенними бактеріями *Escherichia coli*. Дане захворювання лікують за допомогою антибіотикотерапії, але більшість препаратів цього ряду вже не ефективні, через набуту стійкості штамів кишкової палички. Цекропін А має високу антагоністичну активність проти штамів *E. coli*, через що, може бути гарною альтернативою наявним антибіотикам.

Спираючись на те, що цекропіни – це білки, що виділено з комах, їх промислове одержання досягається за допомогою біотехнології і методам генної інженерії. Виробництво препарату для лікування циститу було розроблено на основі штаму *E. coli* BL21 (DE3), трансформованого плазмідом *pSUMO-nABP-dHC-cecropin A*. Після очистки, концентрація пептиду становить 287,9 мг/л.

Враховуючи те, що рекомбінантні білки зазвичай виділяють високо-ефективною рідинною хроматографією, який є дуже дорогим варіантом очистки, було запропоновано альтернативний шлях, який є більш економічним, оскільки заключається в постійній руйнації клітини та промивки наявного білку. Це дозволяє заощадити гроші на промислове виробництво та здешевити кінцевий продукт, який наразі як субстанція продається закордоном за 150 \$ і вище за 1 мг готового пептиду.

Готовий препарат контролюють за описом, однорідністю маси, висотою та діаметром, стійкості до роздавлювання, розпадання, кількісним визначенням, однорідністю дозованих одиниць, розчиненням та мікробіологічною чистотою.

Робота складається з вступу, 13 розділів та списку літератури, що містить 188 джерел. В роботі наведено 16 таблиць та 21 рисуноків. Графічна частина містить технологічну та апаратурну схему, накреслені на аркушах формату А1.

Ключові слова: антимікробні пептиди, стійкість до антибіотиків, уропатогенні штами *E. coli*, цекропін А, цистит, рекомбінантні штами.

ABSTRACT

This qualifying work is devoted to the development of a drug for the treatment of acute and chronic cystitis based on a new microbial peptide - cecropin A. According to the available data, cystitis in 95% of cases is caused by uropathogenic bacteria *Escherichia coli*. This disease is treated with antibiotic therapy, but most drugs of this series are no longer effective, due to the acquired resistance of *Escherichia coli* strains. Cecropin A has a high antagonistic activity against *E. coli* strains, which is why it can be a good alternative to existing antibiotics.

Based on the fact that cecropins are proteins isolated from insects, their industrial production is achieved with the help of biotechnology and genetic engineering methods. The production of the drug for the treatment of cystitis was developed on the basis of the strain *E. coli* BL21 (DE3), transformed with the plasmid *pSUMO-nABP-dHC-cecropin A*. After purification, the concentration of the peptide is 287.9 mg/l.

Considering that recombinant proteins are usually isolated by high-performance liquid chromatography, which is a very expensive purification option, an alternative route has been proposed that is more economical, as it consists in constantly destroying the cell and washing away the protein present. This allows you to save money on industrial production and make the final product cheaper, which is currently sold abroad as a substance for \$150 and above for 1 mg of the finished peptide.

The finished drug is controlled by description, uniformity of mass, height and diameter, resistance to crushing, disintegration, quantitative determination, uniformity of dosage units, dissolution and microbiological purity.

The work consists of an introduction, 13 chapters and a bibliography containing 188 sources. The work contains 16 tables and 21 figures. The graphic part contains a technological and hardware diagram, drawn on sheets of A1 format.

Key words: antimicrobial peptides, resistance to antibiotics, uropathogenic strains of *E. coli*, cecropin A, cystitis, recombinant strains.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ ЦЕКРОПІНІВ.....	9
1.1. Шляхи одержання синтезуючих генів цекропінів.....	9
1.2. Бактеріальні штами, які використовуються для експресії генів цекропінів.....	17
1.3. Дріжджові експресійні системи для одержання цекропінів.....	23
РОЗДІЛ 2. АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦЕКРОПІНІВ.....	29
2.1. Антимікробна активність цекропінів.....	29
2.2. Порівняння ефективності використання цекропінів та антибіотиків.....	34
ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ.....	39
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЦЕКРОПІНУ А ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....	40
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі цекропіну А, галузей використання, потреби у лікарському засобі.....	40
3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу.....	47
3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі цекропіну А.....	47
3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки лікарського засобу на основі цекропіну А.....	48
3.3. Вибір біологічного агенту для синтезу цекропіну.....	51
3.4. Розрахунок потреби у цекропіні А для випуску лікарського засобу та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості цекропіну А.....	55
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ.....	61
4.1. Обґрунтування методу відокремлення біомаси від супернатанту.....	62
4.2. Обґрунтування методів руйнування клітини.....	65
4.3. Обґрунтування додаткових розчинів для очистки та стабілізації білку.....	70

4.4. Обґрунтування відокремлення баластного білку від розчину цекропіну А.....	71
4.5. Обґрунтування методу сушіння цекропіну А.....	71
РОЗДІЛ 5. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....	73
РОЗДІЛ 6. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЦЕКРОПІНУ А.....	76
РОЗДІЛ 7. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦЕКРОПІНУ А.....	79
РОЗДІЛ 8. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЦЕКРОПІНУ А.....	83
8.1. Контроль об'єму натрій-фосфатного буфера.....	83
8.2. Контроль концентрації 4М розчину хлориду натрію.....	84
8.3. Контроль ваги цекропіну А	85
8.4. Контроль вологості цекропіну А.....	85
8.5. Контроль антимікробної активності цекропіну А.....	86
8.6. Ідентифікація цекропіну А.....	87
РОЗДІЛ 9. ОБґРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ	92
9.1. Розрахунок річної потужності виробництва таблеток з цекропіном А та кількості серій на рік.....	92
9.2. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень, підготовки персоналу, дезінфікуючих засобів, вентиляційного повітря.....	93
9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря.....	93
9.2.2. Підготовка персоналу.....	94
9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів.....	96
9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	99
9.4. Обґрунтування вибору підготовки води.....	100
9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	100
РОЗДІЛ 10. МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А.....	103

РОЗДІЛ 11. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ТАБЛЕТОК НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А.....	105
РОЗДІЛ 12. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А.....	107
РОЗДІЛ 13. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А ЗГІДНО АНД.....	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	115

ВСТУП

Кишкова паличка (*Escherichia coli*) — це бактерія, яка зазвичай зустрічається в кишечнику людини та теплокровних тварин. Більшість штамів кишкової палички нешкідливі. Однак деякі штами, такі як кишкова паличка, що продукує токсин Шига (STEC), можуть спричинити важкі харчові захворювання. Він передається людям переважно через споживання заражених харчових продуктів, таких як сирі або недостатньо термічно оброблені м'ясні продукти, сире молоко та заражені сирі овочі та паростки [1,2]. Більшість штамів кишкової палички негативно впливають на шлунково-кишковий тракт [3]. Позалікарняна пневмонія, викликана *E. coli*, у пацієнтів без з кістозного фіброзу має високий рівень смертності — 11–21 %, з непропорційно високим рівнем бактеріємії [4].

Особливий тип *E. coli*, який називається адгезивною та інвазивною *E. coli* (AIEC), який прилипає до культивованих епітеліальних клітин кишечника (слизової оболонки кишечника) та проникає в нього та реплікується в захисних білих кров'яних клітинах (макрофагах), був виділений від 21 до 63% пацієнтів із хворобою Крона в клубовій кишці, що дає підстави думати про те, що AIEC відіграє ключову роль у процесі захворювання [5].

Інфекції сечовивідних шляхів (ІСШ) є одними з найпоширеніших патологічних станів як у громадських, так і в лікарняних умовах. За оцінками, близько 150 мільйонів людей у всьому світі щороку розвивають ІСШ, що супроводжується високими соціальними витратами у вигляді госпіталізації та медичних витрат. Серед поширених уропатогенів, пов'язаних із розвитком ІСШ, уропатогенна *E. coli* (UPEC) є основною причиною. Штами UPEC володіють великою кількістю як структурних, так і секретованих (токсини, системи отримання заліза) факторів вірулентності, які сприяють їх здатності викликати захворювання, хоча здатність прилипати до епітеліальних клітин господаря в сечовивідних шляхах є найважливішим фактором, що визначає патогенність [6].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	<i>ВСТУП</i>	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Собченко С.А.						
Перевір.		Воронцов О.О.					7	115
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

Однією з найпоширеніших проблем ІСШ є цистит. Поширеність Україною на 100 тис. населення: гострий – 314 хворих; хронічний – 135 хворих. Цистит діагностують у жінок репродуктивного віку. У 95% випадків дане захворювання викликано *E. coli*. Можна сказати, що цистит за статистикою займає друге місце за поширеністю захворювання після ОРВІ. По задокументованим випадкам, цистит – це одна з найбільш обширних урологічних патологій [7]. При лікуванні даного захворювання зазвичай використовуються наступні препарати: ципрофлоксацин, фурадонін, нітроксолін, левофлоксацин, норфлоксацин, фосфоміцин, монурал, тайгерон та інші [8].

Із 40-х років ХХ сторіччя антибіотики значно знизили захворюваність і смертність від інфекційних хвороб. Водночас вони змусили мікроорганізми мутувати для захисту від них, тож антимікробні препарати стають менш ефективними. Тому, питання заміни таких препаратів на аналоги стає дедалі гострішим щороку [9].

Цекропін А є одним із найбільш вивчених антимікробних поліпептидів. Ранні дослідження їхнього бактерицидного механізму показали, що цекропіни зв'язуються з негативно зарядженими ліпідами мембран і утворюють щільно упакований шар або «килим» пептиду, який робить мембрани проникними. Показано, що цекропіни мають сильну антимікробну дію проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, а тому можуть бути потенційними заміниками існуючих антибіотиків [10,11].

Актуальність. Новітнє покоління антимікробних сполук, які є діючими проти уропатогенної кишкової палички, яка викликає цистит, в Україні сьогодні на ринку не представлені, тому їх виробництво є актуальним.

Новизною є синтез цекропіну А шляхом культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21 (DE3), трансформованого плазмідом *pSUMO-nABP-dHC-sescropin A*, який синтезує білок з концентрацією після очистки 338,7,7 мг/л (після очистки концентрація білку в перерахунку становить 287,9 мг/л) для подальшого використання у лікарському засобі для лікування циститу [12].

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ ЦЕКРОПІНІВ

1.1. Шляхи одержання синтезуючих генів цекропінів

Нерідко гени цекропінів отримують за допомогою рослин. Наприклад, *Kalanchoe pinnata* L. містить в собі синтезувальний ген цекропіну P. Для підтвердження його основних властивостей з даної рослини робили екстракт. Після шести місяців зберігання при 40 °С клітинний екстракт з цекропіном P1 мав зону інгібування росту *Erwinia carotovora* на $2,2 \pm 0,2$ см [13]. З екстрактом *K. pinnata* L., який містить цекропін P1 було виконано дослідження стосовно заживлення рак у щурів. Результат такого лікування був максимально позитивним (навіть краще за перекис водню), що дозволяє зробити висновок про можливість використання цекропіну P1 для лікування трофічних виразок [14].

Також, генисинтезу цекроіну P1 можна одержати з екстракту *Brassica napus* L. Даний штам має високу антагоністичну активність проти *E. carotovora* B15, *Pseudomonas syringae*, *Methylobacterium mesophilicum* Psm 140 та *P. aureofaciens* BS1393. Визначення протимікробної активності відбувалось шляхом визначення зони інгібування росту, який становив $2,3 \pm 0,12$, $1,9 \pm 0,20$, $2,2 \pm 0,18$ та $1,7 \pm 0,15$ відповідно [15].

Відомі варіанти виділення Цекропіну A за допомогою *Nicotiana tabacum*. Відзначається, що одержаний білок має антагоністичні властивості проти *Aspergillus niger*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, та *Candida albicans*, які тримаються протягом 7 діб. Концентрація білку, яку можна отримати з екстракту зазначеної рослини становить 63,81 мкг/г свіжої маси [16].

Безсумнівно, основним джерелом цекропінів є різні жуки. *Calomera littoralis* — вид жосткокрилих сімейства курчатових (*Cecindelidae*). Було визначено, що даний агент може продукувати цекропін A та B2. Щодо антагоністичних властивостей – перевіряли лише Цекропін B2. За одержаними результатами, було визначено, що дана речовина має високу антимікробну

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Собченко С.А.			РОЗДІЛ 1 БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОДЕРЖАННЯ ЦЕКРОПІНІВ	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Воронцов О.О.					9	115
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

активність щодо *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* та *Staphylococcus aureus* [17].

Musca domestica є найпоширенішою комахою, що належить до загону двокрилих, і її можна знайти в більшості частин світу. Відзначається, що ці комахи є джерелом великої кількості нових речовин. За останні роки з цих агентів було виділено протигрибкові білки, такі як пептид-1 (MAF-1), MDAP-2 і AMP17. Родина генів цекропіну була ідентифікована в геномі *M. domestica* згідно з їх відкритою рамкою читання. З даної комахи було виділено 10 нових цекропінів. Ці речовини мали різну антагоністичну дію, але було виділено один пептид, який володів широким спектром дії, а саме Цекропін 4 (мав дію проти *S. saprophyticus*, *E. faecalis*, *Vibrio anguillarum*, *B. subtilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *S. epidermidis*, *A. baumannii* та *Klebsiella pneumoniae* [11].

Також, *M. domestica* виділяє гени синтезу цекропіну А. В роботі зазначають велику роль куркуміну, який є індуктором протипухлинної дії цекропіну А. Було оцінено, що цитотоксичність клітинних ліній раку молочної залози (MCF-7) і нормальних клітин Vero порівнянна з контрольною гемолімфою личинок. Личинкові гемолімфи, яким вводили куркумін, виявляли значну цитотоксичність по відношенню до неін'єкційних проти MCF-7, однак клітини Vero не показали цитотоксичності. Результати можуть свідчити про можливість застосування цекропіну з цієї комахи щодо лікування ракових клітин [18]. Зазначається, що цекропіни можна використовувати для терапії виразкового коліту [19].

Mythimna separata - це совка, яка може виділяти цекропін АС-1. Відзначається, що даний білок, окрім антимікробної властивості, володіє хемолітичною (проти курячих червоних кров'яних клітин) та цитотоксичною дією (щодо клітини яєчок свиней). Варто також зазначити, що цекропін АС-1 характеризується високою термостабільністю (стабільний від 4 до 60 °С) та толерантністю до високих концентрацій солей (від 0 мМ до 250 мМ) [20].

Також, *M. separata* може синтезувати цекропін С. Для експресії даного білку застосовують *B. thuringiensis*. Даний патоген змушує личинки комах збільшувати

свою кількість у боротьбі із зазначеним патогеном. При чому, найвищий рівень експресії спостерігається на 24 годині після ін'єкції цими бактеріями [21].

Відомо, що комахи *Aedes aegypti* можуть синтезувати цекропін А. Проте, нещодавно було виділено новий тип цього білку, а саме Цекропін N. Даний білок характеризується тим, що він є ефективним засобом проти мульти-резистентного штаму *A. baumannii*. Мультирезистентний *A. baumannii* (MRAB) часто асоціюється з коінфекцією іншими вірулентними патогенами. Тому важко визначити смертність, яку він може віднести. Хоча MRAB вважається внутрішньолікарняною інфекцією, у пацієнтів іноді спостерігається позалікарняна колонізація хронічних ран [22,23].

Також, щодо синтезу Цекропіну А відомі комахи *Galleria mellonella*. Особливістю цього білку є те, що він руйнує біоплівки уропатогенних кишкових паличок (UPEC), що можна використати у медицині. Також, відмічається, що даний білок гемолізує свинні еритроцити та впливають на життєздатність фібропластів ВНК-21 [24].

Також, *G. mellonella* має здатність до синтезу нейтрального цекропіну D. Цекропін D, очищений з імунної гемолімфи *G. mellonella*, був активним проти грамнегативних і грампозитивних бактерій, а також нитчастого гриба *A. niger*. Нещодавно була продемонстрована активність синтетичного *G. mellonella* цекропіну D, названого Gm1, проти *Salmonella enterica* та *P. mirabilis* [25].

Xenopsylla cheopis – це вид бліх, які синтезують цекропінА, або ж який для даного агенту має іншу назву – шеопін. Даний білок володіє високою антимікробною дією. При порівнянні з поліміксином він має дію проти тих бактерій, які резистентні до зазначеного антибіотику (*S. aureus* 29213 та *E. faecalis* 29212) [26].

Нещодавно було ідентифіковано гомологи цекропіну в геномі та транскриптомі ялинового червця *Choristoneura fumiferana*. Таким чином, було виділено 2 нових антимікробних білка - Cfсес-2 та ΔCfсе-2. Дані білки проявляли антибактеріальну активність проти *E. coli* HB101. Дані бактерії відносяться до

групи ESKAPE, які представляють собою мікроорганізми, стійкі до антибіотиків [27].

Ceratitits capitata є одним із найстрашніших шкідників сільськогосподарських культур у всьому світі. Але дана комаха також здатна зодод виділення цекропінів. Відмічається, що навіть використовуючи цих комах, можна без виділення генів підвищити рівень експресії, шляхом опромінення. Для підвищення кількості Цекропіну 1 використовували опромінювач Кобальт-60. Комах обробляли протягом тижня при 90 Гр з потужністю дози 0,1 кГр/год. При цьому, на 7 день, рівень Цекропіну виріс в 1,43 рази, порівняно з необробленими комахами [28].

Одомашнений шовкопряд *Bombyx mori* є основним джерелом шовку. Але також, він є одним з джерел генів щодо отриманні цекропіну В. Ці гени отримують, виділяючи геномну ДНК з тіл личинок. Після чого використовується готовий ген цекропіну відповідно, з використанням специфічних прямих і зворотних праймерів, для наступних етапів субклонування. З цього й починається реакція ампліфікації за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Таким чином відділяються необхідні гени, з яких в подальшому виконують векторні конструкції [29].

Цекропін А та ХJ з *B. mori* є одним із небагатьох антимікробних пептидів, які показали активність проти ракових клітин стравоходу. Рак стравоходу (РЕС) — це агресивне злоякісне захворювання зі смертельним наслідком, яке представляє важливе значення для охорони здоров'я занепокоєння в усьому світі. Його швидке прогресування і пізня діагностика призводять до поганого прогнозу і високої смертності, що робить його шостою за поширеністю причиною смерті від раку у світі [30].

Tenebrio molitor – це великий мучний хрущ, який є небажаним гостем борошна. Проте, дана комаха має гени синтезу Цекропіну-2. Індукцію гену-синтезу даного білка проводили наступним методом. Для аналізу індукції *TmSpz5* суспензії, що містять 1×10^6 клітин/мкл *E. coli* та *S. aureus* і 5×10^4 клітин/мкл *C. albicans*, вводили в личинки *T. molitor*. Експресія *TmSpz5* змінювалася залежно від тканин і

часу. Найвищі рівні експресії спостерігалися в кишечнику через 12 і 24 години і в жирових тілах через 9 і 24 години після зараження, у відповідь на всі три патогени. Відмічається підвищений синтез цекропіну з ін'єкцією *E. coli* [31].

Bactrocera dorsalis є основним шкідником плодової мушки тропічних і субтропічних країн. Незодавні дослідження показали, що даний агент містить 14 генів синтезу цекропінів. Відмічається, що саме цей білок допомагає в боротьбі з паразитом *Serratia marcescens* PS-1, оскільки після його лікування концентрація цих мікробних пептидів – знижується [32].

Culex quinquefasciatus – це москітні організми, які володіють двома генами (CPIJ005108, CPIJ010699). Дані мікробні пептиди відповідають за імунну відповідь комах та їх стійкість до інсектицидів. Тому, теоретичну, при вилученні цих генів можна отримати гарну рекомбінанту [33].

Antheraea pernyi – це комахи, які в своєму геномі мають гени синтезу цекропіну ДН. Даний білок характеризується високою протизапальною та нтимікробною дією. Також, відзначається гемолітична та цитотоксична дія [34].

Гусениця рицинова напівпетля, або гусениця кротона *Achaea janata* — це моль-черебіда, гусениці якої називаються «напівпетлею» через їх спосіб пересування. Дані комахи синтезують 2 види цекропінів – цекропін FP та RP. Візначається, що стійкість *A. janata* щодо *B. thuringiensis* обумовлена синтезом цих антимікробних пептидів [35].

Гетероскорпін-1 — антимікробний пептид, який відноситься до цекропінів, очищений з отрути скорпіона *Heterometrus laoticus*. Антимікробна активність цього пептид пов'язана з N-кінцевою послідовністю, подібною до антимікробного пептиду цекропіну, і C-кінцевою послідовністю, подібною до дефензину або пептидів, що блокують K⁺ канал. Попереднє дослідження показало, що гетероскорпін-1 має сильну антимікробну дію проти *B. subtilis*, *K. pneumoniae* та *P. aeruginosa* [36].

Lutzomyia longipalpis є основним переносником вісцерального лейшманіозу в Латинській Америці. Незодавні дослідження показали, що ці комахи-переносники реагують на бактеріальні інфекції, модулюючи експресію гена

дефензину та активуючи шлях Imd у відповідь на інфекцію *Leishmania*. Шляхи Imd і Toll є ключовими модуляторами вродженого імунітету комах. Після розпізнавання асоційованих з патогеном молекулярних структур активується сигнальний каскад, що призводить до ядерної транслокації транскрипційного фактора NF-κB, ініціюючи імунну відповідь. Тому ці шляхи є важливими для синтезу антимікробних пептидів в комах. Відзначається, що при глушінні репресора, який має назву кактус відмічається підвищена експресія генів синтезу цекропіну [37].

Діамантова моль, *Plutella xylostella* є всесвітнім шкідником, що завдає серйозної шкоди близько 4–5 мільярдів доларів США щорічно хрестоцвітним, таким як капуста, брокколи та цвітна капуста. Завдяки високій плодючості, перекирванню поколінь, генетичній пластичності та тиску селекції на різні інсектициди ентомопатогенні гриби, такі як *Metarhizium anisopliae*, протягом тривалого часу використовувалися як агент біологічного контролю для зменшення залишків пестицидів та забезпечення безпеки харчових продуктів. Цекропіни є кінцевими ефекторами, які можуть бути активовані цими грибами. Дві повнорозмірні ДНК, що кодують цекропін-2 і цекропін-3, були отримані з зазначеної комахи. Антимікробні аналізи показали, що очищені рекомбінантні цекропіни виявляють широкий спектр антимікробної активності проти грибів, а також грампозитивних і грамнегативних бактерій [38].

Саркотоксин IA є пептидом цекропінового типу з м'яса личинки *Sarcophaga peregrina*. Цей пептид проявляє антибактеріальну активність проти грамнегативних бактерій завдяки взаємодії з ліпідом A, основним компонентом ліпополісахаридів. Ліпід A є ліпофільною частиною сахариду і є основним компонентом зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій. Ліпід A може бути мішенню розпізнавання комплексу Toll-подібного рецептора 4, MD-2 і CD14 у вродженій імунній системі. Він також може служити мішенню для антибактеріальних пептидів [39].

Ostrinia furnacalis -це азіатський кукурудзяний метелик, який здатний до продукції антимікробних пептидів. В це коло входить й цекропін-4. Відзначається, що ця комаха синтезує білки розпізнавання пептидогліканів, який є

одним з факторів підвищеного синтезу цекропіну. Ін'єкція цього білка в личинки метелика призводить до значного підвищення експресії кількох антимікробних пептидних генів. Даний білок працює за принципом зв'язування з патогенним мікроорганізмом, який також може бути фактором індукції [40].

Подібним чином було зроблено по відношенню до *A. pernyi*. Як було зазначено вище, ці комахи є джерелом синтезувальних генів цекропіну ДН [34]. Також, після ін'єкції до личинок цих комах білків розпізнаванн пептидогліканів відзначався надсинтез антимікробних пептидів, в тому числі й цекропіну В [41].

Таблиця 1.1

Джерела генів синтезу цекропінів, та антибактеріальна активність цих пептидів

Вид цекропіну	Джерело генів	Антагоністичні властивості проти	Джерело
Цекропін Р1	<i>K. pinnata</i> L.	<i>E. carotovora</i>	[13]
	<i>B. napus</i> L.	<i>E. carotovora</i> B15	[15]
		<i>P. syringae</i>	
		<i>M. mesophilicum</i> Psm 140	
		<i>P. aureofaciens</i> BS1393	
Цекропін В2	<i>C. littoralis</i>	<i>E. coli</i>	[17]
		<i>E. aerogenes</i>	
		<i>B. subtilis</i>	
		<i>P. vulgaris</i>	
Цекропін 4	<i>M. domestica</i>	<i>S. saprophyticus</i>	[11]
		<i>E. faecalis</i> ,	
		<i>V. anguillarum</i> ,	
		<i>B. subtilis</i> ,	
		<i>A. calcoaceticus</i> ,	
		<i>E. coli</i>	
Цекропін 4	<i>M. domestica</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	[11]
		<i>S. epidermidis</i>	
		<i>A. baumannii</i>	
		<i>K. pneumoniae</i>	
	<i>O. furnacalis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	[40]
		<i>Beauveria bassiana</i>	
		<i>E. coli</i>	
		<i>Pichia pastoris</i>	

Цекропін АС-1	<i>M. separata</i>	<i>E. coli</i>	[20]
Цекропін С		<i>B. thuringiensis</i>	[21]
Цекропін N	<i>A. aegypti</i>	MRAB	[22]
Нейтральний цекропін D	<i>G. mellonella</i>	<i>A. niger</i>	[25]
Цекропін Gm1		<i>S. enterica</i>	
		<i>P. mirabilis</i>	
Цекропін А	<i>N. tabacum</i>	UPEC	[24]
		<i>A. niger</i>	[16]
		<i>E. coli</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	
		<i>S. aureus</i>	
	<i>C. albicans</i>		
Cfcec-2	<i>C. fumiferana</i>	<i>E. coli</i> HB101	[27]
ΔCfce-2			
Цекропін-2	<i>T. molitor</i>	<i>E. coli</i>	[32]
	<i>P. xylostella</i>	<i>E. coli</i>	[38]
		<i>S. aureus</i>	
<i>P. fluorescent</i>			
<i>B. cereus</i>			
Цекропін-3		<i>S. choleraesuis</i>	
		<i>M. anisopliae</i>	
Цекропін DH	<i>A. pernyi</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	[34]
		<i>E. coli</i> DH5α	
		<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
		<i>S. aureus</i> ATCC25923	
		<i>M. luteus</i> NCIMB 8166	
Цекропін В		<i>M. luteus</i>	[41]
		<i>S. aureus</i>	
		<i>E. coli</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	
		<i>C. albicans</i>	
	<i>B. mori</i>	<i>E. coli</i> ATCC 25922	[29]
Цекропін FP	<i>A. janata</i>	<i>B. thuringiensis</i>	[35]
Цекропін RP			
Цекропін	<i>L. longipalpis</i>	<i>S. aureus</i>	[37]
		<i>S. marcescens</i>	
		<i>S. cerevisiae</i>	
Гетероскорпін-1	<i>H. laoticus</i>	<i>B. subtilis</i>	[36]
		<i>K. pneumoniae</i>	
		<i>P. aeruginosa</i>	

Саркотоксин ІА	<i>S. peregrina</i>	<i>E. coli</i>	[39]
----------------	---------------------	----------------	------

Цікавими дослідженнями є створення детекторів до різних видів цекропінів. Наприклад, для визначення цекропіну В можна використовувати рідкокристалічний біосенсор без міток, заснованого на змінах орієнтації молекул біосенсора. Було визначено специфічне зв'язування між цекропіном В та анти-цекропін В антитіла, іммобілізованого за допомогою глутарового альдегіду. Це призводило до очевидної зміни оптичного вигляду від темного до яскравого, і, як наслідок, межа виявлення цекропіну В була до 50 нг/мл. Даний метод полегшує визначення невеликих концентрацій, оскільки не потребує використання специфічних міток [42].

Відзначається й модернізація минулого методу, а саме підвищення сигналу за допомогою наночастинок золота. У порівнянні з експериментами без ампліфікації нанозолота, цей метод має нижчу межу виявлення. Вона становить $1,49 \times 10^{-2}$ нг/мл. Цей метод має такі переваги, як хороша специфічність, висока чутливість, низька межа виявлення та проста операція [43].

1.2. Бактеріальні штами, які використовуються для експресії генів цекропінів

Антимікробні пептиди, перспективні кандидати на антибіотики, привертають все більшу увагу дослідників. Сучасні методи виробництва антимікробних пептидів включають хімічний синтез, експресію внутрішньоклітинного злиття або пряме відділення та очищення з природних джерел. Проте всі ці методи є дорогими, складними в експлуатації та малоефективними. Тому, все більшу увагу приділяють генно-інженерним штамам, які можуть використовувати вектори перенесення генетичного матеріалу щодо синтезу цекропінів, оскільки вони є токсичними білками, з високим виходом чистого продукту [44].

Agrobacterium tumefaciens LBA 4404 – це штам, Який містить вектор синтетичного цекропіну P1. Даний штам використовується для експресії генів

цекропіну P1 для одержання генно-можіфікованих рослин, які зможуть синтезувати цей пептид. Цекропін P1 одержаний таким методом мав антагоністичну активність проти *E. carotovora ssp. carotovora* B15, створюючи зону інгібування в 2-10 мм [45].

Для одержання різних речовин часто використовують генно-інженерні штами кишкової палички. Наприклад, для одержання цекропіну B часто використовують *E. coli* BL21. Вектором для одержання цього білку може виступати *pKSECI*. Було перевірено антагоністичні властивості щодо *B. subtilis*, які показали, що в концентрації 0,125 мкг/мкл цекропіну B зона затримки росту становить 1,39 см. Для очистки такого білку часто використовують методи афінної хроматографії [46].

E. coli ER2566 використовують для одержання цекропіну B2. Для трансформації, використовується вектор *pTWIN1-CBD-INT-OCV-cecB2*. Дану процедуру виконують за допомогою теплового шоку. Після культивування даної бактерії вдається одержати близько 58,7 мг/л білкового продукту (мається на увазі очищеного). Даний білок також очищають методом афінної хроматографії [47].

Для одержання цекропіну A за допомогою *E. coli* BL21(DE3) використовують плазмиду *pET21a-AM-His*. Даний білок характеризується високою антагоністичною активністю проти *E. coli* ATCC 25922. Як індуктор системи використовували IPTG. Відзначається, що катіони Mg^{2+} в концентрації 12-22 мМ відіграють важливу роль в збільшенні експресії генів синтезу цекропіну A. Також, важливою є температура процесу, найвищий рівень експресії відмічається при культивуванні продуцент при 16 °C. Після очистки на хроматографі концентрація білку становил 0,41 мкг/мг вологої біомаси [48].

Також, відомі випадки одержання цекропін-A-похідних за допомогою генно-інженерних штамів кишкової палички. *E. coli* BL21 (DE3) використовували як експресійну систему для одержання такого білку, який має назву PEW300. Для експресії використовували вектор *pET30-PEW300-ME*. PEW300 показав хорошу стабільність у нейтральних і лужних розчинах. PEW300 був термостабільним навіть при температурі до 100 °C і стійким до протеїнази K, пепсину, снаїлази та

трипсину. Білок не мав хемолітичних властивостей, але проявляв антимікробну дію [49].

Крім кишкової палички є повідомлення стосовно використання бацил – як експресійних систем. *B. subtilis* WB800N використовує плазмиду pGJ148 для одержання цекропіну AD. Для ампліфікації генів використовується штам *E. coli* DH5 α . Одержаний кінці культивування білок очищають на афінному хроматографі. При цьому, варто розуміти, що цекропіни – не виділяють в культуральне середовище, а містяться в біомасі, тому перед процесом очищення її руйнують різними способами. Біомасу *B. subtilis* WB800N руйнували в загальному хімічними методами (використовуючи трихлороцтову кислоту, лізоцим та натрій-фосфатний буфер). За допомогою даної експресійної системи можна одержати 26,4 мг/л очищеного білку [50].

Одержаний ген синтезу цекропіну з *M. domestica* володіє високими антагоністичними властивостями. На основі цього було створено вектор *pET-32a-MLH*. Як експресійну систему використовували *E. coli* BL21 (DE3). Як індуктор виступав IPTG. Очистка білку виконувалась за допомогою афінної хроматографії. При оптимізації експресії, біло визначено параметри оптимуму: IPTG в концентрації 1,0 мМ, 4 години процесу при 37 °С. При виконанні таких умов культивування з 1 л поживного середовища можна одержати 60,1 мг чистого білку [51].

Відомі випадки синтезу комбінованих препаратів. Для одержання злитого білка серицин-цекропін В було розроблено плазмиду на основі вектору *pET-47b(+)*. Одержана плазмідна мала назву *pSC25A*. Для порівняння брали 2 генно-інженерних штами *E. coli* BL21 (DE3) та Rosetta (DE3). За результатами електрофорезу кращим продуцентом виявився штам BL21 (DE3). Одержану біомасу лізували, а одержаний супернатант очищали методом афінної хроматографії. Варто зауважити, що одержаний композит порівнювали з чистим серицином. Гібридний препарат мав вищу антимікробну активність. Кількість очищеного серицин-цекропін В щодо середовища становила 1,25 мг/л [52].

E. coli ER2566 (DE3) визнано гарним рекомбінантним штамом для одержання цекропіну B2. Дослідники відзначають, що на кінцевий вихід білку впливає токсичність самого гену. Для пом'якшення токсичного інгібування *secB2* клітин господаря були створені різні конструкції *secB2*. Результати показали, що комбінація домену, що зв'язує хітин і мотиву саморозщеплення інтеїну перед цекропіном B2, без His-мітки, була найкращою для експресії *secB2*. Використовуючи оптимізовані параметри вдається одержати 3,6 г/л неочищеного білку, або ж 98,2 мг/л чистого цекропіну [53].

KR12AGPWR6 було розроблено на основі структурної особливості, подібної до цекропіну. Окрім антимікробної активності, KR12AGPWR6 також має підвищену стійкість до солей, має антиендотоксинів та протипухлинні властивості. Тобто, це цекропін-подібний білок, який можна синтезувати за допомогою *E. coli* BL21 (DE3). Важливо розуміти, що KR12AGPWR6 – це хімічно-синтезований білок, який наразі пропонується виробляти біотехнологічним шляхом, для більшого виходу та здешевлення самої технології. Для цього було сконструйовано плазмиду *pET11b-His6-intein-KR12AGPWR6*. Рекомбінантний KR12AGPWR6 продемонстрував подібну антимікробну активність порівняно з хімічно синтезованим KR12AGPWR6. Концентрація очищеного рекомбінантного білку становила $2,41 \pm 0,33$ мг/л [54].

Існує й інша стратегія одержання цекропінів за допомогою кишкової палички. Вона передбачає позаклітинну секрецію та розщеплення антимікробних пептидів на поверхні *E. coli*, яка є економічно ефективною, простою та не вимагає складних процедур, таких як руйнування клітин і очищення білка. Аналіз показав, що злиті білки, які містять пептиди цекропіну A, можуть успішно секретуватися та утворювати позаклітинні амілоїдні агрегати на поверхні *E. coli* на основі системи секреції *E. coli* curli та характеристик амілоїду sup35NM. Ці амілоїдні агрегати можна легко зібрати шляхом простого центрифугування, і пептид цекропіну A високої чистоти з такою ж антимікробною активністю, як комерційний пептид, вивільнений шляхом хімічного синтезу шляхом ефективного саморозщеплення інтеїну. Результати МІК (мінімальна інгібуюча концентрація) продемонстрували,

Приклади бактеріальних систем для одержання цекропінів та їх похідних

Тип цекропіну	Векторний штам	Склад середовища, г/л	Умови культивування	Антагоністичні властивості	МІК, мкг/мл	Джерело
Цекропін Р1	<i>A. tumefaciens</i> LBA 4404	Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5, Твін-20 – 0,75, Сурфактант – 0,75	12-16 год	<i>E. carotovora</i> ssp. <i>carotovora</i> B15	-	[45]
Цекропін В	<i>E. coli</i> BL21	Триптон – 11,8 Дріжджовий екстракт – 23,6 K ₂ HPO ₄ – 9,4 KH ₂ PO ₄ – 2,2 Гліцерин – 4 Ампіцилін – 0,1 Стрептоміцин – 0,05	18 год при 37°C, 200 об/хв	<i>B. subtilis</i>	62,5	[46]
	<i>E. coli</i> ER2566 (DE3)	Триптон – 16, Дріжджовий екстракт – 10 NaCl – 5 Канаміцин – 0,05	10 год при 25°C	<i>E. coli</i> <i>A. baumannii</i> <i>S. aureus</i>	-	[53]
Цекропін А	<i>Yersinia pestis</i> KIM6	Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5, Арабіноза - 2	4 год при 37°C	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>S. aureus</i> ATCC 29213 <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 <i>E. coli</i> ATCC 25922	8-256	[26]
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5, ПТГ - 0,024	12 год при 16°C		9,75	[48]

Цекропін В2	<i>E. coli</i> ER2566	Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5, ШТГ- 0,095	16 год при 15°C, 200 об/хв	<i>E. coli</i> JM109	1,8-3,7	[47]
				<i>E. coli</i> DH5α		
				<i>E. coli</i> BL21		
Цекропін-А похідна (PEW300)		Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5, Канаміцин – 0,05 ШТГ- 0,024	24 год при 16°C	<i>E. coli</i> ATCC 25922	7,09-28,35	[49]
				<i>K. pneumoniae</i> ATCC 35657		
				<i>B. megaterium</i> ATCC 14945		
				<i>S. enteritidis</i> ATCC 9120		
Цекропін AD	<i>B. subtilis</i> WB800N	Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5, Хлорамфенікол – 0,01 Неоміцин – 0,01 Мальтоза - 100	48 год при 37°C, 220 об/хв	<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,8 ± 3,87	[50]
				<i>E. coli</i> K99		
				<i>E. coli</i> K88		
				<i>P. aeruginosa</i> PAO1		
				<i>S. typhimurium</i> ATCC14028		
Цекропін <i>M. domestica</i>		Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5 Ампіцилін – 0,025 ШТГ- 0,24	4 год при 37°C, 220 об/хв	<i>S. aureus</i>	79860 - 105088	[51]
				<i>E. coli</i>		
Серицин- цекропін В	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5 Канміцин – 0,03 ШТГ- 0,24	3 год при 30°C, 220 об/хв	<i>E. coli</i> JM 109	20-30	[52]
				<i>S. aureus</i> ATCC25923		
KR12AGPWR6		Пептон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl – 5 Ампіцилін – 0,1 ШТГ- 0,096	24 год при 20°C, 150 об/хв	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2	[54]
				<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	
				<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		
				<i>A. baumannii</i> 14B0100	1	

що біопродукований пептид цекропін А мав такі ж антимікробні властивості, як і хімічно синтезований цекропін А [44].

1.3. Дріжджові експресійні системи для одержання цекропінів

E. coli є найбільш широко використовуваним хазяїном для виробництва антимікробних протеїнів (АМП), але основною проблемою, пов'язаною з їх експресією, є їх природна летальність для бактерій-господарів. Крім того, переважна більшість АМП мають позитивний сумарний заряд і, отже, чутливі до деградації ендогенними протеазами. Таким чином, було розроблено декілька стратегій злиття білків для подолання цих проблем. Однак ці методи призводять до низьких рівнів експресії білка приблизно 10-30 мг/л (злиті білки) і 1-5 мг/л (пептиди). Багатообіцяючою альтернативою використанню бактеріальних клітин як господарів для гетерологічної експресії АМП є використання дріжджів для виробництва цих агентів, оскільки ці організми мають перевагу стійкості до знищення, опосередкованого АМП. Більше того, певні види дріжджів, такі як *P. pastoris*, можуть ефективно секретувати пептиди в середовище для підвищення титру білка та зменшення навантаження на очищення [55].

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* також часто використовують як експресійну систему для одержання цекропінів, особливо часто для цекропінів P1. Для збільшення кількості генетичного матеріалу також в дослідженні використовували *E. coli* DH5 α . Після чого, вектори, які містять синтезувальні білки цекропінів (*pYES2/CT-a factor-CP1*) було трансформовано до дріжджової системи. Концентрація білку після очистки становила 7,83 мг/л. Одержаний цекропін P1 мав високу антагоністичну активність проти *E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., та *Pasteurella* sp. Автори відмічають, що для кращої індукції білка потрібно застосовувати галактозу, як індуктор [56].

Цекропін XJ — це катіонний антимікробний пептид, спочатку виділений із личинок *B. mori*. У дослідженні антибактеріальний пептидний ген *secropinXJ* був клонований у вектор експресії фактора *pYES2/CT/a* та експресований у штамі *S. cerevisiae* INVSc1. Після індукції рекомбінантного білка в дріжджах протягом 120 год максимальна кількість загального секретованого пептид становила 1,437 г/л.

Відсоток рекомбінантного цекропіну ХJ оцінювався як 79,45% від загального білка. Аналіз трансмісійної електронної мікроскопії показав, що поверхні оброблених патогенів зазнали очевидних морфологічних змін порівняно з необробленими контрольними, що свідчить про те, що пептид здійснює свою дію, безпосередньо руйнуючи мембрани мікроорганізмів [57].

Використання *P. pastoris* має наступні переваги перед прокаріотами і системи експресії ссавців: він обмежує секрецію білків клітини-господаря, але здатний секретувати великі кількості гетерологічних рекомбінантних білків; 2) швидкість росту *P. pastoris* є швидшою, ніж у ссавців-господарів і вона може легко рости в недорогих середовищах; 3) не містить ендотоксинів і вірусів; і 4) на додаток до індукованого промотора ендогенної алкогольоксидази 1, були розроблені різні нові залежні від джерела вуглецю та незалежні індуковані промотори для експресії білка в *P. pastoris* [55].

P. pastoris GS115/CEC – це штам рекомбінантних дріжджів, Спеціально створений для синтезу цекропіну А. Для експресії генів використовується плазмід *pPIC9K*. Завдяки ефективній протигрибковій дії цекропіну А проти *Alternaria alternata*, рекомбінантний *P. pastoris*, що експресує цекропін А, може контролювати даний агент. Спостереження за допомогою скануючого електронного мікроскопа та трансмісійного електронного мікроскопа показали, що при обробці рекомбінантними дріжджами індукуються очевидні зміни в морфології та внутрішній структурі *A. alternata*, що призводить до деяких аномалій клітин і лізису. Для подальшого уточнення молекулярного механізму дії було вивчено властивості зв'язування GS115/CEC з ДНК і РНК клітин грибів *A. alternata*. Результати показали, що ДНК і РНК грибових клітин *A. alternata* були деградовані рекомбінантними дріжджами GS115/CEC. Крім того, рекомбінантний штам GS115/CEC може індукувати експресію білка, пов'язаного з патогенезом [58].

АВР-dНС-цекропін А є лінійним катіонним пептидом, який виявляє антимікробні властивості. Щоб вивчити новий підхід до експресії АВР-dНС-цекропіну А з використанням метилотрофних дріжджів *P. pastoris*, клонування синтезувального гену відбувалось у вектор *pPICZαA*. Плазмиду *pPICZαA* АВР-dНС-

цекропін А потім трансформували в *P. pastoris* GS115 шляхом електропорації. Наприкінці експресії, приблизно 48 мг АВР-dНС-цекропіну А було секретовано в 1 л середовища. Рекombінантний АВР-dНС-цекропін А очищали за допомогою ексклюзивної хроматографії, таким чином отримуючи 21 мг з 1 л чистого білка [59].

P. pastoris Х33 використовували для одержання цекропіну Р4. Експресія секретованих рекombінантних білків у *P. pastoris* пропонує кілька переваг перед бактеріальними системами експресії. Вони включають відповідне згортання молекул і утворення дисульфідних зв'язків, а також виконання посттрансляційних модифікацій, які зберігають функцію білка. Секреція рекombінантних білків обходить внутрішньоклітинне накопичення, що є важливим аспектом експресії токсичних білків (а цекропіни являють собою токсичні білки, як для навколишнього середовища, так і для організму, який його синтезує). Секреція рекombінантних білків також спрощує їх очищення, уникаючи забруднення внутрішньоклітинними білками. Ці переваги роблять виробництво секретованого рекombінантного білка в *P. pastoris* популярним для наукових досліджень. Відзначається, що концентрація метанолу напряму впливає на експресію цекропіну Р4 [60].

Штам *P. pastoris* Х33 також можна використовувати для синтезу гібридних препаратів. Таким чином, в дослідженні 2018 року було синтезовано комбінанту цекропін А-танатин. Дослідження біологічної активності після очищення показали, що гібридні антимікробні пептиди мають антимікробну дію широкого спектру та мають хорошу антимікробну дію на більшість грампозитивних і грамнегативних бактерій без гемолізу, а також хорошу стабільність *in vitro* [61].

Дріжджі роду *Pichia* також здатні продукувати гібридні препарати. Наприклад, штам *P. pastoris* GS115 синтезує композит з глутатіон S-трансфераза і цекропін В (GST-СВ). Цекропін В, спочатку виділений з гігантської шовкопрядної молі, є термічно стабільним і розчинним поліпептидом. Це також один із відомих АМП, який демонструє широкий спектр антибактеріальної дії проти бактерій, а також вірусів. Тому, поєднання разом з ферментом може призвести до більш активної антимікробної дії. Оптимальний час інкубації та концентрація

Приклади дріжджових систем для одержання цекропінів та їх похідних

Тип цекропіну	Векторний штам	Склад середовища, г/л	Умови культивування	Антагоністичні властивості	МІК, мкг/мл	Джерело
Цекропін P1	<i>S. cerevisiae</i>	Дріжджовий екстракт – 3, Пептон – 10, Галактоза - 20	72 год, 30 °С	<i>E. coli</i> , та	2-8	[56]
				<i>Salmonella sp.</i> ,	2-4	
				<i>Shigella sp.</i> ,	2-4	
				<i>Pasteurella sp.</i>	4-8	
Цекропін XJ	<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	Дріжджова азотна основа – 1,7 (NH ₄) ₂ SO ₄ - 5, Галактоза - 20	120 год, 30 °С	<i>E. coli</i> ATCC25922	6	[57]
				<i>S. aureus</i>	7	
				<i>K. pneumoniae</i>	8	
				<i>Dist ribution</i>	10,12	
Цекропін А	<i>P. pastoris</i> GS115/CEC	Дріжджова азотна основа – 13,4 Біотин – 0,0004 Дріжджовий екстракт - 10, Пептон – 20 Гліцерин - 10	48 год, 30 °С, 200 об/хв	<i>A. alternata</i>	2	[58]
АВР-dHC- цекропін А	<i>P. pastoris</i> GS115	Метанол – 5 Казамінові кислоти – 20 Дріжджова азотна основа – 13,4 Біотин – 0,4 Дріжджовий екстракт - 10, Пептон – 20	72 год, 20 °С, 230 об/хв	<i>C. albicans</i>	32-64	[59]
				<i>N. crassa</i>		
				<i>Rhizopus sp.</i> ,	64-128	
				<i>Fusarium sp.</i> ,	32-64	
				<i>Alternaria sp.</i>	8-16	
				<i>Mucor sp.</i>	16-32	
Цекропін P4	<i>P. pastoris</i> X33	Метанол – 20 Дріжджова азотна основа – 13,4 Біотин – 0,0004	96 год, 30 °С	<i>S. aureus</i>	-	[60]
				<i>P. aeruginosa</i>		
				<i>E. coli</i>		

Цекропін танатин	A-	<i>P. pastoris</i> X33	Метанол – 10 Дріжджова азотна основа – 13,4 Біотин – 5 Дріжджовий екстракт – 10 Пептон – 20 КН ₂ РО ₄ – 13,6	60 год, 28 °С, 250 об/хв, рН 6,0	<i>S. aureus</i>	-	[61]
GST-СВ		<i>P. pastoris</i> GS115	Дріжджова азотна основа – 13,4 Біотин – 0,0004 Дріжджовий екстракт - 10, Пептон – 20 Метанол 10	36 год, 25 °С	<i>S.aureus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305	250	[62]
					<i>E. coli</i> CFT073	125	

метанолу для індукованої експресії становили 36 годин і 1 % мас./об. відповідно. Вихід GST-СВ становив 2,2 г/л [62].

РОЗДІЛ 2

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦЕКРОПІНІВ

Питання антибіотикорезистентності є дуже поширеним на даний час, тому варто розглядати цекропіни в першу чергу як антимікробні пептиди, які можуть потенційно замінити відомі антибіотики.

2.1. Антимікробна активність цекропінів

Цекропін А проявляє високу антагоністичну активність щодо дикого штаму *E. coli* MG1655. Автори відзначають, що стаціонарна фаза *E. coli* значно стійкіша до пермеабілізації мембрани цекропіном А, ніж *E. coli* середньої логарифмічної фази, де при концентрації 0,5 мкМ (визначено як МІК) відмічається 100% пермеабілізація. При концентрації в 5 мкМ відмічається і повна проникність білку через мембрану навіть на стаціонарній фазі росту [63]. В іншому дослідженні відзначається, що МІК цекропіну А щодо різних штамів кишкової палички може варіюватись від 0,25 до 0,5 мкМ [64].

Цекропін-4-похідні, виділені з *G. mellonella* визначали як потенційні антимікробні агенти проти метицилін-резистентного стафілококу (MRSA) та інших бактерій групи ESKAPE. Похідний пептид С18 продемонстрував високу антибактеріальну активність щодо грамнегативних і грампозитивних бактерій, а також дріжджів. Крім того, С18 продемонстрував МІК 4 мкг/мл проти метицилін-резистентного *S. aureus* (MRSA) і продемонстрував синергію з даптоміцином. Подібно до традиційних цекропінів, С18 змінював потенціал мембрани, підвищував плинність і викликав розрив мембрани при 32 мкг/мл [65].

Цекропін AD перевіряли на рибі *Scophthalmus maximus* L., як компонент постійного споживання. Дослідження показали, що даний мікробний пептид напряму впливає на видову зміну в кишечнику. Білок значно зменшив відносну кількість *Lactobacillus* та *Bacteroides*. Проте. Відзначалось зниження смерності риби, яка була зараженою *Edwardsiella tarda*. Цекропін покращив імунну

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Собченко С.А.			<i>РОЗДІЛ 2 АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ЦЕКРОПІНІВ</i>	Літ.	Арк.	Архивів
Перевір.		Воронцов О.О.					29	115
Реценз.						<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

відповідь кишечника, не порушуючи роботу бактеріального співтовариства та посилення стійкості до хвороб [66].

Haemophilus parasuis— грамнегативна бактерія роду *Haemophilus* родини *Pasteurellaceae*. Цей мікроорганізм є етіологічною бактерією хвороби Глессера, яка характеризується фібринозним полісерозитом свиней, менінгітом і синдромом артрити, і це стало серйозною проблемою для поголів'я свиней у всьому світі. Відзначається можливість цекропіну В щодо високої антагоністичної дії проти 15 стандартних штамів збудників хвороби Глессера та 5 клінічних ізолянтів. МІК варіюється від 2 до 16 мкг/мл [67].

Цекропін, який експресується генетично модифікованими бактеріями, має протигрибкову дію на *C. albicans*. МІК і мінімальна фунгіцидна концентрація (МФК) *C. albicans* становили 0,9 мкг/мл і 1,8 мкг/мл відповідно. Відповідно до кінетики знищення, МФК цекропіну може вбити *C. albicans* за 40 хв. Цекропін може спричинити грубість і порізи клітинної стінки, що зрештою вбиває гриб. Вплив цекропіну на клітинну мембрану обробленого *C. albicans* за допомогою 1,6-дифеніл-1,3,5-гексатрієну та йодиду пропідію показав, що він може змінювати проникність і текучість, руйнувати їх і призводити до некрозу клітин. Крім того, цекропін також може спонукати клітини виробляти надмірну кількість активних форм кисню, викликаючи зміни потенціалу мітохондріальної мембрани [68].

Також, відомі випадки комінованих препаратів. Таким прикладом може бути наноккомпозит частинок срібла разом з церкопінами D2A21, D2A10 та D4E1. Наноккомпозитний матеріал продемонстрував значно підвищену антибактеріальну активність порівняно з нативними пептидами та наночастинками срібла з МІК у діапазоні від 1-3 мкг/мл проти як грампозитивних, так і негативних тест-бактерій (*P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922); в той час як МІК нативних пептидів було виявлено в діапазоні 4-6 мкг мл⁻¹. Наноккомпозитний матеріал діє на рівні клітинної мембрани, спричиняючи повну втрату мембранного потенціалу та призводячи до порушення її цілісності з незворотним пошкодженням клітини, про що свідчить швидка втрата життєздатності через руйнування мембрани, що призводить до лізису. Серед трьох

протестованих пептидів наноккомпозит D2A21-срібло мав максимальну антибактеріальну активність. Наноккомпозити на основі срібла можна розглядати як потенційні антибактеріальні засоби для різних біомедичних застосувань [69].

Нещодавно була вивчена активність гібридного пептиду цекропіну А-меліттину VP21 у боротьбі з зеленою та синьою пліснявою та кислотою гниллю. Мінімальні інгібуючі концентрації VP21 проти *Penicillium digitatum*, *P. italicum* і *Geotrichum candidum* становили 8, 8 і 4 мкМ/л відповідно. VP21 може пригнічувати ріст міцелію, результати скануючої електронної мікроскопії чітко показали, що міцелій, оброблений VP21, зменшився, утворив шорстку поверхню, спотворився та зруйнувався. Флуоресцентне фарбування SYTOX Green показало, що VP21 може руйнувати мембрани. Параметри проникності мембрани, включаючи позаклітинну провідність, витік іонів калію та вивільнення клітинних компонентів, помітно збільшувалися зі збільшенням концентрації VP21. Спостерігалось грубе і необоротне пошкодження цитоплазми і мембран. Був позитивний кореляційний зв'язок між гемолітичною активністю та концентрацією VP21 [70].

Ентероагрегативна *E. coli* (EAEC) причетна до ендемічних, а також епідемічних епізодів діареї в усьому світі. Патогенність EAEC описується трьома різними стадіями, а саме: початкове прилипання до поверхні слизової оболонки кишечника, утворення біоплівки та індукція запальної відповіді, що призводить до вивільнення токсинів. Наразі активно вивчається потенціал використання гібридного препарату цекропін А (1-7)-меліттину щодо штамів цих патогенів. Біло визначено, що даний білок пригнічує утворення біоплівки *E. coli* вже на 24 годині взаємодії. Також, було встановлено значення МІК щодо мультирезистентних штамів KY941936.1, KY941937.1 та KY941938.1, які становили 4, 2 та 2 мг/мл відповідно [71].

Сучасні дослідження продемонстрували, що чотири пептиди — DAN1, DAN2, HOLO1 і LOUDEF1 — отримані з нещодавно секвенованих геномів членистоногих, демонстрували потужні антимікробні ефекти *in vitro*. Дані білки причислено до цекропінів. Перевірку цих білків виконували на мишах жіночої статі лінії C57BL/6. Було визначено, що DAN2 захищав 100% мишей, коли його вводили

в концентрації 20 мг/кг через тридцять хвилин після інокуляції смертельної дози *E. coli* внутрішньочеревно. Нижчі концентрації DAN2 — 10 мг/кг і 5 мг/кг захищали більше 2/3 мишей. Усі три рівні дози зменшували бактеріальне навантаження в крові та перитонеальній рідині в 10 разів або більше. Визначено, що DAN2, як типовий цекропін, діє шляхом порушення цілісності мембрани *E. coli* [72].

Гібридний пептид K11 являє собою поєднання мелітину, цекропіну А та магаїніну 2. Повідомлялося, що він наділений такими властивостями, як висока катіонна природа та антимікробна активність (проти як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій), а також високий терапевтичний індекс і мінімальна токсичність еукаріотичних клітин. Дослідження *in vivo* взаємодію та проникнення гібридного пептиду K11 у бактеріальні клітини *A. baumannii* ATCC 19606 оцінювали за допомогою конфокальної мікроскопії, що спостерігалось вже через 10 хвилин після інкубації з пептидом. Лізис клітин разом із витоком цитоплазматичного вмісту було підтверджено електронною мікроскопією. Підтвердження ефективності пептиду *in vivo*, оцінювали шляхом створення гідрогелю карбополу на його основі. Дослідним організмом виступали миші жіночої статі лінії BALB/c з ранами, які були уражені *A. baumannii*. Лікування призвело до відновлення маси тіла, повного очищення рани від інфекції на 7 день і 99% закриття рани до 21 дня, що порівняно з контролем (за той самий час закриття ран становило 70%) є кращим результатом [73].

В іншому дослідженні визначали антибактеріальну активність подібного препарату (Mag II-SB), до складу якого входив цекропін В та магаїнін 2. Препарат продемонстрував антибактеріальну дію широкого спектру *in vitro*. Додатково, антибактеріальну та імуномодулюючу функції оцінювали на мишах BALB/c, інфікованих *E. coli* ATCC 25922. Гістологічно Mag II-SB полегшував пошкодження кишківника, пов'язані з кишковою паличкою, і підтримував цілісність кишкового слизового бар'єру шляхом посилення регуляції білків щільного з'єднання. Кишкова мікробна флора позитивно модулювалася у мишей, які отримували Mag II-SB, інфікованих *E. coli*. Крім того, безпосереднє годування інфікованих мишей міцелієм *Cordyceps militaris*, що продукує Mag II-SB, додатково підтвердило

антибактеріальну та імуномодулюючу функції рекомбінантного гібридного антимікробного пептиду [74].

Гібридний пептид під назвою HEA-9 складається з батьківських пептидів VAMP-27 і цекропіну А. Було визначено *in vitro* антибактеріальну активність даного гібриду проти чутливих і мультирезистентних штамів грамнегативних і грампозитивних бактерій. HEA-9 виявляв широку активність проти чутливих і мультирезистентних штамів бактерій *S. aureus* і *E. coli*, маючи МІК в 12,5 мкМ. Цікаво, що МІК HEA-9 у поєднанні з традиційними антибіотиками (ріфампіцилін та ампіцилін) в деяких ситуаціях знижувалася до 0,098 мкМ [75].

Катіонний-цекропін-D-подібний білок також перевіряли щодо мультирезистентних штамів (MDR) бактерій. Антагоністичну активність перевіряли проти 30 клінічних ізолятів *K. pneumoniae* і 30 ізолятів *P. aeruginosa* (n=30). Результати виявили бактерицидну дію як проти штамів дикого типу, так і проти резистентних штамів, але MDR *P. aeruginosa* показала вищу чутливість до цього пептиду зі значеннями МІК від 32 до >256 мкг/мл. Білок продемонстрував вищу стабільність у моделі мембрани *P. aeruginosa* порівняно з моделлю *K. pneumoniae* завдяки більшій кількості нековалентних взаємодій із фосфоліпідом 1-пальмітоїл-2-олеїл-sn-гліцєро-3-(фосфо-рац-(1-гліцєрин))) (POPG) [76].

Антимікробну ефективність і бактерицидний механізм цекропіну А2, отриманого з цекропіну А *A. aegypti*, визначали на поширеному патогені *P. aeruginosa*. МІК проти більшості клінічних ізолятів *P. aeruginosa* становив від 32 до 64 мкг/мл, а його МІК порівняно з іншими грамнегативними бактеріями становив від 2 до 32 мкг/мл. Важливо, що цекропін А2 продемонстрував синергетичну активність проти *P. aeruginosa* при поєднанні з тетрацикліном, знижуючи МІК обох агентів у 8 разів. Цекропін А2 зв'язується з ліпополісахаридами *P. aeruginosa*, проникає в мембрану та взаємодіє з бактеріальною геномною ДНК, таким чином полегшуючи транслокацію тетрацикліну та самого білку в цитоплазму [77].

Цекропін А (1–8)-LL37 С-L вбиває бактеріальні клітини та викликає порушення структури поверхні, що було визначено скануючою електронною мікроскопією. Синергічні ефекти спостерігалися в комбінації С-L з кількома

антибіотиками (хлорамфенікол, тіамфенікол або неоміцину сульфат) проти *E. coli* та *S. aureus*. Фракційні інгіюючі концентрації (ФІК) комбінованих груп «С-L + тіамфенікол» і «С-L + пеніцилін G» проти *E. coli* CVCC 245 були вищими, ніж у «С-L + хлорамфенікол», «С-L + неоміцину сульфат» та групи «С-L + канаміцин», тоді як індекс ФІК групи «С-L + пеніцилін G» проти *S. aureus* ATCC 25923 був найвищим серед усіх груп [78].

Цекропін А також було поєднано з білком, який має назву абендолізін. Таке поєднання показує гарний синергічний ефект, збільшився антимікробну дію щонайменше у 2–8 разів для різних клінічних ізолятів *A. baumannii* з мультирезистентністю. Розроблений пептид продемонстрував синергічний ефект з бета-лактамами антибіотиками цефотаксимом, цефтазидимом і азтреонамом, а також додатковий ефект з меропенемом та іміпенемом. Гібридний препарат не мав цитотоксичної дії на клітинну лінію А549 і врятував мишей (виживаність 40%) від системної інфекції *A. baumannii*. Разом ці результати свідчать про потенціал терапії лізином в поєднанні з цефпрокінами і можуть спонукати до її використання як альтернативи антибіотикам [79].

Нещодавно дослідження показали, що АВР-dНС-цекропін А демонструє сильну антибактеріальну та протигрибкову активність [58]. Антибіотик циклодекстрин вирішили поєднати з АВР-dНС-цекропіном А. В результаті цей препарат посилив фізичні та хімічні властивості АВР-dНС-цекропіну А, але не значно знизив його антибактеріальну активність. Це вказує визначений показник МІК, який що для комбінованого препарату, що для чистого пептиду проти *Agrobacterium* ЕНА105 складав 0,0625 мг/мл [80]. За іншими результатами даний білок також мав антагоністичну активність проти *E. coli* K12D31, а МІК був таким самим - 0,0625 мг/мл [81].

2.2. Порівняння ефективності використання цекропінів та антибіотиків

Цекропін А здатен модулювати хорошу мікрофлору кишечника. Для порівняння використовували гентаміцин. На мишах лінії С57BL/6 було перевірено дозування цього білку. Виявилось, що ін'єкційні дози ≤ 15 мг/кг не показали негативного впливу на печінку, серце, селезінку та нирки. Цекропін та гентаміцин

зменшили збагачення *Bacteroidaceae* і *Enterobacteriaceae* в кишечнику. Проте, білок продемонстрував селективне збагачення *Lactobacillus*, чим не може похвастатися антибіотик. Цекропін А полегшує запальні захворювання кишечника шляхом зменшення шкідливої кишкової мікрофлори та, зокрема, посилення корисної кишкової мікрофлори. Механізм для гентаміцину є іншим [82].

Ще одним прикладом комбінованого препарату може бути гібридний пептид цекропін-меліттин. Даний препарат характеризується високою активною активністю проти *Entamoeba histolytica* - це кишковий паразит, який локалізується в просвіті кишечника людини і може атакувати епітелій. Вплив пептиду та метронідазолу на *E. histolytica* через 24 години та 48 годин показав, що при найвищій концентрації пептиду СМ11 (24 мкг/мл) цитотоксичний ефект становив 93,7% та 94,9%, а для метронідазолу (40 мкг/мл) був 65,5% і 74,3% відповідно [83].

C. albicans є клінічно найбільш поширеним патогенним грибком, який призводить до високої захворюваності та смертності у пацієнтів з ослабленим імунітетом. Наразі виявлено, що отриманий з цекропіну-4 пептид під назвою С18 має більш широкий антибактеріальний спектр після модифікації та виявляє значну протигрибкову активність проти *C. albicans*. МІК щодо різних штамів зазначеного грибу варіюються на рівні 4-32 мкг/мл, а клінічні ізоляти резистентності до флуконазолу *C. tropicalis* були високочутливими. до С18 зі значенням МІК 8 або 16 мкг/мл. Крім того, С18 перевершує флуконазол щодо знищення планктону *C. albicans* по інгібуючій та знищувальній кінетичній кривій. Більше того, С18 може послабити вірулентність *C. albicans*, що включає пошкодження клітинної структури, уповільнення переходу гіф та інгібування утворення біоплівки. С18 може пригнічувати *C. albicans* через ініціювання мітохондріальної дисфункції, викликані генерацією активних форм кисню і накопиченням Ca^{2+} . Поточні дослідження представляють С18 як привабливого терапевтичного кандидата, який слід розробити для лікування кандидозу [68,84].

Запалення кишечника може спричинити порушення функції епітеліального бар'єру та порушити імунний гомеостаз, що підвищує ризики розвитку багатьох

дуже смертельних захворювань. Ентерогеморагічна *E. coli* (ЕНЕС) O157:H7 викликає кишкові інфекції в усьому світі та є основним патогеном, який індукує запалення кишечника. Цекропін А (1–8)-LL37 (С-L), новий гібридний пептид, який демонструє чудові антибактеріальні властивості та мінімізовану цитотоксичність. Було визначено протизапальну дію цекропіну у мишей, інфікованих ЕНЕС O157:H7. Обробка білком покращила склад мікробіоти та баланс мікробної спільноти в кишечнику миші. Інфекція ЕНЕС призвела до значного збільшення видів *Peptoclostridium*, *Escherichia-Shigella*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Coprobacillus*, *Blautia* та *Lachnospiraceae*. Введення Цекропіну значно знижувало регуляцію цих видів. Гібридний пептид продемонстрував кращі протизапальні ефекти, ніж антибіотик енрофлоксацин [85].

Лізени, закодовані бактеріофагами, все частіше повідомляються як альтернативи для боротьби з інфекціями *A. baumannii*. Інший підхід до знищення грамнегативних патогенів за допомогою лізину заснований на злитті пептиду з властивостями пермеабілізації зовнішньої мембрани. Таким чином, було створено новий гібрид лізину LysMK34 з цекропіном А. Сконструйований лізин має покращену антибактеріальну активність порівняно з вихідним лізином щодо МІК (0,45–1,2 мМ), швидкості знищення та ступеня знищення. Гібрид має в 2 рази підвищену активність проти клітин стаціонарної фази, а бактерицидний ефект стає менш залежним від внутрішньоклітинного осмотичного тиску. Зокрема, штами, стійкі до колістину, стають дуже сприйнятливими до гібридного препарату лізину з пептидом [86].

Нещодавно було виділено 3 нових цекропіни, які називаються сатанін 1, 2 і курвіцин, знайдених у транскриптомах двох видів гнойових жуків *Dichotomius satanas* і *Onthophagus curvicornis*. Аналіз послідовності та кругового дихроїзму показує, що вони мають типові ознаки сімейства цекропінів. Ці білки активні в основному проти грамнегативних бактерій (МІК складає 3,12–12,5 мкг/мл), з низькою токсичністю для еукаріотичних клітин. Для порівняння, МІК щодо грамнегативних бактерій ампіциліну коливається від 0,19 до 100 мкг/мл, а гентаміцину та фуконазолу – від 0,05 до 25 мкг/мл [87].

Сучасні дослідження, як це було згадано раніше, не зупиняються на монокомпонентних препаратах, а завжди шукають гарні комбінації, і антимікробні пептиди в тому не є виключенням. Нещодавно було визначено активність комплексу пептидів (FLIP7), що виробляється личинками мухи *Calliphora vicina*. Комплекс демонструє сильну активність у знищенні клітин і руйнуванні матриці проти біоплівки патогенної людини, стійкої до антибіотиків *E. coli*, *S. aureus* і *A. baumannii*. Було виявлено, що комплекс містить пептиди із сімейств дефензину, цекропіну, диптерицину та багатих проліном пептидів, які одночасно експресуються у відповідь на бактеріальну інфекцію та кодуються сотнями ізоформ мРНК. Активність FPL7 здебільшого приваблива за співвідношенням МКЗБ/МК (МКЗБ - мінімальна концентрація знищення біоплівки), а не за абсолютним значенням МК порівняно зі стандартними антибіотиками (тригідрат меропенему з карбопенемів, цефалоспорин натрію третього покоління цефотаксим, природний поліпептид поліміксину В сульфат і глікопептид ванкоміцин) [88].

P. aeruginosa є одним із основних нозокоміальних збудників, які можуть спричиняти широкий спектр гострих і хронічних інфекцій. Ми досліджували *in vitro* активність антибіотиків (цефтазидиму, тобраміцину, ципрофлоксацину, дорипенему, піперациліну та колістину) та антимікробних катіонних пептидів цекропін(1–7)-меліттин А(2–9) амід окремо або в комбінації проти біоплівок лабораторного штаму ATCC 27853 і 4 клінічних штамів *P. aeruginosa*. Значення МКЗБ для антибіотиків і цекропіну становили 80–5120 і 640 мг/л відповідно. У поєднанні цекропіном та антибіотиків при співвідношенні 1/10 значення МКЗБ антибіотиків, які діють проти біоплівок, були знижені до 8 разів. МК антибіотиків переважно коливались від 0,025 до 16 мг/л, проте МК піперацикіну становив 4-128 мг/л. В той час як МК цекропінів коливався від 8 до 64 мг/л [89].

Відомо, що ліпополісахариди бактерій відіграє вирішальну роль у антимікробній чутливості проти антимікробних пептидів. Підвищена чутливість до катіонних цекропінів (В та Р1) була виявлена для ліпополсахаридних-дефіцитних мутантів *E. coli* BW25113, що містять делеції в будь-якому з генів, необхідних для внутрішньої частини ядра олігосахариду, а саме *waaC*, *waaE*, *waaF*,

waaG і *gmhA*. Відзначається, що антимікробна цекропіну В і цекропіну Р1 залежить не тільки від внутрішньої частини основного олігосахариду, але також від зовнішньої частини та її цукрового складу. Біло визначено, що МІК щодо різних штамів *E. coli* BW25113 для цекропінів коливається від 4 до 32 мкг/мл, в той час як антибіотик колістину має показники від 0,063 до 0,25 мкг/мл [90].

Відзначається, що цекропін В переважно активний саме проти грампозитивних бактерій. Даний пептид може бути гарною заміною щодо стрептоміцину, оскільки в більшості випадків білок має вищу антагоністичну активність. Наприклад, щодо стрептоміцину резистентність мають *S. choleraesuis* та *B. bronchiseptica*, в той час як МІК для цекропіну В для цих бактерій становить 8 та 0,5 мкг/мл відповідно. Також, відмічаються нижчі концентрації щодо *A. pleuropneumoniae* та *H. Parasuis*, для стрептоміцину МІК становить 16 мкг/мл для обох бактерій, а для пептиду – 8 та 2 мкг/мл відповідно. Також, цекропін В має кращі антагоністичні властивості щодо пеніциліну. При порів'янні МІК кишкової палички, для пеніциліну його значення становить 32 мкг/мл, а для цекропіну – всього 16 мкг/мл [91].

Цекропін Р1 за антибактеріальною активністю було порівняно з ампіциліном. Порівняння велось за оптичною густиною тестових культур (*E. coli*, *S. typhimurium*, *H. parasuis*, та *S. aureus*). Ампіцилін проявляв кращу антагоністичну активність щодо усіх штамів. Оптична густина при вимірюванні довжини хвилі 60 нм в присутності антибіотику на 12 годині в середньому для всіх патогенів становила 0,25. Для цекропіну Р1 показник оптичної густини варіювався від 1 до 1,5. Також, додаткове порівняння виконали за допомогою поросят та хлортетрацикліну. Поросятам вводили дієту, яка містила антибіотик, або інженерний штам *B. subtilis*, який, в свою чергу, синтезував пептидний препарат, що містив цекропін Р1. Ефективність велась по випадках діареї. В період перших 15 діб кількість випадків діареї при прийомі *B. subtilis* становила 20%, а у випадку антибіотику – 18,3%, контрольна група, яка мала звичайну дієту без добавок мала 31,7% випадків розладу. В період з 16 по 28 день кількість випадків на діарею становила 28,3, 27,2 та 38,9 % відповідно [92].

ВИСНОВКИ ДО ЛІТОГЛЯДУ

1. Джерелом виділення генів синтезу цекропінів виступають в загальному різні комахи, а також іноді й рослини. Ці гени допомагають синтезувати цекропіни, які в першу чергу виконують захисну роль організму. Тому, важливо розуміти їх антагоністичні властивості, як потенційних аналогів антибіотиків.

2. Більшість досліджень щодо біотехнологічного синтезу цекропінів присвячена бактеріальним штамам, а саме рекомбінантним кишковим паличкам. Це пояснюється тим, що саме кишкова паличка стала першим агентом, з повним розшифрованим геномом. Проте, наявні дані відзначають велику проблему синтезу цекропінів за допомогою *E. coli*, а саме токсичність самого білка. Тому, для бактеріальних культур шукають спосіб синтезу таких білків назовні клітину.

3. Досліджень з дріжджами хоча й суттєво менше, проте вони є більш перспективними агентами, оскільки однією з переваг застосування цих мікроорганізмів є їх стійкість до токсинів, а також можливість їх синтезу як екзометаболітів. Більшість досліджень присвячено рекомбінантним штамам *P. pastoris*. Відмічається, що через свої переваги, дріжджі синтезують більшу кількість білку, що було доведено під час літературного огляду.

4. Цекропіни, як окремі речовини, виявляють широкий спектр антимікробної і не лише цієї дії. Відзначають декілька можливих механізмів. Перше, це руйнування ліпополісахаридів, які є основною частиною стінки грамнегативних бактерій, друге – це розпізнавання пептидоглікану, що дає поштовх до синтезу антимікробних пептидів і останнє, це самі патогенні бактерії, вони також виступають індукторами синтезу цекропінів.

5. Наразі почали з'являтися доклінічні дослідження застосування цекропінів, використовуючи як моделі мишей та поросят. Проте деякі дослідження показують протилежність дії цих антимікробних пептидів, через що, дана тематика і до сьогодні залишається актуальною.

РОЗДІЛ 3
ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА
ЦЕКРОПІНУ А ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу на основі цекропіну А, галузей використання, потреби у лікарському засобі

Цекропін вперше був виділений з гемолімфи гігантських шовкопрядів, уражених бактеріями. Цекропіни — це катіонні пептиди, у яких відсутній залишок цистеїну з сильним основним N-кінцем, з'єднаним з нейтральним C-кінцем гнучким гілцин-проліновим зв'язком. Комахи мають три основних типи цекропінів: цекропін А (37 амінокислот), цекропін В (35 амінокислот) і цекропін D (37 амінокислот) [93].

Цекропіни виявляють широкий спектр антимікробних властивостей проти як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій і грибів. Цекропін А викликає лізис як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій за таким механізмом: спочатку цекропін А зв'язується з негативно зарядженим ліпідом мембрани, його сильно позитивно зарядженим N-кінцем, а потім індукує утворення пор за допомогою свого гідрофобного C -кінець, який потім робить мембрану проникною, що зрештою призводить до загибелі бактерій [93].

Цекропін А є антимікробним пептидом, активним проти грампозитивних і грамнегативних бактерій. Деякі дослідження показали, що цекропін А зв'язується з негативно зарядженими мембранними ліпідами та утворює упакований шар, який забезпечує проникність мембран і допомагає вбивати бактерії. Було показано, що цекропін А має ЛК₅₀ 0,9 мкМ (напівлетальна концентрація) і ЛК₉₀ 1,7 мкМ (летальна концентрація смертності 90%) проти штамів *E. coli* [94].

Окрім добре відомих антимікробних властивостей, дослідження

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Собченко С.А.</i>				РОЗДІЛ 3 ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЦЕКРОПІНУ А ДЛЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Воронцов О.О.</i>						40	115
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

продемонстрували протипухлинну активність цекропіну А проти клітинних ліній лейкемії, лімфоми, карциноми товстої кишки та інших клітинних ліній пухлин. Крім того, Цекропін А має фунгіцидну дію, проте вона конкретно нижча за антибактеріальну. Дослідження показало, що цекропін А досягає повної летальності при приблизно 25 мМ для проростання конідій *Aspergillus spp.* і повна летальність для непророслих і пророслих конідій *Fusarium spp.* при 1,5 мМ [94].

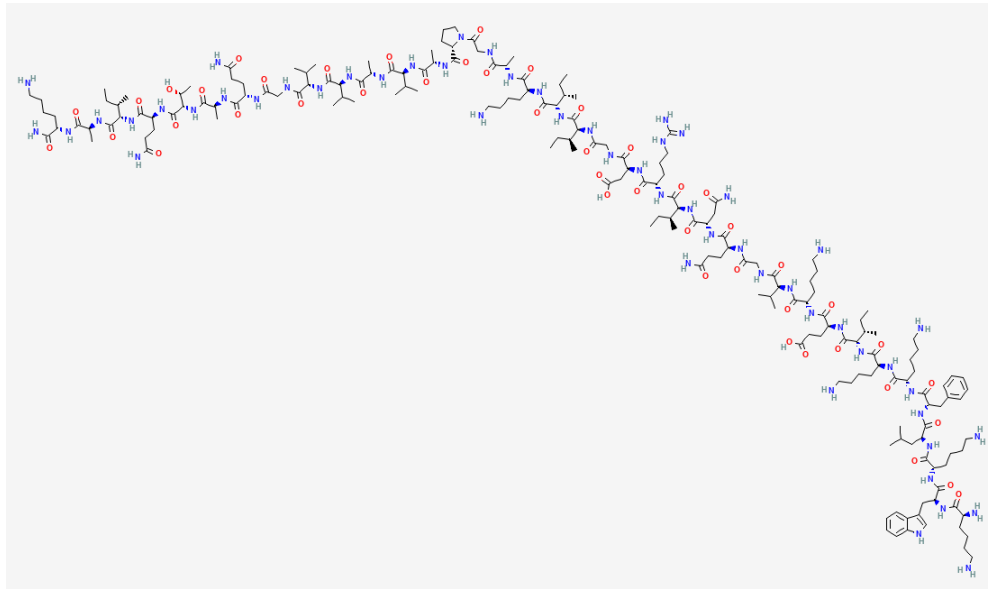


Рис.3.1. Структурна формула цекропіну А [95]

Хімічна формула: $C_{184}H_{313}N_{53}O_{46}$ [95]

Молекулярна маса: 4004 г/моль [95]

Оскільки цекропін А в першу чергу розглядається як антимікробний агент проти *E. coli*, пропонується розглянути захворювання, які викликають ці бактерії.

Бактерії *E. coli* зазвичай живуть у кишечнику здорових людей і тварин. Більшість типів кишкової палички нешкідливі або викликають відносно короткочасну діарею. Але деякі штами, такі як *E. coli* O157:H7, можуть викликати сильні спазми в шлунку, криваву діарею та блювоту [96]. У 2020 році 28 країн ЄС повідомили про 4 824 підтвержені випадки зараження *E. coli* STEC, до якого відноситься *E. coli* O157:H7, що продукує токсин Шига. Загальний показник виявлення становив 1,6 випадків на 100 000 населення. Найвищі показники повідомлень зафіксовано в Ірландії, Мальті, Данії та Норвегії. Через пандемію COVID-19 у 2020 році порівняно з 2016-2019 роками кількість сповіщень ЄС

помітно знизилася. Найбільший рівень підтверджених випадків спостерігався у дітей 0–4 років: 8,6 випадків на 100 000 населення для хлопчиків і 7,5 випадків на 100 000 населення для дівчат [97].

Кількість спалахів STEC, пов'язаних із споживанням фруктів і овочів, забруднених фекаліями диких тварин, зростає. В загальному, переносниками є гризуни, птахи та комахи. Оскільки корм для домашніх тварин є легким джерелом їжі для гризунів, птахів і комах, цих тварин приваблюють ферми та можуть передавати STEC між худобою та людьми або навпаки. Виходячи з результатів останніх досліджень спостереження, широкий спектр домашніх тварин, тварин, що містяться в неволі, і диких тварин, у тому числі водних, можуть передавати STEC людям безпосередньо через ковтання або контакт на фермах і в зоопарках або опосередковано через фекальні забруднення джерел води, овочеві поля, м'ясо та молоко. Крім того, STEC тісно пов'язаний з діяльністю людини [98].

У численних дослідженнях повідомлялося про STEC вже знаходять у свіжій рибі та молюсках, а також у готових до споживання продуктах на роздрібних ринках, що свідчить про те, що діяльність людини, така як обробка та споживання продуктів, може бути основним джерелом забруднення STEC. Цікаво, що риба та молюски, що живуть у прибережних районах, деякі культивовані риби та ті, що знаходяться в безпосередній близькості від тваринницьких приміщень або нижче за течією, також виявились забрудненими STEC. Ці результати переконливо вказують на те, що риба та молюски є потенційним резервуаром або джерелом поширення STEC, і що стічні води із забруднених STEC водойм також можуть бути додатковим потенційним джерелом передачі, що підкреслює необхідність подальших досліджень галузі аквакультури. Тому, хвороби, спричинені STEC наразі вважаються зоонозними [98].

В табл.3.1. показано потенційних переносників штамів STEC.

Потенційні переносники штамів STEC [98]

Жуйні савці	Моногастричні савці	Птахи	Риба	Амфібії	Безхребетні
Велика рогата худова	Свиня домашня	Курка	Тиляпія нільська	Східна жаба вогняна	Тихоокеанська устриця
Вівці	Дикі свині	Домашня качка	Червона поргія		
Кози	Коні	Індичка	Короп індійський		
Водяний буйвол	Осел	Голуб	Амур білий		Кука звичайна
Білохвостий олень	Собаки	Шпак			
Благородний олень	Коти	Гуси	Мрігальський короп		Індійська біла креветка
Лань	Койот	Горлиця			
Козуля	Лисиця	Ластівки	Короп звичайний		Європейська плоска устриця
Американський бізон	Кролик	Корели			
Лось	Заєць	Ворони	Африканський гострозубий сом	Домашня муха	
Лама	Єнот	Індійський павич			
Альпака	Щури	Чайки	Кефаль плоскоголова	Гнойовий жук	
Як	Ведмідь	Хвилясті папужки			
	Опосум				
Антилопа	Пума	Придорожній яструб	Європейський ящероголов	Чорна смітникова муха	
	Макаки				
Гірський козел	Тхори	Чаплі великої рогатої худоби		Блакитна/середземноморська мідія	
Козиця звичайна	Миші				

З табл.3.1. можна зауважити про велику кількість тварин, яка перебуває і на теренах України. До того ж, деякі тварини виконують роль домашніх улюбленців. До них відноситься коти, собаки, хвилясті папуги, кролики, домашні свині (міні-піги), іноді щурі та миші. Також, в нашій країні дуже розвинені галузі домашнього господарства та ферми риби/морепродуктів. Тому, більшість зазначених істот можуть мати потенційну загрозу харчових отруєнь штамми STEC.

До позакишкової патогенної *E. coli* (ExPEC) відносяться збудник неонатального менінгіту *E. coli* (NMEC), уропатогенна *E. coli* (UPEC), патогенна *E. coli* для птахів (APEC) і септицемічний *E. coli* (SEPEC). APEC є гетерогенною групою, що походить від ExPEC людини. APEC викликає важкі респіраторні та системні захворювання у різноманітних птахів, що загрожує птахівництву, продовольчій безпеці та добробуту птахів у всьому світі. APEC має багато серотипів, і це широко поширена патогенна бактерія у домашньої птиці. Крім того, штамми ExPEC мають значну генетичну подібність і подібні патогенні механізми, що вказує на те, що APEC потенційно служить резервуаром генів вірулентності та резистентності для ExPEC людини, а гени вірулентності та резистентності можуть передаватися людям через їжу тварин. Подібна тенденція прослідковується й для штамів SEPEC. Через економічні втрати, стійкість до ліків і зоонозний потенціал APEC привернув підвищену увагу. Ідентифіковано різні фактори вірулентності та гени резистентності, що беруть участь у патогенезі APEC та стійкості до ліків [99,100].

Окремий патотип *E. coli* ExPEC, відомий як *E. coli*, що викликає менінгіт новонароджених (NMEC), має здатність виживати в крові та проникати в мозкові оболонки немовлят, викликаючи менінгіт. *E. coli*-асоційований неонатальний менінгіт є однією з найпоширеніших інфекцій, яка зумовлює високі показники смертності та захворюваності (10–30 %) у період новонародженості. Хоча різні набори ознак вірулентності були ідентифіковані в діарейній *E. coli* та інших патоварах ExPEC, чіткі ознаки вірулентності для визначення патотипу NMEC не були виявлені [101].

Інфекція сечовивідних шляхів (ІСШ) є найбільш часто діагностованим урологічним та нирковим захворюванням. Це часто асоціюється із захворюваністю як у госпіталізованих, так і в амбулаторних умовах. У 50–90% усіх неускладнених інфекцій сечовивідних шляхів уропатогенна *E. coli* (UPEC) є найпоширенішим мікроорганізмом. UPEC — це штами *E. coli*, які виходять зі свого комменсального статусу кишкової флори, ростуть і зберігаються в сечовивідних шляхах і виявляють різноманітний набір факторів вірулентності та стратегій, які дозволяють їм інфікувати та спричиняти захворювання сечовивідних шляхів. Найвищий рівень резистентності UPEC спостерігається до ампіциліну і триметоприму/сульфаметоксазолу, що може викликати проблеми у лікуванні ІСШ, які викликані цими збудниками [102,103]. Крім того, вже виявлено штами, які мають стійкість до ципрофлоксацину, фосфоміцину, а також ті, що продукують β-лактамазу розширеного спектру, що виключає використання β-лактамних антибіотиків в цілому [104].

Інфекція сечовивідних шляхів (ІСШ) вражає 50% жінок протягом життя, при цьому основним етіологічним агентом є уропатогенна кишкова паличка (UPEC). На жаль, у багатьох жінок інфекція рецидивує протягом 2–6 місяців і може турбувати їх протягом тривалого періоду життя. Значний тягар ІСШ для окремих пацієнтів і охорони здоров'я в усьому світі спонукав до багаторічних досліджень у цій галузі, щоб розкрити етіологію ІСШ та знайти профілактичні стратегії та методи лікування [105].

Цистит відноситься до інфекції нижніх сечових шляхів, а точніше, сечового міхура. Його можна загалом класифікувати як неускладнений або ускладнений. Неускладнений цистит відноситься до ІСШ у чоловіків або невагітних жінок, які загалом здорові. Гострий цистит зазвичай викликається бактеріальною інфекцією сечового міхура. Ускладнений цистит, з іншого боку, пов'язаний з факторами ризику, які підвищують вірулентність інфекції або потенціал неефективності антибіотикотерапії. Гострий цистит зазвичай викликається бактеріальною інфекцією сечового міхура. Жінки особливо сприйнятливі через близькість прямої

кишки до проходу уретри, а також через відносно коротку довжину уретри у жінок [106].

Кількість випадків, що припадає на гострий цистит, викликаним UPEC, становить від 75% до 95% у жінок. Після кишкової палички за кількістю випадків слідує *Klebsiella*. Інші поширені етіологічні збудники включають види родини *Enterobacteriaceae*, такі як *Proteus mirabilis*, та інші бактерії, такі як *Staphylococcus saprophyticus* і *S. enterococcus*. Інші види бактерій дуже рідко спричиняють ІСШ, до них належать бактерії, такі як стрептококи групи В, *Lactobacillus* та інші коагулазонегативні стафілококи, крім *S. saprophyticus* [106].

Кишкова паличка також є найпоширенішою причиною ускладненого циститу, але спектр мікробних збудників, які можуть викликати ускладнену ІСШ, набагато ширший і включає такі мікроорганізми, як *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, ентерококи, стафілококи та навіть гриби. Частота антимікробної резистентності при ускладнених інфекціях також значно вища. Відомі резистентні організми включають бактерії, що продукують бета-лактамази розширеного спектру дії, як це було зазначено вище, а також резистентні до карбапенемів і фторхінолонів мікроорганізми, зокрема *E. coli* [106].

Тому, можна стверджувати про важливість розробки лікарського засобу, як альтернативу вже існуючим антибіотичним засобам лікування циститу, оскільки поширеність стійкості UPEC щороку стає все більшим, а отже, в найближчому майбутньому відомі препарати перестануть бути ефективними.

Дослідження ринку Data Bridge аналізує, що ринок антимікробних пептидів, до яких відноситься цекропін А, який у 2021 році становив 5 мільярдів доларів США, до 2029 року зросте до 7,85 мільярдів доларів США, і очікується, що CAGR (коефіцієнт річного темпу зростання) становитиме 5,80% протягом прогнозованого періоду з 2022 по 2029 рік. Проте, порівняно з антибіотиками, даний ринок все ще не такий великий. Прогнозується, що світовий ринок антибіотиків зросте з 38,08 мільярда доларів США у 2021 році до 45,30 мільярда доларів США у 2028 році при середньорічному темпі зростання 2,5% у прогнозований період 2021–2028 років. Ця тенденція наганяє лише смуток, оскільки проблема антибіотикорезистентності

вже має високу обговорюваність. Тому, є потреба в альтернативах антибіотиків на основі мікробних пептидів [107,108].

3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу

3.2.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу на основі цекропіну А

Цекропін А пропонується використовувати у складі препаратів проти різних форм циститу. За наявними препаратами проти цього захворювання виробляються гранули та порошки (у вигляді саше) для орального розчину, концентрати для розчину, а також розчини для інфузій, свічки та таблетки [109].

Гранул та порошки дуже розповсюджена тверда форма лікарських засобів, через точність дозування та зручність при зберіганні та транспортуванні, проте вони потребують додаткового розчинення, що не дуже зручно для споживача. Концентрати та розчини для інфузій є дуже ефективними, оскільки працюють локально, а не проходять весь шлунково-кишковий тракт, що дозволяє не використовувати зайвих додаткових речовин, проте вони вводяться внутрішньовенно, що потребує додаткового залучення персоналу і не є дуже зручним для хворого пацієнту. Свічки (супозиторії), також є дуже ефективною формою, проте, в даному випадку, їх треба вводити вагінально, що може призводити до певного дискомфорту людини, спираючись на те, що потрібна відповідна кімната для виконання усіх необхідних маніпуляцій [110-113].

Таблетки є найпоширенішою формою лікарських засобів. Їх виготовляються шляхом подрібнення та пресування діючих речовин у тверду субстанцію з гладким покриттям. Після вживання таблетки потрапляють в шлунок, набухають, після чого розчиняються та всмоктуються в організм. Близько половини лікарських засобів випускають саме у формі таблеток [114].

Переваги [114]:

- 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 [114]:

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

Під час розробки техніко-економічного обґрунтування, було запропоновано виробляти таблетовану форму з поділкою. Це пов'язано з тим, що препарат пропонується виготовляти для лікування як хронічного так і гострого циститу, які передбачають різне дозування. Для хронічного циститу дозування складає по половинці таблетки двічі на день, а для гострого, по 2 таблетки на день. Тому, розробка саме таблеток з поділкою дозволяє не запускати додаткову лінію виробництва препарату з меншим дозуванням для людей, які мають хронічний цистит і тому робить препарат універсальним.

Отже, зважаючи на всі переваги та недоліки та можливість різних лікарських форм, пропонується виготовляти саме таблетки з поділкою, для охоплення більшої аудиторії пацієнтів, які можуть мати проблеми з циститом.



Рис.3.2. Приклад таблетки з поділкою [115]

3.2.2. Обґрунтування вибору первинної і вторинної упаковки лікаського засобу на основі цекропіну А

Тара та упаковка грають важливу роль у фармацевтичній індустрії. Вони забезпечують зручність застосування лікарського засобу, підтримують його якість в процесі транспортування або зберігання [116].

Незалежно від виду упаковки таблеток до її вибору треба підходити з усією відповідальністю. Чи знаєте ви, що необхідно враховувати властивості медикаменту, зовнішні умови, можливість взаємодії між препаратом і матеріалом? Якщо знехтувати зазначеними параметрами, то не виключено зниження якості, втрата сировини і вироблених медикаментів [116].

Розрізняють первинну і вторинну упаковку таблеток. До них пред'являються особливі вимоги, серед яких [116]:

- практичність і зручне використання;
- захищеність від випадкового розтину;
- виключення подробиць;
- захист від дітей;
- забезпечення схоронності препарату протягом терміну придатності.

Вони повинні бути виготовлені тільки з тих матеріалів, які дозволені відповідними стандартами. Обов'язкова умова – інертність сировини. Це необхідно для виключення взаємодії з препаратом [116].

На сьогоднішній день велика частина таблетованих лікарських засобів, що надходять до лікарських установ та в аптечну мережу, упакована в так звані блістери. Блістери – це контурно-чарункове пакування, яке виконане з полімерної плівки або алюмінієвої фольги, і має форму, близьку до форми таблетки. Основна частина капсул і таблеток пакуються тільки таким чином. Блістери найчастіше виготовляють з полімерної плівки, яка, як правило, утворює достатньо жорсткий каркас. Завдяки таким властивостям вона захищена від механічних пошкоджень, потрапляння вологи і забруднень. Матеріали для виготовлення полімерної плівки можуть бути різні: поліпропілен, поліетилен, полівінілхлорид, полівінілденхлорид та ін., що дає простір для прийняття оптимального рішення в залежності від результатів вивчення стабільності лікарського засобу [117].

Але, з як сказано вище, такі вироби несуть величезну небезпеку довкіллю. Справа в тому, що період розпаду поліетиленових пакетів, як уже говорилося, перевищує 100 років, тоді як час використання цього ж пакета становить не більше 30 хвилин. Тому навіть зберігання та транспортування великої кількості відпрацьованого поліетилену потребує підвищеної уваги з точки зору екологічного навантаження [117].

Наразі, дослідники пропонують виробництво основи блістерів з фенолформальдегідної смоли, оскільки вона є більш екологічною та міцною альтернативою нинішнім полімерам. Проте. Потрібні додаткові дослідження щодо властивостей цього матеріалу та впливу на лікарські засоби, як контактуючої речовини. Світова фармацевтична промисловість наразі використовує поліетилен терефталат як блістерну основу, оскільки цей полімер піддається переробці, а також пропонує переходити на ще більш екологічну паперову упаковку. Проте варто зазначити, що паперова упаковка має декілька шарів, і контактуючим є саме шар полімеру, для зменшення газопроникності. Тому, пропонується зупини свій вибір саме на поліетилен терефталаті через те, що він може бути перероблений та через те, що він масово використовується в фармацевтичній промисловості. Іншою – накривною частиною блістеру – виступає фольга [117,118].

Попередньо було визначено кількість таблеток, яка припадає на 1 людину за курс лікування. При хронічному циститі ця кількість складає 9 таблеток, при гострому – 10. Тому, є логічним виготовлення таблеток саме у блістері по 10 штук.



Рис.3.3. Зображення первинної упаковки лікарського препарату на основі цекропіну А [119]

Вторинна упаковка лікарських засобів – це зовнішня тара. Вона поділяється на кілька категорій. Серед них [120]:

- Коробки з картону. Вони використовуються для продажу таблеток, ампул, спреїв, флаконів. Така тара екологічна і економічна, її легко утилізувати.
- Полімерна упаковка. Вона зручна 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 [120].

Враховуючи первинну упаковку, логічно для запропонованого препарату використовувати картонну коробку, яка є практичною та екологічною.

Отже, пропонується виготовляти таблетки у блістері з поліетилен терефталату та фольги з вторинною упаковкою у вигляді картонної коробки.

3.3. Вибір біологічного агенту для синтезу цекропіну

Аналізуючи всю вищезазначену літературу можна впевнитись про поширеність цекропіну типу А. Тому, пропонується розглянути різноманітних продуцентів саме цього антимікробного пептиду.

Наприклад, передбачається можливість промислового культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21 (DE3). Для такого рішення застосовуються більш поживне середовище, ще й в подвійній дозі. Назва середовища – YT. Зазвичай, при лабораторному культивуванні використовується середовище LB доволі простого компонентного складу, проте для промислових умов воно є не

підходящим [12].

В іншій роботі створили конструкцію з саморегулюючим білком для *E. coli* BL21 (DE3). Технологія передбачає приєднання β -структурованого самоагрегуючого білку ELK16, що створює ефективне виробництво високочистого антибактеріального пептиду цекропіну А за допомогою простого недорогого процесу [48].

Також, пропонується в порівняння додати й дріжджову систему, таку як *P. pastoris* GS115. За літературними даними цей біологічний агент синтезує близько 48 мг/л цекропіну А, а вихід очищеного становить при цьому 21 мг/л. Дріжджі відрізняються від бактерійних систем. Щонайменше, технологічно передбачено внесення інших індукторів, такі як казамінові кислоти та метанол [59].

Таблиця 3.2

Порівняння різних продуцентів цекропіну А

Біологічний агент	Склад поживного середовища, г/л	Режим культивування	Концентрація пептиду, мг/л	Література
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) CeA-Mxe-ELK16	Триптон – 10 Дріжджовий екстракт – 5 NaCl - 5 Канаміцин – 0,05 IPTG – 0,24	29 год $\tau_1 = 37^\circ\text{C}$ $\tau_2 = 16^\circ\text{C}$	0,93*	[48]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) трансформований <i>pSUMO-nABP-dHC-secropin A</i>	Дріжджовий екстракт - 10, Триптон - 10, Глюкоза - 10, K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O - 4, Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O - 7, [NH ₄] ₂ SO ₄ – 1,2, KH ₂ PO ₄ – 2, Розчин мікроелементів: MnSO ₄ ·5H ₂ O - 0,001, CaCl ₂ ·6H ₂ O - 0,004, Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O - 0,002, ZnCl ₂ - 0,002, CuSO ₄ ·5H ₂ O - 0,002, H ₃ BO ₄ - 0,0005, FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,02, CaCl ₂ ·2H ₂ O - 0,02 MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,3 Ампіцилін – 0,1 IPTG – 0,24	7 год pH 7 37 °C $n_1 = 300 \text{ об/хв}$ $n_2 = 800 \text{ об/хв}$	287,9*	[12]

<i>P. pastoris</i> GS115 трансформований <i>pPICZαA-ABP- dHC-cescropin</i> A	Дріжджовий екстракт – 10 Пептон - 20, YNB – 13,4, Метанол – 5 (+15 для індукції), Біотин – 0,4 Казамінові кислоти - 20	116 год 20 °С	21*	[59]
---	---	------------------	-----	------

Примітка*: мається на увазі вже очищеного пептиду

Отже, з таблиці 3.2 видно, що найвища концентрація очищеного пептиду присутня саме у *E. coli* BL21 (DE3) трансформованої *pSUMO-nABP-dHC-cescropin* A. Проте, варто зазначити, що середовища для одержання є абсолютно різними, що по кількості, що по складу, тому остаточно вирішити який саме біологічний агент варто обрати – не можна. Тому, пропонується поррахувати вартість 1 л середовища і після цього робити узагальнені дані, за якими можна зробити доречний вибір продуцента.

Таблиця 3.3

Розрахунок та порівняння вартості поживних середовищ для культивування біологічних агентів

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) CeA-Mxe-ELK16	Триптон – 10	570	5,7	1
	Дріжджовий екстракт – 5	1100	5,5	2
	NaCl – 5	12	0,06	3
	Канаміцин – 0,05	80000	4	4
	IPTG – 0,24	5531	1,33	5
Вартість 1 л поживного середовища ≈ 16,6 грн				
<i>P. pastoris</i> GS115 трансформований <i>pPICZαA-ABP-dHC-cescropin</i> A	Дріжджовий екстракт – 10	1100	1,1	2
	Пептон - 20	570	11,4	1
	YNB – 13,4	14529	194,69	21
	Метанол – 20	60	1,2	22
	Біотин – 0,4	6 352	2,54	23
	Казамінові кислоти - 20	3900	78	24
Вартість 1 л поживного середовища ≈ 288,9 грн				

<i>E. coli</i> BL21 (DE3) трансформований <i>pSUMO-nABP-dHC-ccropin A</i>	Дріжджовий екстракт - 10	1100	11	2
	Триптон - 10	570	5,7	1
	Глюкоза - 10	50	0,5	6
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O - 4	146	0,58	7
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O - 7	50	0,35	8
	[NH ₄] ₂ SO ₄ – 1,2	28	0,04	9
	KH ₂ PO ₄ – 2	85	0,17	10
	MnSO ₄ ·5H ₂ O - 0,001	30	0,00003	11
	CaCl ₂ ·6H ₂ O - 0,004	22	0,00009	12
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O - 0,002	1160	0,002	13
	ZnCl ₂ - 0,002	82	0,0002	14
	CuSO ₄ ·5H ₂ O - 0,002	120	0,0003	15
	H ₃ BO ₄ - 0,0005	80	0,00004	16
	FeSO ₄ ·7H ₂ O - 0,02	19	0,0004	17
	CaCl ₂ ·2H ₂ O - 0,02	25	0,0005	18
	MgSO ₄ ·7H ₂ O - 0,3	20	0,006	19
	Ампіцилін – 0,1	64634	6,5	20
	IPTG – 0,24	5531	1,33	5
	Вартість 1 л поживного середовища ≈ 26,2 грн			

Примітка (ціни наведено станом на грудень 2023 року): 1 - <https://prom.ua/p505591948-pepton-fermentativnyj.html>, 2 - <https://prom.ua/ua/p1086437845-ekstrakt-drozhzhej.html>, 3 - <https://prom.ua/ua/p1710101472-pischevaya-povarennaya-sol.html?&primelead=MC45MDk5OTk5Nw>, 4 - <https://us.vwr.com/store/product/7422506/kanamycin-sulfate-usp>, 5 - <https://melsonmedical.en.made-in-china.com/product/SCDXpaYrYZWR/China-Iptg-Isopropyl-Beta-D-Thiogalatosyranoside-Reagents.html>, 6 - <https://prom.ua/p183020259-glyukoza-dekstroza-pischevaya.html>, 7 - <https://prom.ua/p1129763817-digidroortofosfat-kaliya-meshok.html?&primelead=MC45MDk5OTk5Nw>, 8 - <https://prom.ua/p1686219244-natrij-fosfornokislyj-zamesch.html>, 9 - <https://prom.ua/p1420740705-sulfat-amoniya-1kg.html>, 10 - <https://prom.ua/p1267047719-ortofosfat-kaliya.html?&primelead=M14zNA>, 11 - <https://marganec.prom.ua/p663698888-sulfat-margantsa-meshki.html>, 12 - <https://marganec.prom.ua/p1708621726-hlorid-kaltsiyu.html>, 13 - <https://marganec.prom.ua/p1134038532-molibdenovokislyj-natrij-molibdat.html?&primelead=M14wOA>, 14 - <https://marganec.prom.ua/p1704514791-tsink-hloristij-hlorid.html>, 15 - <https://prom.ua/p909070501-sulfat-midi-optovimi.html>, 16 - <https://prom.ua/p1037586064-ortobornaya-bornaya-kislota.html?&primelead=M14wOA>, 17 - <https://prom.ua/p818430561-sulfat-zheleza-kuporos.html?&primelead=MC44>, 18 - <https://prom.ua/p1541280195-kaltsij-hloristyj-hlorid.html?&primelead=MS40>, 19 - <https://prom.ua/p1629836398-sulfat-magniya-vodnyj.html?&primelead=M14wOA>, 20 - <https://www.rpicorp.com/products/antibiotics/antibiotics-a-b/ampicillin-sodium-salt-1-kg.html>, 21 - <https://www.biomall.in/product/yeast-nitrogen-base-g096-100g-g096-100g>, 22 - <https://prom.ua/p1669821699-metanol-metilovyj-spirt.html?&primelead=Mw>, 23 - <https://xn----utbcjbgv0e.com.ua/biotin-vitamin-b7-1-kg.html>, 24 - http://agar.com.ua/Additives_for_microbiology_ru/Casein_hydrolyzate_250

Найвища ціна виявилась у дріжджів *P. pastoris* GS115, а найдешевша - *E. coli* BL21 (DE3) CeA–Mxe–ELK16. Проте таке порівняння знову ж таки не дає повноцінної можливості зробити вибір до певного штаму. Тому, прорахуємо умовну вартість протеїну кожного штаму.

Порівняння біологічних агентів за економічно важливими показниками

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн	Концентрація протеїну, мг/л	Умовна вартість 1 мг білку, грн/мг	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного АМП за годину, мг/год
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) CeA-Mxe-ELK16	16,6	0,93	17,85	29	0,032
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) трансформований <i>pSUMO-nABP-dHC-cecropin A</i>	26,2	287,9	0,09	7	41,13
<i>P. pastoris</i> GS115 трансформований <i>pPICZαA-ABP-dHC-cecropin A</i>	288,9	21	13,76	116	0,18

За кінцевим порівнянням робимо вибір щодо *E. coli* BL21 (DE3) трансформованого *pSUMO-nABP-dHC-cecropin A*. Даний рекомбінантний штам синтезує найбільшу кількість цекропіну А за найменший час. Також, умовна вартість очищеного продукту є набагато нижчою, порівняно з іншими штамми.

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

Для початку, пропонується проаналізувати ринок антибіотичних препаратів, які використовують для лікування циститу. Такий аналіз показано в табл.3.5.

Таблиця 3.5.

Антибіотичні препарати, які використовуються для лікування циститу

Назва	Виробник	Діюча речовина	Вартість, грн	Курс лікування	Джерело
Ципрофлоксацин таблетки, в/о по 500 мг №10	ПрАТ «Технолог», Україна	Ципрофлоксацин	від 60,38 до 120,00 грн за 10 таблеток	3-7 днів від 250 мг двічі на добу до 500 мг двічі на добу	[121]

Закінчення табл.3.5

Фурадонін таблетки по 100 мг №20 (10x2)	АТ «Олайнфарм», Латвія	Нітрофурантоїн	від 58,10 до 135,00 грн за 20 таблеток	добова доза – 600 мг	[122]
Нітроксолін таблетки, в/плів. обол. по 50 мг №50 (10x5)	ПАТ «Науково- виробничий центр «Борщагівський хіміко- фармацевтичний завод», Україна	Нітроксолін	від 55,12 до 91,30 грн за 59 таблеток	середня рекомендована добова доза становить 400 мг. При тяжких захворюваннях - збільшити до 800 мг	[123]
Левовфлоксацин- Тева таблетки, в/плів. обол. по 500 мг №10 (5x2)	Активіс ЛТД., Мальта	Левовфлоксацин	від 153,30 до 215,05 грн за 10 таблеток	500 мг 1 раз на добу протягом 7-14 діб	[124]
Тайгерон таблетки, в/о по 750 мг №5.	Kusum Pharm, Україна	Левовфлоксацин	від 127,01 до 241,00 грн за 5 таблеток	500 мг 1 раз на добу протягом 7-14 діб	[125]
Норфлоксацин- Здоров'я таблетки, в/плів. обол. по 400 мг №10	ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна	Норфлоксацин	від 92,18 до 155,00 грн за 10 таблеток	1 таблетка 2 рази на добу від 3 діб до 2 тижднів	[126]
Фосфоміцин гранули д/ор. р- ну по 3 г №1 у саше	ТОВ «АСТРА- ФАРМ», Україна.	Фосфоміцин	від 144,35 до 328,00 грн за 1 саше	1 саше на день протягом періоду, приписаним лікарем	[127]
Монурал гранули д/ор. р- ну по 3 г №1 у пак.	Замбон Світцерланд Лтд., Швейцарія		від 299,53 до 503,80 грн за 1 саше		[128]

Отже, з табл.3.5. видно, що в Україні є купа препаратів для лікування різних форм циститів. Але більша частина діючих речовин вже не така дієва, оскільки штами UPEC встигли розвинути до них стійкість, як це було зазначено вище.

Отже, маємо підставу на розробку антибактеріального препарату для лікування циститу за допомогою цекропіну А. Тепер, пропонується ознайомитись

з аналізом виробників, які продують комерційний рекомбінантний цекропін А. Дані показано в табл.3.6.

Таблиця 3.6

Виробники рекомбінантного цекропіну А

Виробник	Вартість	Чистота	Джерело
ТОКУ-Е, США	313,50 \$ за 1 мг	-	[129]
SB-PEPTIDE, Франція	134 \$ за 1 мг	> 95%	[94]
AnaSpec Inc., США	347 \$ за 1 мг	> 95%	[130]
Merck KGaA, Німеччина	219 € за 0,1 мг	≥97%	[131]
MedChemExpress, США	150 \$ за 1 мг	99,50%	[132]
Китай	65¥ за 1 кг	> 95%	[133]

Отже, в світі існує невелика кількість компаній, більшість з яких зосереджена в Америці. До того ж, вартість очищеного препарату ну дуже велика. Тому, є підстава створення українського виробництва мікробного пептиду. Раніше нами було запропоновано культивування рекомбінантного штаму *E. coli* BL21 (DE3), трансформованого плазмідом *pSUMO-nABP-dHC-secropin A*, який синтезує білок з концентрацією після очистки 287,9 мг/л. При чому, умовна вартість 1 мг становила 0,09 грн, що набагато вигідніше за готові субстанції.

За статистикою, найчастіше трапляється гострий неспецифічний інфекційний цистит. Поширеність Україною на 100 тис. населення: гострий – 314 хворих; хронічний – 135 хворих. Як правило, цистит діагностують переважно у жінок репродуктивного віку (20–50 років). У 95% випадків дане захворювання викликано *E. coli* [7]. Спираючись на ці дані, будемо виконувати розробку препарату на основу цекропіну.

У 2023 році населення України складає близько 36,7 мільйона осіб [134]. Тоді, кількість випадків гострого циститу становить:

$$\frac{314 \times 36\,700\,000}{100\,000} = 115\,238 \text{ випадків}$$

А кількість хронічного циститу складає:

$$\frac{135 \times 36\,700\,000}{100\,000} = 49\,545 \text{ випадків}$$

З цих випадків 95% припадає на зараження UPEC. Тоді, кількість випадків гострого циститу становить:

$$115\,238 \times 0,95 = 109\,476 \text{ випадків}$$

А кількість хронічного циститу складає:

$$49\,545 \times 0,95 = 47\,068 \text{ випадків}$$

Для розробки препарату пропонується опиратися на об'єм антибіотику ципрофлоксацину, оскільки він має широкий спектр використання у клінічній практиці [121], а також через те, що UPEC по більшій частині вже мають стійкість до нього [135]. Мінімальна інгібуюча активність щодо UPEC ципрофлоксацином наразі складає 128 мкг/мл. В той час, цекропін А має МІК – 31,25 мкг/мл [12]. Отже, можемо прорахувати приблизну кількість цекропіну А в 1 таблетці. Для лікування ципрофлоксацином використовується курс 250 мг двічі на добу (для хронічного циститу) та 500 мг двічі на добу (для гострого циститу). Зазвичай виготовляють таблетки по 500 мг з поділкою [122]. Отже, складаємо пропорцію:

$$\begin{array}{l} 128 \text{ мкг/мл} - 500 \text{ мг} \\ 31,25 \text{ мкг/мл} - x \\ x = \frac{31,25 \times 500}{128} = 122 \text{ мг} \end{array}$$

Отже, в 1 таблетці має міститись 122 мг цекропіну А. Гострі форми циститу тривають від 4 до 7 діб (в середньому 5 діб) [136]. Як правило, поліпшення спостерігається вже з 3-5 дня. А хронічний лікується – 1 – 1,5 тижні (в середньому 9 діб) [137]. Тоді, враховуючи що на курс для гострого циститу припадає 122 мг двічі на добу, кількість таблеток, яка необхідна на 1 курс лікування становить:

$$5 \times 2 = 10 \text{ шт.}$$

Для лікування хронічного циститу використовують 1 таблетку поділену навпіл протягом 9 діб. Тоді, кількість таблеток становить:

$$9 \times 1 = 9 \text{ шт.}$$

З цих розрахунків можна зробити висновок, що логічно виготовляти лікарські засоби по 10 таблеток в 1 блістері. Отже, знаючи кількість таблеток на 1

людину при кожному захворюванні, можемо вирахувати річну потребу таблеток для гострого циститу:

$$10 \times 109\,476 = 1\,094\,760 \text{ шт.}$$

А для хронічного циститу:

$$9 \times 47\,068 = 423\,612 \text{ шт.}$$

Загальна кількість таблеток становить:

$$1\,094\,760 + 423\,612 = 1\,518\,372 \text{ шт.}$$

Оскільки запропоновано виробляти по 10 таблеток в блістері, кількість таблеток було округлено до кратної до 10 кількості. Знаючи кількість таблеток, можна вирахувати кількість цекропіну А:

$$1\,518\,372 \times 122 = 185\,241\,384 \text{ мг} \approx 185 \text{ кг}$$

Враховуючи те, що на ринку вже є велика кількість препаратів для лікування циститу, пропонується забезпечувати близько 10%. Тоді, кількість цекропіну А, необхідна на річне виробництво препарату для лікування циститу становить:

$$185 \times 0,1 = 18,5 \text{ кг}$$

В табл.3.7. показано перерахунок необхідної кількості таблеток на ту кількість людей, яку будемо забезпечувати.

Таблиця 3.7.

Потреба в препараті на основі цекропіну, яку будемо забезпечувати

Тип циститу	Кількість випадків	Курс лікування	Кількість білку в таблетці	Кількість таблеток на групу
Гострий	10 947	5 діб по 2 таблетки на добу	122 мг	109 476 шт.
Хронічний	4 707	9 діб по половинці таблетки двічі на добу		42 363 шт.
			Всього	≈151 840 шт.

Культивування *E. coli* BL21 (DE3), трансформованого плазмідом *pSUMO-nABP-dHC-csecropin A*, призводить до 287,9 мг/л очищеного білку. В статті не вказано початкову концентрацію до очистки, тому вираховуємо кількість культуральної рідини з врахуванням того, що під час виділення та очистки

відбуватимуться втрати. Кількість культуральної рідини на рік для виробництва цекропіну А становить:

$$\frac{18\,500}{287,9} = 64,3 \text{ м}^3$$

Приймаємо, що для отримання 64,3 м³ культуральної рідини необхідно 300 робочих трудоднів (Т_{рд}). Відповідно кількість культуральної рідини на добу (V_д) становитиме:

$$V_{\text{д}} = V_{\text{кр}} / T_{\text{рд}} = 64,3 / 300 \approx 215 \text{ л}$$

Розрахуємо кількість культуральної рідини за один цикл, (V_{крц}):

$$V_{\text{крц}} = K_1 \cdot V_{\text{д}} \cdot T_{\text{цф}} / 24 = 1,1 \cdot 215 \cdot 14 / 24 \approx 138 \text{ л},$$

де T_{цф} - цикл роботи ферментера, який включає: мийку та огляд – 1,5 год, перевірку на герметичність – 0,5 год, підігрів та стерилізацію апарату – 1,5 год, охолодження ферментеру – 1 год, завантаження поживного середовища – 1,5 год, засів культурою – 0,5 год, ферментацію – 7 год, та вивантаження – 0,5 год, і становить 14 години. K₁ – коефіцієнт запасу, що враховує можливість нестерильних операцій (K₁ = 1,1).

РОЗДІЛ 4

ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ

Для того, щоб визначити відповідні стадії виділення та очищення продукту необхідно спиратися на його певні особливості. Цекропін А – це рекомбінантний білок, який є ендометаболітом [12], а отже знаходиться всередині біомаси. Отже, першим етапом варто виділити саме відокремлення біомаси від супернатанту.

Після того, як біомаса буде відокремлена, необхідно зруйнувати клітину для вивільнення білку, при цьому варто враховувати, що це сконструйована структура, а тому потребує акуратності та вивіренних методик щодо цього білку. Руйнування клітин може відбуватись у кілька стадій для більшої очистки протеїну. Для рекомбінантних штамів кишкової палички нерідко в комбінації використовують фізичні та ензиматичні методики лізису. Це пов'язано з тим, що ферменти руйнують клітину, але перетворюючи її у слизьку масу, яка заважає переходити цільовому білку в розчинну форму. Тому, після ензиматичного лізису нерідко використовується додаткове руйнування у ультразвуковому дезинтеграторі, що зріджує біологічно-активний зразок та дозволяє білку повноцінно вивільнитися з клітини [12,138,139]. Тому, наступний етап варто визначити як комбінований лізис.

Після вивільнення рекомбінантного білку нерідко його стабілізують та обробляють додатковими розчинами для збільшення ступеня очистки. Це пов'язано з тим, що крім самого рекомбінантного білку виділяються й інші метаболіти, що знаходяться всередині клітини, тому використання додаткових розчинів є доволі логічним наступним кроком [140,141].

Зазвичай, наступним кроком для виділення та очищення рекомбінантних білків йде афінна хроматографія [12,140,141], проте, це дуже дорогий та довготривалий процес, який навряд чи можливо реалізувати для габаритного виробництва білку. Тому, варто розглядати такі технології, які уникають цієї

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Собченко С.А.</i>			РОЗДІЛ 4 ОБҐРУНТУВАННЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Воронцов О.О.</i>					61	115
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

стадії. Є варіант закінчення стадії виділення та очистки цекропіну за допомогою розчинення білку з фосфатним буфером та подальшим його центрифугуванням. На цьому етапі від розчинного білку цекропіну відокремлюються всі інші білкові структури, які потім відокремлюють центрифугуванням [142]. При цьому, одержується розчин очищеного білку, що дозволяє здешевити технологію його одержання, оминувши афінну хроматографію.

Цекропін пропонується виготовляти в таблетках, а тому наступною стадією варто передбачити його сушіння з подальшим подрібненням та просіюванням одержаного порошку.

Отже, спираючись на вищенаведені тези, маємо наступні стадії виділення та очищення цекропіну:

- Відокремлення біомаси від супернатанту;
- Руїнування клітини з метою вивільнення білкового ендометаболіту
- Очищення та стабілізація білку додатковими розчинами;
- Розчинення цекропіну та відокремлення нерозчинного білку;
- Сушіння готового продукту.

4.1. Обґрунтування методу відокремлення біомаси від супернатанту

Відокремлення біомаси від рідини передбачає низку методик, які використовуються в залежності від поставлених задач. До них відносяться [143]:

- відстоювання - розділення під дією гравітаційних сил (при очищенні стічних вод);
- фільтрація – пропускання суспензії крізь фільтруючий матеріал, на якому затримуються частки твердої фази – біомаса (виробництво антибіотиків);
- сепарація, центрифугування – розподіл під дією центробіжних сил (виробництво кормової біомаси – дріжджів, бактерій).
- мікрофільтрація, ультрафільтрація – пропускання суспензії крізь мембрани з малим діаметром пор, котрі забезпечують утримання клітин мікроорганізмів; ультрафільтрація забезпечує затримання крупних молекул розчинних речовин;

– коагуляція – додавання до суспензії реагентів, які допомагають осадженню більш крупних клітинних агломератів і відділенню їх із рідини шляхом відстоювання;

– флотація – захоплення біомаси мікроорганізмів кульками піни і виділення їх із пінної фракції.

Варто передбачити усі можливі негативні сторони кожного методу. Все, що стосується методів фільтрування, непогано підходить для методик, коли цільовий продукт знаходиться в супернатанті. Це пояснюється тим, що тверда фаза та великі за медулярною масою (у випадку мікро- та ультрафільтрації) залишаються на фільтрувальному матеріалі, проте коли основна ціль – одержати біомасу, ці методи є далеко не найкращими, оскільки передбачають велику кількість втрат та постійне забивання фільтрів, які треба буде або регенерувати або повністю замінювати [18,19]. Тому, методики фільтрації не варто розглядати для технології одержання цекропіну.

Коагуляція, флотація та відстоювання – також гарні методики, але потребують тривалого часу відокремлення біомаси [143,144]. Це збільшує час одержання білку, а тому збільшує кінцеву вартість продукції, що є негативним ефектом для виробництва та буде відштовхувати потенційних споживачів від покупки лікарського засобу, навіть якщо лікар призначить саме його, що за собою тягне погіршення проблеми антибіотикорезистентності, оскільки саме антибіотичні препарати, як це було визначено раніше, є аналогами та прямими конкурентами лікарського засобу на основі цекропіну А.

Тоді, залишається зробити вибір між сепарацією та центрифугуванням, оскільки методики побудовані на одному принципі – відокремленні твердої фази від рідкої за допомогою центробіжних сил. Наразі сепаратори широко використовуються у молочній індустрії, проте їх також іноді використовують для відокремлення біомаси кишкової палички. Але, їх основним недоліком є швидка забиваємість мундштуків і міжтарільчатого простору механічними включеннями та мертвими клітинами. Щодо центрифуг, наразі вони набули більшого поширення в біотехнологічних процесах відокремлення твердої та рідкої фази і все більше

використовуються при культивування рекомбінантних білків за допомогою *E. coli*. До основних недоліків такого типу обладнання відносять можливість механічного пошкодження клітин [143,144]. Проте, нас цікавить не жива клітина, а метаболіт, який знаходиться в її середині, оскільки після центрифугування передбачається етап руйнування клітин *E. coli*. Також, з особливостей нашого цільового метаболіту відомо, що його молекулярна маса коливається в розмірах 34,9 кДа, що відноситься до середнього розміру білків, що може казати про те, що йому не так то й легко вивільнитись у позаклітинний простір через механічне пошкодження клітини. Також, зазвичай при використанні центрифуги враховується можливе пошкодження клітин, а тому обирають знижену швидкість ротору для уникнення цього негативного ефекту [12, 140-142]. Тому, пропонується залишити свій вибір саме на центрифугуванні, оскільки це є сучасним рішенням для етапу відокремлення біомаси від супернатанту.

З врахуванням об'єму культуральної рідини, яка надходить на цю стадію, варто передбачити центрифугу саме проточного типу, що дозволяє заощадити час на відокремлення біомаси від надосаду. З недоліків, біомасу необхідно переносити вручну, проте якщо розглядати інші центрифуги, вони передбачають не лише ручне вивантаження біомаси, а й ручне завантаження культуральної рідини, а також можуть мати обмеження по об'єму центрифугованої культуральної рідини. За допомогою проточної центрифуги можна одразу передавати супернатант на утилізацію, при цьому не застосовуючи допомогою додаткового обладнання чи персоналу [145]. Тому, залишаємо вибір саме на проточній центрифугі.

З врахуванням об'єму, який надходить на цю стадію, що складає 138 л, було обрано проточну центрифугу GQ75. Її продуктивність складає від 10 до 600 л/годину, а максимальна швидкість ротора складає 15200 об/хв [146]. Для відокремлення біомаси рекомбінантної *E. coli* близько 8000 об/хв, а продуктивність – 200 л/год [142], що повністю задовольняє наші потреби.



Рис.4.1. Приклад проточної центрифуги GQ75 [146]

4.2. Обґрунтування методів руйнування клітини

Методи руйнування клітин загалом можна класифікувати на дві основні категорії: механічні та немеханічні методи [147].

Механічні методи включають застосування фізичної сили для розриву клітинної стінки. Ці методи можна далі класифікувати на методи твердого зсуву та методи рідкого зсуву. Методи твердого зсуву передбачають піддавання клітин інтенсивним механічним зусиллям, таким як подрібнення або збивання кульок, для розриву клітинної стінки та вивільнення внутрішньоклітинної рідини. З іншого боку, методи рідинного зсуву використовують гомогенізацію під високим тиском або ультразвукову обробку для руйнування клітин і звільнення внутрішньоклітинного вмісту [147].

Немеханічні методи, як випливає з назви, не покладаються на фізичну силу для руйнування клітинної стінки. Замість цього вони використовують альтернативні засоби для досягнення руйнування клітин. Немеханічні методи можна розділити на фізичні методи, хімічні методи та ферментативні методи [147].

Фізичні методи включають вплив на клітини екстремальних температур (термічний шок), високочастотних звукових хвиль (ультразвукова обробка) або електричних імпульсів (електропорація), щоб порушити клітинну стінку та вивільнити внутрішньоклітинну рідину. У хімічних методах використовуються різні хімічні агенти, такі як детергенти або органічні розчинники, для розчинення або руйнування клітинної стінки та вивільнення внутрішньоклітинного вмісту. Ферментативні методи використовують специфічні ферменти, які можуть

руйнувати або руйнувати компоненти клітинної стінки, сприяючи руйнуванню клітин і екстракції внутрішньоклітинної рідини [147].

Вибір методу руйнування клітин залежить від таких факторів, як тип цільових клітин, бажаний результат і подальше застосування внутрішньоклітинної рідини. Важливо вибрати відповідний метод, який ефективно руйнує клітинну стінку, одночасно забезпечуючи мінімальне пошкодження внутрішньоклітинних компонентів, що в кінцевому підсумку дає бажаний продукт у його активному та функціональному стані [147].

Як вже раніше було зазначено, для рекомбінантних білків, а особливо для цекропінів, використовують комбінований метод, зазвичай з використанням лізоциму (ферментативний метод) та подальшим руйнуванням у ультразвуковому дезинтеграторі (механічний метод) [147].

Для лізису клітин використовуються різні ферменти, такі як целюлаза, лізоцим і протеази. Ці ферменти можуть вибірково руйнувати клітинні стінки або мембрани клітин-мішеней. Лізис на основі літичних ферментів зазвичай використовується в невеликих масштабах через такі фактори, як доступність і вартість ферменту. Вибір ферменту залежить від типу клітинної стінки або мембрани, на яку націлено. Наприклад, лізоцим зазвичай використовується для перетравлення клітинної стінки грампозитивних бактерій шляхом гідролізу β -1-4-глюкозидних зв'язків у пептидоглікані, але нерідко може бути використаним і для грамнегативних бактерій. Дріжджі та гриби мають чіткі клітинні стінки, і для їх деградації використовуються такі ферменти, як зимоліаза, яка містить β -1,3-глюканазу та β -1,3-глюкан ламінаріпентаогідролазу. Крім того, целюлази, пектинази, ксиланази, хітинази, бета (1-6) і бета (1-3) гліканази, протеази та маннази зазвичай використовуються для руйнування клітинних стінок дріжджів, грибів та інших мікробів. Але оскільки в технології передбачається буфер для лізису, додаткове застосування ферментів є недоцільним [147].

Як було зазначено раніше, при ферментативному лізісі передбачається буфер для ресуспендування та лізису. Це робиться для кращого зрідшення клітин

та подальшого вивільнення білка в надосадову рідину. Обґрунтування буферу для лізису показано в п.4.3. (див. нижче).

Ультразвукове руйнування, також відоме як ультразвук або ультразвукова обробка, пропонує кілька переваг, які роблять його цінним методом у різних застосуваннях. Ось деякі ключові переваги ультразвукового руйнування [147]:

1. Швидке та ефективне руйнування: Ультразвукове руйнування дозволяє швидко та ефективно руйнувати клітини або зразки. Високочастотні звукові хвилі створюють інтенсивні механічні сили через кавітацію, що призводить до руйнування клітинних стінок або мембран і вивільнення внутрішньоклітинних компонентів. Цей ефективний процес руйнування економить час і забезпечує високу продуктивність обробки зразків.
2. Гнучкість: Ультразвукове руйнування — це універсальний метод, який можна застосовувати до широкого спектру зразків і матеріалів. Він ефективний для руйнування мікробних клітин, включаючи бактерії та дріжджі, а також клітин тварин і рослин. Крім того, його можна використовувати для руйнування різних типів зразків, таких як тканини, клітини, наночастинки, емульсії та суспензії.
3. Збереження цілісності зразка: Ультразвукове руйнування – це нетепловий метод, що означає, що він не покладається на надмірне тепло для руйнування клітин. Ця нетеплова природа допомагає зберегти цілісність чутливих до тепла компонентів, таких як ферменти, білки та ніжні клітинні структури. У результаті ультразвукове руйнування дозволяє витягувати біологічно активні сполуки або делікатні внутрішньоклітинні компоненти в їхній нативній та активній формах.
4. Сумісність з іншими техніками: Ультразвукове руйнування часто використовується в поєднанні з іншими методами, такими як хімічні процеси або наступні аналітичні методи. Він може підвищити ефективність хімічного лізису, забезпечуючи механічну енергію, що призводить до покращення ефективності екстракції. Крім того, ультразвукове руйнування готує зразки для наступних методів аналізу,

включаючи екстракцію ДНК, аналіз білка, хроматографію або мас-спектрометрія.

5. Простота використання та масштабованість: Ультразвукові руйнівники відносно прості у використанні та потребують мінімального налаштування. Ними можна керувати за допомогою зручних інтерфейсів і пропонують налаштування частоти, потужності та тривалості. Крім того, ультразвукове руйнування можна збільшити для більших обсягів або виробничих процесів, що робить його придатним як для лабораторних експериментів, так і для промислового застосування.
6. Економічна ефективність: Ультразвукові руйнівники, як правило, є економічно ефективними порівняно з деякими іншими методами руйнування. Вони вимагають відносно простого обладнання та мають менші витрати на обслуговування. Крім того, висока ефективність і короткий час обробки ультразвукового руйнування сприяють економії витрат на робочу силу, енергоспоживання та загальні експлуатаційні витрати.

Ультразвукове руйнування часто використовується в поєднанні з хімічними процесами, зокрема лізисом, для підготовки зразків. Ультразвукове руйнування може підвищити ефективність хімічного лізису, надаючи додаткову механічну енергію, щоб допомогти в руйнуванні та вивільненні клітинних компонентів. Поєднання ультразвукового руйнування з хімічним лізисом може призвести до підвищення ефективності вилучення та виходу [147].

Недоліком ультразвукової технології є її потенційний негативний вплив на здоров'я людини через наявність постійного шуму. Щоб мінімізувати ці ризики, необхідно вжити відповідних заходів, таких як засоби індивідуального захисту (ЗІЗ) і стратегії зменшення шуму [147].



Рис.4.2. Приклад промислової ультразвукової установки від Hielscher [148]

Наразі існують промислові ультразвукові установки, які конструюються таким чином, щоб мінізувати кількість шуму, а також, які можуть ефективно зріджувати промислові серії різних речовин та суспензій. Пропонується обрати промислову ультразвукову установку від компанії Hielscher. Продуктивність апарату складає 250 л/год, з врахуванням того, що на стадію надійде близько 14,3 л лізованої суспензії [148].

Після хімічного та механічного лізису клітини, білки переходять в розчинну форму, а тому потребують відокремлення. Спираючись на п.4.1. пропонується залишити метод центрифугування через його переваги. Але, враховуючи, що об'єм (14,3 л) вже дозволяє використовувати менші центрифуги, пропонується обрати центрифугу вертикального типу. Для наших цілей підійде центрифуга CFE-350 (заповнення до 30 л) з об'ємом заповнення 60 л. Максимальна швидкість ротора складає 10000 об/хв, що повністю задовольняє наші потреби [149].



Рис.4.3. Приклад центрифуги CFE-350 [149].

4.3. Обґрунтування додаткових розчинів для очистки та стабілізації білку

Використання розчину з високою концентрацією солі має вирішальне значення для забезпечення високої чистоти отриманого білкового продукту. Високий вміст солі зменшує неспецифічний зв'язок між цікавим білком і домішками, перериваючи електростатичну взаємодію між ними. Розчинні білки, як правило, краще витримують умови з високим вмістом солі. Явище під назвою «висолювання» може спричинити агрегацію нерозчинних білків і випадання в осад із розчину через заряд іонів солі. Прикріплення мітки розчинності (виконується під час конструювання плазміди) до цільового білка може покращити розчинність білка у великій кількості солі [150].

Для одержання цекропіну А використовують 4М сольовий розчин хлориду натрія, зважаючи на його важливість у процесі очистки та подальшого розчинення, варто залишити цей розчин для нашої технології виділення та очищення рекомбінантного білку. Варто зазначити, що на цій стадії весь цільовий білок. А також інші білкові домішки випадають в осад, проте, випавший цекропін буде мати більшу розчинність у наступному буфері очистки та стабілізації, поміж інших продуктів метаболізму кишкової палички [12,142].

Як було зазначено раніше, для лізису використовується буфер. Зазвичай, для рекомбінантних білків використовують натрій фосфатний буфер (50 мМ PBS). Він покращує стабільність білкових молекул під час лізису та екстракції. Це полегшує ізоляцію цільових білків від інших нерозчинних компонентів клітини. Він захищає цілісність цільових білків, зберігаючи їх у стабільному середовищі. Тому, даний буфер дуже важливо використовувати під час руйнування клітини [150].

Крім того, буфер PBS використовують для додаткової стабілізації та відокремлення іншого, нерозчинного білку після обробки 4М сольовим розчином хлориду натрію. Тобто, до PBS надходить сольовий осад, з якого розчіяється лише цекропін, а інші метаболіти випадають у осад. Даний момент є важливим та кінцевим для підвищення ступеня очистки цекропіну А [12,142,150], а також

збільшення його стабільності перед сушінням. Тому, варто передбачити наявність цього буферу, через його важливість для одержання якісного цекропіну А.

4.4. Обґрунтування відокремлення баластного білку від розчину цекропіну А

Після того, як білкові осаді обробляють розчином 4М хлориду натрію та 50 мМ PBS, необхідно передбачити відокремлення осадів. У випадку розчину 4М хлориду натрію цільовим продуктом на даному етапі є саме білковий осад. З врахуванням об'єму стадії (50,7 л), пропонується використати центрифугу CFE-450 (заповнення до 60 л). Приклад зображення показано на рис.4.3., а технічні характеристики співпадають разом з CFE-350 [149], яку показано в п.4.2. (див. вище). Після цієї стадії одержуємо білковий осад, який треба розчинити в 50 мМ PBS.

Як вже було зазначено, в 50 мМ PBS розчиняється лише цекропін, а інші білкові продукти метаболізму випадають в осад. Об'єм даної стадії не дуже великий (всього 5 л), тому пропонується використовувати лабораторну центрифугу вертикального типу з об'ємом заповнення 5 л KDCM-10. Центрифуга виконана за стандартами ISO9001, а швидкість ротора складає 12000 об/хв [151].



Рис.4.4. Центрифуга KDCM-10 [151].

Після центрифугування 50 мМ PBS з білками, одержуємо розчин цекропіну А, який потрібно в подальшому висушити.

4.5. Обґрунтування методу сушіння цекропіну А

Процес сушіння проводиться періодично або безперервно при різних способах передачі теплоти: контактуванням, конвекцією або радіацією, струмами високої частоти, інфрачервоним випромінюванням, а також сушіння сублімацією.

Оскільки цекропін є доволі термостабільним білком, для нього можна використовувати більш жорсткі умови сушіння, оминаючи дороговартісний метод ліофілізації [12,142,152].

Найбільш розповсюдженими є кондуктивний та конвективний способи сушіння. В кондуктивних сушарках теплота для висушування матеріалу передається шляхом контакту його з нагрітою поверхнею, а в конвективних – теплота передається безпосередньо від теплоносія до матеріалу. При цьому видаляється волога, зв'язана з матеріалом за рахунок механічних і фізико-хімічних сил. Хімічно зв'язана волога не видаляється в зв'язку з руйнуванням матеріалу [153].

Кондуктивний метод наразі використовується все менше, порівняно з конвективним. Через свої недоліки, до яких відноситься низька якість сушіння (нерівномірність сушіння, жолоблення матеріалу та ін.). Конвективне сушіння є найбільш розповсюдженим методом висушування матеріалу, але він також має свої недоліки, які представлені втратами тепла, що призводить до підвищеного використання електроенергії. Але, сушіння відбувається рівномірно, що дозволяє нам зробити вибір саме в сторону конвективної технології [153].

З врахуванням об'єму стадії (4,75 л), пропонується обрати сушильну шафу конвективного типу СП-30 з об'ємом заповнення 30 л [154]. Температура сушіння становить 65 °С [142].



Рис.4.5. Сушильна шафа СП-30 [154].

Після сушіння сухий цекропін додатково подрібнюють на фармацевтичному млині, а також просіюють через вібрсито.

РОЗДІЛ 5

ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Вихідні дані:

1. Об'єм культуральної рідини з однієї ферментації ($V_{кр}$) = 138 л;
 2. Концентрація біомаси *E. coli* BL21 (DE3), трансформованого плазмідом *pSUMO-nABP-dHC-cesropin A* в культуральній рідині ($C_{біом}$) = 2 г/л;
 3. Концентрація очищеного цекропіну А становить ($C_{цекропінуА}$) = 287,9 мг/л;
- Враховуючи те, що кількість культуральної рідини становить 138 л, то кінцева кількість білку має становити $287,9 \times 138 = 39\,730$ мг або близько 39,7 г. Розподіл втрат по усім стадіям виділення і очищення наведено в таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіям

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіям			Необхідне обладнання
			Наді й-шло	Втрати (разом 15 %)	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 2 Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	138 л	-	138 л	Збірник культуральної рідини об'ємом 200 л
ТП 3 Центрифугування культуральної рідини						
2	Центрифугування культуральної рідини	Культуральна рідина	138 л	-	-	В проточній центрифугі
		Надосад	137,7 24 л	-	-	На утилізацію
		Осад	0,276 кг	2%	0,271 кг	В збірник на 20 л

					НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.	Собченко С.А.				РОЗДІЛ 5 ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ			73	115	Кафедра БТМ
Перевір.	Воронцов О.О.									
Реценз.										
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

ТП 4 Ресуспендування біомаси в буфері для лізису						
3	Ресуспендування біомаси в буфері для лізису	Осад	0,271 кг	-	-	В збірнику на 20 л
		50 мМ PBS	14 л	-	-	
		Ресуспендований осад	-	-	14,3 л	До промислової ультразвукової установки
ТП 5 Соніфікація ресуспендованої біомаси						
4	Соніфікація ресуспендованої біомаси	Ресуспендований осад	14,3 л	-	-	В промисловій ультразвуковій установці
		Соніфікована суспензія	-	-	14,3 л	До збірнику на 20 л
ТП 6 Центрифугування суспензії після соніфікації						
5	Центрифугування суспензії після соніфікації	Соніфікована суспензія	14,3 л	-	-	В промисловій вертикальній центрифугі
		Клітинний осад	0,3 кг	-	-	На утилізацію
		Білковий надосад	14 л	2%	13,7 л	В реактор об'ємом 100 л
ТП 7 Додавання сольового розчину до білкового надосаду						
6	Додавання сольового розчину до білкового надосаду	Білковий надосад	13,7 л	-	-	В реактор об'ємом 100 л
		4 М розчин хлориду натрію	37 л	-	-	
		Сольовий білковий розчин	-	-	50,7 л	До центрифуги вертикального типу
ТП 8 Центрифугування сольового білкового розчину						
7	Центрифугування сольового білкового розчину	Сольовий білковий розчин	50,7 л	-	-	В центрифугі
		Надосад	50,6 л	-	-	На утилізацію
		Білковий осад	0,1 кг	5%	95 г	В реактор на 10 л
ТП 9 Розчинення баластного білку в фосфатному буфері						
8	Розчинення баластного білку в фосфатному буфері	Білковий осад	95 г	-	-	В реакторі на 10 л
		50 мМ PBS	5 л	-	-	
		Нейтральний білковий розчин	-	-	5 л	До центрифуги

ТП 10 Центрифугування баластного білкового розсину						
9	Центрифугування баластного білкового розсину	Нейтральний білковий розчин	5 л	-	-	В центрифугі
		Нерозчинний білковий осад	80 г	-	-	На утилізацію
		Розчин цекропіну А	5 л	5%	4,75 л	До конвективної сушарки
ТП 11 Сушіння розчину цекропіну А						
10	Сушіння розчину цекропіну А	Розчин цекропіну А	4,75 л	-	-	В конвективній сушарці
		Сухий цекропін А	-	-	40,1 г	До млину
ТП 12 Подрібнення цекропіну А						
11	Подрібнення порошку цекропіну А	Сухий цекропін А	40,71 г	-	-	В млині
		Подрібнений порошок цекропіну А	-	0,5%	39,9 г	До просіювача
ТП 13 Просіювання порошку цекропіну А						
12	Просіювання порошку цекропіну А	Подрібнений порошок цекропіну А	39,9 г	-	-	В просіювачі
		Просіяний порошок цекропіну А	-	0,5%	39,7 г	В скляну емність на склад

РОЗДІЛ 6

СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЦЕКРОПІНУ А

Специфікація апаратурного обладнання для одержання антимікробного пептиду – цекропіну А показано в табл.6.1

Таблиця 6.1.

Специфікація обладнання виробництва цекропіну А

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
З-1	Збірник для натрій-фосфатного буферу	1	Реактор з робочим об'ємом 20 л. Виготовлений зі сталі типу AISI 316L. Частота обертання якірної мішалки – 0-70 об/хв. Діапазон регулювання температури реактора до +90 °С. Оснащений датчиком контролю рН. Країна виробництва: Україна (STS Group) ¹
Н-2 Н-5 Н-7 Н-11 Н-14 Н-22	Насос для перекачування рідин	6	Насос DWO B250/05. Виконано з сталі нержавіючої. Продуктивність від 0,5 до 24 м ³ /год. Країна виробництва: Китай (JEFF) ²
Д-3	Дозатор для хлориду натрію	1	Дозатор ваговий напівавтоматичний ДВСВ-S. Дози від 0,2 кг до 10 кг. Країна виробництва: Україна (НПЧП Политехник) ³
З-4	Збірник для 4М розчину хлориду натрію	1	Реактор з робочим об'ємом 40 л. Виготовлений зі сталі типу AISI 316L. Оснащений мішалкою. Робоча температура від 20 до 160 °С. Країна виробництва: Україна (Хіммікс) ⁴
З-6	Збірник для зберігання культуральної рідини	1	Реактор з робочим об'ємом 200 л. Виготовлений зі сталі типу AISI 316L. Оснащений подвійною сорочкою. Робоча температура від -120 °С до +160 °С. Оснащений датчиком контролю рН та мішалкою. Країна виробництва: Китай (Zhengzhou Mino Scientific Instruments Co., Ltd.) ⁵
Ц-8	Проточна центрифуга	1	Проточна центрифуга GQ75. Продуктивність до 10-600 л/год. Максимальна швидкість ротора 15200 об/хв. Країна виробництва: Китай (Shanghai Biochemical Co., Ltd.) ⁶

НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ				
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Собченко С.А.		
Перевір.		Воронцов О.О.		
Реценз.				
Н. Контр.				
Затверд.		Стабніков В.П.		
РОЗДІЛ 6 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЦЕКРОПІНУ А				
		Літ.	Арк.	Аркушів
			76	115
Кафедра БТМ				

3-9 3-13	Збірник для ресуспендування біомаси Збірник для зберігання обробленої ультразвуком суспензії	1	Реактор з робочим об'ємом 20 л. Виготовлений зі сталі типу AISI 316L. Оснащений подвійною сорочкою. Робоча температура від -120 °C до +160 °C. Оснащений датчиком контролю рН та мішалкою. Країна виробництва: Китай (Zhengzhou Mino Scientific Instruments Co., Ltd.) ⁵
Д-10 Д-16 Д-21	Об'ємно-ваговий дозатор для різних рідин	3	Електронний промисловий дозатор води і рідин Serv_W21. Може дозувати рідини діапазоном 0,1 л до 999,9 л. Відносна похибка дозування - 1,5% Дискретність установки дози - 0,1 л або 1л. Країна виробництва: Україна (Атма) ⁷
УЗ-12	Промисловий ультразвуковий дезінтегратор	1	Ультразвуковий промисловий дезінтегратор UIP500hdT. Може працювати за холодних температур. Продуктивність 250 л/год. Країна виробництва: Германия (Hielscher Ultrasonics GmbH) ⁸
Ц-15	Центрифуга	1	Центрифуга вертикального типу CFE-350 з об'ємом заповнення 30 л. Максимальна швидкість 10000 об/хв. Може працювати за холодних температур (до -80 °C). Країна виробництва: Китай (Both Instrument & Industrial Equipment (shanghai) Co., Ltd.) ⁹
3-17 3-28	Збірник для додавання сольового розчину до білкового надосаду Збірник для зберігання води знесоленої	2	Реактор з робочим об'ємом 100 л. Виготовлений зі сталі типу AISI 316L. Оснащений подвійною сорочкою. Робоча температура від -120 °C до +160 °C. Оснащений датчиком контролю рН та мішалкою. Країна виробництва: Китай (Zhengzhou Mino Scientific Instruments Co., Ltd.) ⁵
Н-18	Насос перистальтичний	1	Дозуючий насос з приводним двигуном Sigma/X. Діапазон продуктивності: 61–353 л/год. при протитиску 16–4 бар. Країна виробництва: Україна (ВІЛО Україна) ¹⁰
Ц-19	Центрифуга	1	Центрифуга вертикального типу CFE-450 з об'ємом заповнення 60 л. Максимальна швидкість 10000 об/хв. Може працювати за холодних температур (до -80 °C). Країна виробництва: Китай (Both Instrument & Industrial Equipment (shanghai) Co., Ltd.) ⁹
3-20	Збірник для білкового осаду	1	Реактор з робочим об'ємом 10 л. Виготовлений зі сталі типу AISI 316L. Оснащений подвійною сорочкою. Робоча температура від -120 °C до +160 °C. Оснащений датчиком контролю рН та мішалкою. Країна виробництва: Китай (Zhengzhou Mino Scientific Instruments Co., Ltd.) ⁵

Ц-23	Центрифуга	1	Центрифуга вертикального типу KDCM-10. Об'єм заповнення – 5 л. Може працювати з холодними температурами. Виконана за стандартами ISO9001. Швидкість – 12000 об/хв. Країна виробництва: Китай (Zhengzhou Keda Machinery And Instrument Equipment Co., Ltd.) ⁵
С-24	Сушильна шафа	1	Сушильна шафа лабораторна СП-30 на 33 л до 300°C. Точність настройки температури: 1 або 2 °С. Максимальна швидкість нагріву, °С, хв. (незавантажений): до 85°C < 20 хв. Країна виробництва: Україна (UOSLab) ¹¹
М-25	Млин фармацевтичний	1	Млин YF3-1. Фармацевтичний млин "проточного принципу". Продуктивність до 20 кг/год. Країна виробництва: Китай (Чумаки в Китаї) ¹²
В-26	Вібросито	1	Вібросито VS-200. Кількість фракцій – 5. Амплітуда коливань – 4 мм. Частота вібрацій 1400 об/хв. Країна виробництва: Китай (Чумаки в Китаї) ¹³
УФ-27	Установка зворотнього осмосу для одержання води знесоленої	1	Установка зворотнього осмосу ECOSOFT MO2500LPD MINI. Продуктивність – 100 л/год. Робочий тиск 8-10 атм. Тип фільтру - Filmtec XLE 2540. Країна виробництва: Україна (ECOSOFT) ¹⁴

Примітка: 1 - <https://stprom.com.ua/ua/p1723663252-himicheskij-laboratornyj-reaktor.html>, 2 - https://bts.net.ua/pumping-equipment-distillery/water-pump/dwo-b250-05-220v-50hz-nasos-v-dcentrovij/?gad_source=1&gclid=CjwKCAiA1-6sBhAoEiwArqIGPiley2MGM1wPghAKY5NF_8xeZp_ujCovmb5H-E-xz_UW6AdJmNCFRoCFNMQAvD_BwE, 3 - https://agrovektor.com/ua/physical_product/21728-vesovoy-doзатор-dlya-rasfasovki-sypuchih-veschestv-ot-025-kg-do-10-kg.html, 4 - <https://khimmix.ua/himicheskije-reaktory/reaktor-gomogenizator-40l>, 5 - https://www.alibaba.com/product-detail/Chemical-316L-316-Stainless-Steel-Jacketed_1600764440261.html?s=p, 6 - https://www.alibaba.com/product-detail/Tubular-Centrifuge-Large-Industrial-Centrifugal-Fans_1600595288620.html?spm=a2700.7724857.0.0.19d05621VE7k31&s=p, 7 - <https://prom.ua/ua/p491625353-avtomaticheskij-promyshlennyj-doзатор.html?&primelead=MS44>, 8 - <https://www.hielscher.com/uk/industry.htm>, 9 - https://www.alibaba.com/product-detail/Industrial-Basket-Centrifuge-Solid-Liquid-Separation_1600570199463.html?spm=a2700.7724857.0.0.102d596Pd64fB&s=p, 10 - <https://cms.media.wilo.com/cndoc/wilo251441/3702251/wilo251441.pdf>, 11 - <https://labimpex.com.ua/ua/p97657459-sushilnyj-shkaf-laboratornyj.html>, 12 - <https://chumaki.in.ua/ua/p568659204-farmatsevtichnij-mlin-yf3.html>, 13 - <https://prom.ua/p645449225-vibrosito-200-prosiyuvalna.html?&primelead=MC44NQ>, 14 - <http://aqua-line.net.ua/catalog/filtru-dlya-promuslovosti/ustanovki-zvorotnogo-osmosu/ustanovka-zvorotnogo-osmosu-ecosoft-mo2500lpd-mini/>

РОЗДІЛ 7

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦЕКРОПІНУ А

Для виділення та очистки цекропіну А треба передбачити 2 додаткових розчини. Перший – це PBS, або ж іншими словами натрій фосфатний буфер. Готову суміш даного розчину можна купити, а можна приготувати самим. Останній варіант є більш вигідним та дешевшим. Також, перед технологічним процесом потрібно передбачити 4М розчин хлориду натрію. Після приготування цих розчинів, починається технологічний процес.

ДР 1. Приготування додаткових розчинів

ДР 1.1. Приготування води знесолоної

Для знесолення водопровідної води використовуються установка зворотного осмосу (УФ-27). Об'єм даної води, яка необхідна для однієї серії виробництва цекропіну А, становить 50 л. Рушійною силою зворотного осмосу є різниця тиску з різних боків мембрани. Для фільтрації в конструкції установки зворотнього осмосу використовують два типи мембран: поліестерна пориста з розміром пор 0,25 мкм і непориста дифузійна ацетат-целюлозна мембрана з напівпроникними порами розміром 10^{-4} мкм. Остання утворює водневі зв'язки з молекулами води, які під дією надлишкового тиску розриваються, і молекули води дифундують у протилежному напрямку мембрани. Солі та всі інші хімічні сполуки, крім газів, не проникають крізь таку мембрану, а ступінь очистки від солей досягає 99,99 %. Процес отримання води триває 1 годину. Отримана знесолена вода зберігається у збірнику (З-28).

ДР 1.2. Приготування 50 мМ розчину натрій-фосфатного буферу

Для виробництва передбачено 19 л даного буфера. На технічних вагах зважують 7,6 г хлориду натрію та 1,37 г гідроортофосфату натрію, 190 г хлориду калію та 228 г дигідроортофосфату калію. Наважки переносять до реактору

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>	<i>Собченко С.А.</i>				<i>РОЗДІЛ 7 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ЦЕКРОПІНУ А</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>	<i>Воронцов О.О.</i>						79	115
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

об'ємом 25 л (З-1). Після чого, за допомогою рівнеміра, що передбачено в конструкції збірника, доливають 19 л води знесоленої. Включають мішалку (50 об/хв) та перемішують близько 20 хв. Після чого, за допомогою датчику контролю рН, який передбачено конструкцією реактору, визначають його рівень. рН має становити $7,4 \pm 0,2$.

ДР 1.3. Приготування 4 М розчину хлориду натрію

На ваговому дозаторі (Д-3) зважують 8,65 кг хлориду натрію. Після чого, сіль переносять до реактору об'ємом 40 л (З-4). За допомогою рівнеміра, що передбачено в конструкції збірника, доливають 28,4 л води знесоленої. Включають мішалку (50 об/хв) та перемішують близько 20 хв. Перевірку концентрації розчину виконують кондуктометрично.

ТП 2. Зберігання культуральної рідини

Культуральну рідину зберігають у З-6 при 4-8 °С для подальшого виготовлення цекропіну А.

ТП 3. Центрифугування культуральної рідини

Культуральну рідину зі З-6 за допомогою насосу (Н-7) подають до проточної центрифуги (Ц-8). Попередньо встановлюється режим швидкості ротора 8000 об/хв. Тривалість процесу становить 45 хв. Супернатант передають на утилізацію, а біомасу, після завершення центрифугування переносять вручну до охолодженого збірника (З-9).

ТП 4. Ресуспендування біомаси в буфері для лізису

До З-9 з температурою 4 °С (досягається подачею холодної води до сорочки подають 14 л натрій-фосфатного буферу за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-10) та насосу (Н-2). Після чого, вмикається мішалка (50 об/хв) та перемішують суспензію протягом 20 хв. Після чого, за допомогою насосу (Н-11) подають суспензію до промислового ультразвукового дезінтегратора (УЗ-12).

ТП 5. Руйнування клітин ультразвуком

Ультразвукову обробку виконують в УЗ-12. Обробку ультразвуком виконують при 150 W, 50 Гц, 180 разів по 2 с ультразвуком та 8 с без озвучування. Загальна тривалість обробки становить 3 хв. Після чого, оброблений ультразвуком

розчин вручну переносять до збірника за допомогою металевої ємності, куди було вивантажено суспензію (З-13).

ТП 6. Центрифугування суспензії після соніфікації

Зі збірника (З-13) за допомогою насосу (Н-14) подають розчин до вертикальної центрифуги (Ц-15). Швидкість ротора 10000 об/хв, а тривалість процесу – 10 хв. Після чого, осад передають на утилізацію, а білковий надосад подають до збірника (З-16).

ТП 7. Додавання сольового розчину до білкового надосаду

До збірника (З-16) за допомогою насосу (Н-5) та дозатору (Д-16) наливають 37 л 4М розчину хлориду натрію. Після чого, вмикається мішалка (50 об/хв) та перемішують суспензію протягом 20 хв. Після чого, за допомогою перистальтичного насосу (Н-18) подають суспензію до центрифуги (Ц-19).

ТП 8. Центрифугування сольового білкового розчину

До центрифуги (Ц-19) надходить сольовий білковий розчин. Встановлюється 10000 об/хв. Тривалість процесу – 10 хв. Після чого, білковий осад переносять до збірника (З-20).

ТП 9. Одержання білкової суспензії

До осаду за допомогою об'ємно-вагового дозатора (Д-21) та насосу (Н-2) подають 5 л натрій-фосфатного буферу. Вмикається мішалка (50 об/хв) та перемішують суспензію протягом 20 хв. Після чого, за допомогою насосу (Н-22) подають суспензію до центрифуги (Ц-23).

ТП 10. Центрифугування білкової суспензії

До центрифуги (Ц-23) надходить білковий розчин. Встановлюється 10000 об/хв. Тривалість процесу – 10 хв. Після чого, осад нерозчинних білків передають на утилізацію, а одержану суспензію переливають на металевий піддон.

ТП 11. Сушіння розчину цекропіну А

Деко встановлюють до сушильної шафи (С-24). Температура процесу становить 65 °С, а тривалість – 4 год. Після сушіння, висушеному цекропіну дають охолонути.

ТП 12. Подрібнення цекропіну А

Сухий цекропін може утворювати грудочки, тому їх треба розбити у млині (М-25). Тривалість процесу – 15 хв. Після цього, порошок подається на наступну стадію.

ТП 13. Просіювання порошку цекропіну А

Порошок цекропіну просіюють через вібросито (П-26) через сито, з пропускною здатністю 1 мм. Вага порошку має становити 39,7 г, а вологість – не більше 5%.

ПМФ 14. Фасування та маркування

ПМФ 14.1 Фасування цекропіну А

Одержаний порошок пересипають в поліетиленовий пакет з ZIP-застібкою об'ємом 100 мл.

ПМФ 14.2. Маркування цекропіну А

На пакет клеють маркувальний стікер із зазначенням дати виготовлення, ваги, вологості та номеру серії

ПМФ 14.3. Пакування в групову тару

Одержані пакети перекладають в картонну коробку та передають на зберігання на склад з температурою 25 °С.

РОЗДІЛ 8

КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЦЕКРОПІНУ А

8.1. Контроль об'єму натрій-фосфатного буфера

Оскільки натрій-фосфатний буфер готується в одному збірнику для декількох стадій одночасно, треба контролювати рівень буфера в збірнику, щоб бути точно впевненим щодо його поточного об'єму [155].

Для вимірювання рівня рідини застосовують [155]:

- поплавкові;
- буйкові;
- гідростатичні;
- ультразвукові;
- радарні безконтактні;
- радарні контактні;
- акустичні прилади.

Для нашого випадку підійде ємнісний безконтактний рівнемір Liquicap M FMI51. Він робить безперервні вимірювання рівня рідких продуктів. Робоча температура $-80^{\circ}\text{C} \dots 200^{\circ}\text{C}$. Похибка – 0,1%. Може працювати під вакуумом та тиском до 100 бар [155].



Рис.8.1. Ємнісний рівнемір Liquicap M FMI51 [155]

На початку, рівень заповнення робочого об'єму збірника з натрій

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Собченко С.А.</i>			РОЗДІЛ 8 КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ЦЕКРОПІНУ А	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Воронцов О.О.</i>					83	115
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

фосфатним буфером має становити 95%. Після того, як 14 л буферу підуть на лізис, рівень має становити 25%.

8.2. Контроль концентрації 4М розчину хлориду натрію

Кондуктометрія - сукупність електрохімічних методів аналізу, заснованих на вимірі електропровідності розчинів [156].

Кондуктометрія застосовується для визначення концентрації розчинів солей, кислот, основ, для контролю складу деяких промислових розчинів [156].

Переваги кондуктометрія: висока чутливість (ниж. межа визначуваних концентрацій $\sim 10^{-4}$ - 10^{-5} М), досить висока точність (відносить, похибка визначення 0,1-2%), простота методик, доступність апаратури, можливість дослідження забарвлених і каламутних розчинів, а також автоматизації аналізу [156].

Кондуктометричний аналіз заснований на зміні концентрації речовини або хімічного складу середовища в міжелектродному просторі; він не пов'язаний з потенціалом електрода, який зазвичай близький до рівноважного значення. Кондуктометрія включає прямі методи аналізу (використовувані, наприклад, в солемірах) і непрямі (наприклад, у газовому аналізі) із застосуванням постійного або змінного струму (низької та високої частоти), а також хронокондуктометрію, низькочастотне і високочастотне титрування [156].

Високоточний кондуктометр MP515 відмінно виконує вимірювання для поширених завдань і методів дослідження. До пристрою підключається скляний електрод з високою швидкістю вимірювання. MP515 - високоточний кондуктометр з можливостями автоматичного калібрування і температурної компенсації, а також пам'яттю на 300 груп, що включають температуру і дату, час вимірювання. Пристрій має перемикач електропровідності на солі [156]. Його зображення показано на рис.8.2.

Оскільки в нашому випадку концентрація соляного розчину дуже велика, а його визначення виконують до розчину концентрацією 1 М, його потрібно розбавити щонайменше в 4 рази. А краще перевіряти кондуктивність, коли зразу розбавлено у 8 разів, до концентрації 0,5 М, оскільки значення електропровідності

від 0,85 до 1 М дуже подібні один між одним. Електропровідність для 1М розчину має становити 3522,12 $\mu\text{S}/\text{cm}$, а електропровідність розбавленого зразка для 0,5М має становити близько 3335 $\mu\text{S}/\text{cm}$ [157].



Рис.8.2. Кондуктометричний солемір MP515 [156]

8.3. Контроль ваги цекропіну А

Вагу легко визначити за допомогою ваг. Оскільки кінцева маса має вагу в 40,3 г, можна використати лабораторні ваги. Для цього виду контролю можна використати ваги Axis AD 500, які зважують до 500 г. Дискретність ваг - 0,001 г [158].



Рис.8.3. Ваги лабораторні Axis AD 500 [158]

8.4. Контроль вологості цекропіну А

Для визначення вологості готової субстанції можна використати вагові аналізатори вологості. Для наших цілей можна використати китайський аналізатор

JS50-5T. Максимальна межа зважування становить 50 г. Ціна поділки 5 мг. Температура висушування становить 105 °С. Ціна поділки вологості – 0,1%. Мову апарату можна змінити в налаштуваннях [159].



Рис.8.4. Ваговий аналізатор вологості JS50-5T [159]

Вологість кінцевої субстанції має бути не більше 5%.

8.5. Контроль антимікробної активності цекропіну А

Антагоністичну активність визначали за допомогою 96 лункового планшету. Для цього 20 мкл розчину цекропіну А в концентрації 125 мкг/мл розподіляли в 96-лунковий планшет, і в кожен лунку інокулювали 80 мкл *E.coli* середньої логарифмічної фази, таким чином, що кінцева концентрація білку становила 31,25 мкг/мл. Після 16 годин інкубації при 37 °С ріст тестового організму оцінюють шляхом вимірювання оптичної густини OD₆₀₀. Як контроль, використовували культури кишкової палички без антимікробного пептиду. Ріст *E.coli* має бути відсутнім в лунках, де містився цекропін А [160].

Для вимірювання оптичної густини можна використати спектрофотометричний аналізатор планшетів, іншими словами – мікропланшетний рідер. Для цього, можна використати мікропланшетний рідер моделі DR-200В. Він може читати 48-лункові та 96-лункові планшети. Межа індикації від 1 до 4 OD. Межа довжин випромінювання - 400~720 нм [161].



Рис.8.5. Мікропланшетний рідер DR-200B [161]

8.6. Ідентифікація цекропіну А

Оскільки цекропін А це мікробний пептид, найшвидшим методом ідентифікації є методи гелевого електрофорезу (SDS-PAGE). Для визначення цекропіну використовується 12-% поліактиламідний гель. Розмір рекомбінантного білку становить 30,9 кДа [12].

Коли білки поділяють за допомогою електрофорезу через гелеву матрицю, менші білки мігрують швидше через менший опір гелевої матриці. Інші впливи на швидкість міграції через матрицю гелю включають структуру та заряд білків [20].

У SDS-PAGE використання додецилсульфату натрію (SDS, також відомого як лаурилсульфат натрію) і поліакриламідного гелю значною мірою усуває вплив структури та заряду, а білки розділяються виключно на основі довжини поліпептидного ланцюга [162].

SDS (додецилсульфат натрію) — це детергент із сильним ефектом денатурації протеїнів, який зв'язується з білковим каркасом у постійному молярному співвідношенні. У присутності SDS і відновника, який розщеплює дисульфідні зв'язки, критичні для правильного згортання, білки розгортаються в лінійні ланцюги з негативним зарядом, пропорційним довжині поліпептидного ланцюга [162].

Полімеризований акриламід (поліакриламід) утворює сітчасту матрицю, придатну для поділу білків типового розміру. Сила гелю дозволяє легко використовувати. Електрофорез у поліакриламідному гелі білків, оброблених SDS, дозволяє дослідникам розділяти білки на основі їх довжини простим, недорогим і відносно точним способом [162].

Спочатку готують гелеву пластинку. Для приготування 12-% поліактиламідного гелю пропис є наступними [163]:

2,7 мл води

2,0 мл буферу (1,5 M Tris; pH 8.8)

3,2 мл 30% розчину акриламиду (37,5 акриламиду : 1 бісакриламду)

80 мкл 10% SDS

8 мкл тетраметилетилендіаміну (TEMED)

80 мкл 10% амоній персульфату (APS)

Загальний об'єм – 8 мл

Це пропис нижнього гелю, на якому потім, після забарвлення, видно доріжки білку. Крім нього, готують і концентруючий гель, з якого утворюють лунки до яких капають відповідні зразки. Концентруючий гель зазвичай є 4-% поліактиламідним гелем. Він має наступний пропис [163]:

3,0 мл води

1,25 мл буферу (1 M Tris; pH 6.8)

0,7 мл 30% Acrylamide (37.5:1)

50 мкл 10% SDS

5 мкл TEMED

50 мкл 10% APS

Загальний об'єм – 5 мл

Зазначені гелі за вказаним об'ємом призначені одразу для виготовлення двох пластинок [163].

Отже, визначення є наступним [164]:

1. Очищають скляні пластини водою з милом, потім етанолом. Збирають скляні пластини та розпірки. Конструкція кріпиться на спеціальній підставці таким

чином, щоб під склом знаходився паралон, який буде стримувати витіканню розчину.

2. Готують 12-% гель. Після додавання TEMED і APS починається полімеризація гелю, тому розчин ретельно перемішують та обережно заливають у пластини нахиливши їх, щоб розподілити герметик. Зазвичай, гель заливають з невеликим надлишком, оскільки його певна частина пройде крізь нижній ущільнювач. Після цього, зверху пластини заливають воду деонізовану для зменшення контанту гелю з повітрям. Таким чином він швидше полімеризується. Полімеризація гелю триває 15-20 хв.

3. Гель вважається полімеризованим тоді, коли видно межу між гелем та водою. Після цього, воду обережно видаляють. Після цього, починають готувати концентруючий гель та ким самим принципом, що й нижній. Після додавання TEMED і APS вміст ретельно перемішують та обережно заливають до кінця скляної пластини. Після чого, вставляють спеціальну гребінку, яка формує лунки гелю. Полімеризація гелю триває 10-15 хв.

4. Поки триває полімеризація гелю, готують зразки. Їх розкрапають близько 5 мкл до епендорфів. Готують буфер для зразків (Трис HCl (63 мМ), гліцерин (10%), SDS (2%), бромфеноловий синій (0,0025%), рН 6,8). До зразків додають 20 мкл буферу для зразків. Додатково, в ще один епендорф вносять маркерний білок (його ще називають маркер – зразок білків з визначеними молекулярними масами). Зразки гріють при 85°C протягом 5 хв. Після чого, зразки центрифугують при 10000 об/хв протягом 30 секунд. Після цього, зразки вважаються готовими.

5. Після того, як верхній гель також полімеризувався, скляні плти обережно дістають з підставки та тримачів та переставляють до елетрофоретичної касети. Цю касету вставляють до електрофоретичної камер. До касети (повістю) та камери (до мітки визначеної виробником) заливають буфер, який має назву SDS-PAGE Running Buffer (на 1 л: Трис основа – 3,3 г, гліцин – 144,4 г, SDS – 10 г). Після цього, витягують гребінку. До першої лунки додять 5 мкл маркеру, до інших – по 5 мкл зразків.

6. Номер зразку, маркеру записуються до окремої технологічної карти з нумерацією доріжок. Після цього, камеру закривають та встановлюють потужність струму в 20 мА. Після того, як білки пройдуть концентруючий гель, цей показник підвищують до 30 мА.

7. Електрофорез закінчують, коли білки пробіжать майже весь гель. Після цього, струм вимикають та обережно дістають касету з скляними плитами, зливаючи буфер в камеру. Після цього, скляні плити дуже обережно від'єднують одна від одної. Гель обережно переносять у термостійку ємність.

8. У ємність заливають фарбуючий буфер (100 мг кумасі R розчиняють у 50 мл етанолі). Після чого, ємність накривають кришкою та недовго прогрівають, наприклад, у мікрохвильовці, але щоб не википів фарбник. Після чого, гель пластинку залишають щонайменше на 30 хв для фарбування при кімнатній температурі (бажано залишити н довший час, тоді результати будуть яскравіші).

9. Після фарбування, барвник зливають, гелеву пластинку спочатку промивають дистильованою водою, яку також зливають, а потім заливають 20-% оцтовою кислотою, для відмивання синього фону гелю.

10. Після того, як гель відмився від барвника, оцтову кислоту зливають, а пластинку – аналізують.

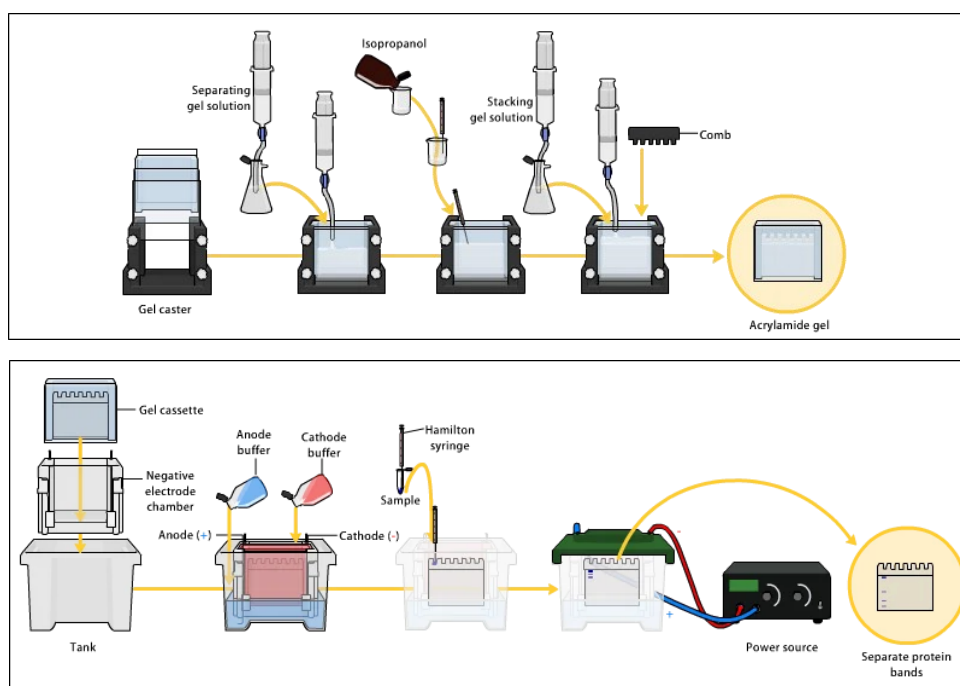


Рис.8.6. Схематичне зображення електрофорезу [165]

Для аналізу пропонується використати електрофоретичну систему Bio Rad, оскільки вона є доволі універсальною, та містить усі необхідні компоненти для зручного електрофорезу [166].

Особливості систем включають [166]:

- Тривалість електрофорезу в гелі становить лише 15 хв
- Повна інтеграція з системами вологого та швидкого напівсухого блотування
- Широкий асортимент готових гелів — для денатурованого білка та виділення нативного білка або IEF
- Конфігурується для розміщення 1–12 гелів для електрофорезу



Рис.8.7. Система електрофоретичного аналізу Bio Rad [166]

РОЗДІЛ 9

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ

9.1. Розрахунок річної потужності виробництва таблеток з цекропіном А та кількості серій на рік

За техніко-економічним обґрунтуванням було визначено необхідну кількість таблеток, яку будемо виготовляти на 2 групи хворих циститом. Ця кількість становить 151840 шт. Для виробництва такої кількості таблеток було визначено річну кількість культуральної рідини, яка становила 64,3 м³.

За один цикл виробничого біосинтезу напруцьовують 138 л культуральної рідини. З цієї кількості можна отримати таку кількість цекропіну А:

$$287,9 \times 138 = 39\,730,2 \text{ мг} = 39,73 \text{ г}$$

На 1 таблетку за розрахунками припадає 122 мг цекропіну А. Отже, за одну серію отримуємо наступну кількість таблеток:

$$\frac{39\,730,2}{122} \approx 325 \text{ шт.}$$

З врахуванням загальної річної кількості таблеток кількість серій на рік становитиме:

$$\frac{151840}{325} = 466 \text{ серій}$$

Така кількість серій обумовлена тривалістю культивування, яка становить всього 14 годин, через це утворюється така кількість виробничої сировини. Через те, що кількість серій дуже велика, пропонується об'єднувати їх (якщо вони мають однакові властивості за показниками контролю якості), оскільки промислове виробництво таблеток має набагато більшу потужність, а тому за такої кількості обладнання буде використовуватись дуже рідко і більшу частину стояти. Задля забезпечення виробничої потужності пропонується об'єднувати 50 серій між собою (у випадку, якщо їх показники якості ідентичні або максимально

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>					
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>						
<i>Розроб.</i>		<i>Собченко С.А.</i>			РОЗДІЛ 9 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ					
<i>Перевір.</i>		<i>Воронцов О.О.</i>						<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Реценз.</i>									92	115
<i>Н. Контр.</i>								<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>								

подібні). Тоді, кількість серій на рік складає:

$$\frac{466}{50} \approx 9 \text{ серій}$$

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

9.2.1. Вибір класу чистоти та вентиляційного повітря

Виробництво лікарських нестерильних препаратів зазвичай здійснюють у класах чистоти приміщень С та D. За іншою класифікацією (по ISO 14644–1) ці класи чистоти відповідають ISO 7 та ISO 8. Основні вимоги для цих класів можуть включати [167,168]:

Клас ISO 7 (С): Допустима концентрація частинок розміром 0,5 мікрона частинок на кубічний метр повітря зазвичай повинна бути менше 352000 частинок. Такий клас використовується в ситуаціях, де важлива невисока чистота, наприклад, при виробництві таблеток, як однієї з найпоширеніших форм нестерильних лікарських засобів [168].

Клас ISO 8 (D): Допустима концентрація частинок того ж розміру зазвичай повинна бути менше 3520000 частинок на кубічний метр повітря. Цей клас може використовуватися в менш критичних зонах, де важлива, але не настільки висока чистота. Зазвичай його використовують для приміщень, де відбувається етикетування та оформлення готової продукції, зберігання лікарського препарату, допоміжних речовин і субстанцій, прання одягу для працюючих у виробничих приміщеннях [168].

Тож, для нашого виробництва варто обрати С клас підготовки повітря, оскільки ми виробляємо таблетки з активним інгредієнтом, який може контактувати з мікроорганізмами з навколишнього середовища [167,168].

Для підготовки повітря для приміщень з класом чистоти С, де допускається трохи менший рівень чистоти, необхідно використовувати системи очищення та контролю повітря. Основні етапи підготовки повітря включають в себе фільтрацію, регулювання температури та вологості, а також моніторинг та управління концентрацією частинок [168].

Основні етапи підготовки повітря для приміщень класу чистоти С [168]:

Фільтрація: Використовуються спеціалізовані фільтри для усунення частинок та вологи з повітря. Даний клас чистоти допускає певний рівень частинок у повітрі, і фільтрація важлива для досягнення цих стандартів. Для заданих операцій можна використовувати фільтр серії FYD - 035 - 1, який відповідає стандартам ISO 7. Фільтруючим матеріалом виступає акрилове волокно та целюлоза. Мінімальна робоча температура – 1,5 °С, а максимальна – 65 °С. Як індикатор забиваності фільтра використовують манометр, який входить в конструкцію фільтра. Рекомендується заміна фільтруючого елемента при перепаді тиску в 600 мбар [169].

Регулювання температури і вологості: Контроль температури та вологості допомагає підтримувати оптимальні умови для виробництва та зберігання таблеток. Забруднення та зміни умов можуть впливати на якість продукції.

Моніторинг та управління: Системи моніторингу повітря встановлюються для постійного контролю концентрації частинок та інших параметрів. Це включає в себе вимірювання та запис рівня частинок, температури, вологості, тиску та інших параметрів.

Системи очищення повітря: Використовуються системи очищення повітря, такі як вентиляційні системи з фільтрацією, щоб забезпечити постачання чистого повітря у виробничі приміщення.

Управління статичною електрикою: Забезпечення відповідної контролю статичної електрики також може бути важливим аспектом, оскільки вона може впливати на процес виробництва та якість таблеток.

9.2.2. Підготовка персоналу

Підготовка персоналу для роботи в виробництві таблеток включає низку кроків та процедур, спрямованих на забезпечення безпеки, якості та ефективності виробництва. Ось деякі ключові аспекти підготовки персоналу [170]:

1. Освіта та навчання:

- Теоретична підготовка: Персонал повинен мати розуміння основних принципів виробництва таблеток, зокрема, процесів змішування, пресування та обкладування.
- Практична навчання: Забезпечення можливості здобути практичний досвід на обладнанні, яке використовується в процесі виробництва.

2. Безпека та гігієна:

- Навчання правил безпеки: Включає в себе правила використання захисного спорядження, управління небезпечними речовинами та безпечного використання обладнання.
- Гігієнічні стандарти: Вивчення та дотримання гігієнічних норм, зокрема, регулярне миття рук, зміна одягу та взуття, для запобігання забрудненню виробничого середовища.

3. Робочі процедури та стандарти:

- Навчання робочим процедурам: Ознайомлення персоналу з усіма кроками та етапами виробництва таблеток.
- Система якості: Забезпечення розуміння системи контролю якості та дотримання стандартів якості.

4. Технічна підготовка:

- Опанування обладнання: Забезпечення навчання персоналу ефективному та безпечному використанню обладнання, включаючи преси, мішалки тощо.
- Обслуговування та ремонт: Навчання основам обслуговування та дрібному ремонту обладнання.

5. Контроль якості:

- Навчання методам контролю якості: Ознайомлення персоналу з методами візуального контролю, вимірювань та іншими процедурами контролю якості.
- Система документації: Опанування правил документування результатів виробництва та контролю якості.

6. Ефективність та продуктивність:

- Оптимізація робочих процесів: Навчання оптимальним методам виконання завдань та уникання зайвих затримок.
- Комунікація та співпраця: Забезпечення ефективної комунікації та співпраці в колективі.

Особливу увагу приділяють вивченню нормативної документації які визначають вимоги роботу персоналу. При цьому, основними нормативними документами, якими має керуватися персонал при свої роботі, є GMP, ICH Q10, ДСТУ ISO 9001 [170].

9.2.3. Вибір дезінфікуючих засобів

Використання дезінфікуючих засобів в фармацевтичному виробництві є важливою складовою забезпечення високих стандартів безпеки та якості продукції. Дезінфікуючі засоби використовуються для контролю мікробіологічного забруднення на поверхнях, у повітрі та воді, що допомагає запобігти забрудненню фармацевтичних продуктів та забезпечити безпеку пацієнтів. Основні причини використання дезінфікуючих засобів у фармацевтичному виробництві включають [171]:

1. Запобігання крос-контамінації. Дезінфікуючі засоби допомагають у запобіганні передачі мікроорганізмів від одного місця чи обладнання до іншого. Це особливо важливо у виробничих середовищах, де проводяться різні етапи виробництва.
2. Збереження чистоти обладнання. Дезінфікуючі засоби використовуються для очищення та дезінфекції обладнання (те, яке не стерилізується), щоб уникнути забруднення продукції мікроорганізмами, бактеріями або грибками.
3. Дотримання стандартів якості. Використання дезінфікуючих засобів є важливим елементом системи контролю якості, допомагаючи фармацевтичним виробникам відповідати стандартам та нормативам.
4. Забезпечення безпеки персоналу. Дезінфікуючі засоби допомагають у збереженні безпеки працівників, уникненні розповсюдження

інфекційних захворювань та забезпеченні санітарних умов у виробничому середовищі.

Однією з ключових класифікацій дезінфекторів є за діючою речовиною.

Згідно з цією класифікацією, дезінфектанти поділяються на кілька видів [171]:

- Спиртові (засновані на спиртах, таких як етанол, ізопропанол, пропанол, бутандіол). Ці антисептики мають високий попит. Їх переваги включають ефективність, оперативне випаровування, безпечність та доступність за невелику ціну. Вони представлені головним чином у вигляді прозорих рідин безбарвного кольору, іноді з легкими відтінками, і можуть містити компоненти для догляду за шкірою та інші додаткові функції.
- Хлоровмісні дезінфектанти, що базуються на хлорі. Ці засоби, зазвичай у вигляді порошкоподібних, таблетованих або рідких композицій, володіють широким знезаражувальним впливом. Вони ефективні проти мікробів, бактерій, вірусів і грибків, і використовуються для дезінфекції різних поверхонь та об'єктів. Хлоровмісні дезінфектанти мають характерний хлорний запах і застосовуються для різних видів прибирання.
- Фенольні дезінфектанти використовують фенол та його похідні. Вони відрізняються можливістю утворення захисної плівки на обробленій поверхні, що дозволяє зберігати дезінфекційний ефект тривалий час. Ці засоби широко використовуються в різних галузях.
- Альдегідні дезінфектанти, які містять активні компоненти альдегідів, представляють собою рідкі засоби широкого спектру дії, здатні боротися навіть зі спорами грибів. Вони володіють антибактеріальними і в'язучими властивостями, ефективно дезінфікують приміщення, різні поверхні та інше. Альдегідні дезінфектанти легко проникають до мікробних осередків на матеріалах, не завдаючи шкоди тканинам і металам.
- Пероксидоводневі дезінфектанти, зокрема перекис водню у концентраціях 35%, 50%, 60%, є прозорими безбарвними рідкими

речовинами, які представляють собою засіб активного кисню. Вони відрізняються відсутністю специфічних ароматичних параметрів та подразнюючої дії, а також мають низьку токсичність, вважаються найбезпечнішими для зовнішнього середовища дезінфекційними засобами. Підходять для знезараження корозійностійких металевих, скляних і пластмасових поверхонь.

- Дезінфектанти з четвертинних амінів, також включаючи алкілдиметилбензиламонію хлорид і алкілдиметилетилбензиламонію хлорид, мають малу токсичність, виявляють ефективність проти шкідливих мікробів, діють на бактерії, віруси, гриби, плісняву і спори. Застосовуються для передстерилізаційної обробки, стерилізації, знезараження обладнання, поверхонь, посуду та інших цілей, для поточних і генеральних прибирань. Зазвичай, ці дезінфектанти доповнюються функціональними добавками і відзначаються високою економічністю.
- Гуанідинові дезінфектанти, які містять гуанідин і його похідні, забезпечують переважно бактерицидну і віруліцидну дію. Вони формують стійкі захисні плівки після обробки і, завдяки своїй нетоксичності, мають широкий спектр використання.
- Комбіновані дезінфектанти, які включають кілька активних компонентів з різних груп, відрізняються широким спектром впливу на бактерії і мікроби, а також мають багато функціональних переваг.
- Дезінфектори з третинних амінів. Малотоксичні, з високими мийними параметрами, ефективні проти переважної кількості штамів бактерій.

Спираючись на особливості нашого виробництва, яке працює весь рік, треба обрати щонайменше 3 різних дезінфектора за діючою речовиною задля уникнення стійкості мікроорганізмів навколишнього середовища. Пропонується розглянути альдегідні, гуанідинові та дезінфектори на основі четвертинних амінів (ЧАС).

Порівняння дезінфікуючих препаратів

Тип	Назва	Вартість за 1 л концентрату, грн	Робочий розчин, %	Вартість за 1 л робочого розчину, грн	Джерело
Альдегідні	Бациліквід лонг	540	3,5	1,89	[172]
	Лізоформін 3000	560	0,25	0,14	[173]
	Ласепт форте	288	0,25	0,07	[174]
Гуанідинові	Терацид	588	0,05	0,03	[175]
	Біопагdez	660	0,1	0,06	[176]
	Хілер	700	0,1	0,07	[177]
ЧАС	MDF 100	70	2	0,14	[178]
	Веліdez	420	0,1	0,04	[179]
	CD-AMIN	595	0,01	0,006	[180]

В табл.9.1. наведено лише ті дезінфекційні засоби, які є в державному реєстрі станом на 2023 рік. Спираючись на вище наведену інформацію, з альдегідних препаратів варто обрати Ласепт форте, з гуанідинових – Терацид, а з ЧАС - CD-AMIN через дешевизну робочих розчинів цих дезінфекторів.

9.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Блістер - це технологічний процес, що включає нагрівання, вакуумне формування та охолодження полімерних листів, таких як ПВХ, ПС, ПЕТ. Ці листи пристосовуються до форми за допомогою блістерної машини, після чого вони штампуються з використанням ножової матриці на перфораторі, утворюючи готовий блістер. Зазвичай цей процес виконується однією машиною (блістерною) після чого на цій самій машині відбувається пакування в первинну упаковку, тому особливостей підготовки для виробництва цієї форми – немає [181].

Для наших потреб можна використати автоматичну блістерну машину Alu Alu, яка відповідає вимогам стандартів GMP. Всі деталі, що контактують з ліками, виготовлені з міцної нержавіючої сталі SUS316. Розмір машини (довжина × ширина × висота): 4460 × 760 × 1620 мм. Швидкість різання – 25-60 раз/хв [182].

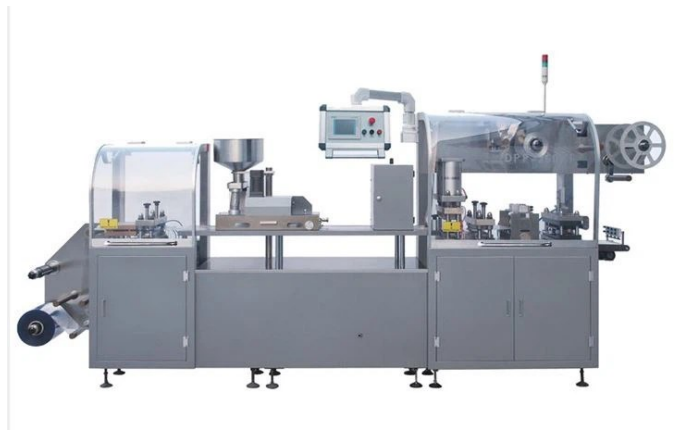


Рис.9.1. Автоматична блістерна машина Alu Alu [182]

9.4. Обґрунтування вибору підготовки води

Виробництво таблеток не потребує спеціалізованої води, такої як знесоленої або води для ін'єкцій. У даному випадку використовується лише вода для миття робочих поверхонь, підлоги, стін, вікон та обладнання, а з цією метою можна використовувати звичайну водопровідну воду.

9.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Після того, як порошок цекропіну А було додатково подрібнено та просіяно, його беруть в роботу. Попередньо, цекропін змішують разом з целюлозою мікрокристалічною, кремнієм діоксидом колоїдним безводним, крохмальгліколятом натрію (тип А), крохмалем кукурудзяним, магнієм стеаратом та тальком [183].

Для цього процесу варто передбачити спеціальний змішувальний апарат. Оскільки з однієї серії отримуємо всього 17 976 таблеток, змішувач має бути невеликого об'єму. Для забезпечення наших потреб можна використати змішувач СВН-10, об'ємом завантаження 25 кг (або 40 л). Швидкість обертання апарату коливається від 0 до 15 об/хв. Розмір машини (довжина × ширина × висота): 1000 × 1400 × 1020 мм. Машина має такі переваги, як стабільна робота, низький рівень шуму, високий коефіцієнт завантаження та короткий час змішування [184].



Рис.9.2. Змішувач SBH-50 [184]

Після змішування починається формування таблеток. Його виконують за допомогою таблетпресу. Для наших потреб підійде однопуансонний автоматичний таблетпрес DP 12. Такий вибір обґрунтовано малою кількістю таблеток, яку можна одержати за 1 серію. Максимальна швидкість вироблення таблеток становить 3600 шт/год. Максимальний діаметр таблетки, який можна встановити – 12 мм. Максимальний тиск процесу – 40 кН. Розмір машини (довжина × ширина × висота): 450 × 550 × 750 мм. Відповідає всім вимогам GMP [185].



Рис.9.3. Таблетпрес однопуансонний DP 12 [185]

Після таблетування готові таблетки згромажуються в бункер блістерної машини. Як було вказано в п.9.3., для наших потреб пропонується використати автоматичну блістерну машину Alu Alu. В цій машині формується блістер, в комірки якого з бункеру потрапляють таблетки, після чого блістер герметично запаюється алюмінієвою фольгою. Далі, готові блістери вкладаються в вторинну упаковку у вигляді картонної коробки разом з інструкцією до лікарського засобу. Для цього процесу використовують спеціальну пакувальну машину, яка вкладає

готові блістери в картонні коробки. Її можна під'єднати до минулого апарату, щоб виробництво у цьому процесі стало конвеєрним. Для нашого виробництва пропонується розглянути автоматичну пакувальну лінію від компанії MARYA. Цей апарат має можливості автоматичного складання розкладеної коробки, вкладання блістерів та супровідної інформації, а також може додатково маркувати партію (серію) та іншу додаткову інформацію, необхідної для нанесення [186].



Рис.9.4. Автоматична машина вкладання блістерів в коробки [186]

Далі, готові лікарські препарати вручну групують в одну велику картонну коробку та направляють на склад. Оскільки за серію одержується невелика кількість коробок, це можна зробити вручну без використання додаткового обладнання.

РОЗДІЛ 10

МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А

Матеріальний розрахунок цекропіну А на серію передбачає визначення потужності самого виробництва. В розділі 1 було визначено, що на серію припадає 39,73 г цекропіну А. При цьому, для забезпечення робочої потужності запропоновано об'єднувати серії. Тому 466 серій було скорочено до 9. Тож, на 1 об'єднану серію припадає 1986,5 г цекропіну А що відповідає 18 250 таблеткам. При цьому, маємо враховувати втрати сировини на стадіях зважування – 0,5%, змішування – 0,5%, таблетування – 0,5%. З врахуванням всіх втрат, маємо отримати 17 976 таблеток, або ж 1797 блістерів.

Таблиця 10.1.

Матеріальний баланс на серію лікарського засобу на основі цекропіну А

Надійшло		Використано	
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість, г	Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість, г
Зважування сировини, кг			
Цекропін А	1986,5	Цекропін А	1976,57
Крохмальгліколят натрію	2075	Крохмальгліколят натрію	2064,63
Мікрокристалічна целюлоза	2075	Мікрокристалічна целюлоза	2064,63
Кремній діоксид колоїдний безводний	25	Кремній діоксид колоїдний безводний	24,88
Крохмаль кукурудзяний	1250	Крохмаль кукурудзяний	1243,75
Порошок талька	1250	Порошок талька	1243,75
Стеарат магнія	62,5	Стеарат магнія	62,19
Всього:	8724	Втрати (0,5%)	43,6
		Всього:	8724

					НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата								
Розроб.		Собченко С.А.			РОЗДІЛ 10 МАТБАЛАНС НА СЕРІЮ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А			Літ.	Арк.	Архивів		
Перевір.		Воронцов О.О.								103	115	
Реценз.								Кафедра БТМ				
Н. Контр.												
Затверд.		Стабніков В.П.										

Змішування компонентів			
Цекропін А	1976,57	Маса для таблетування	8637
Крохмальгліколят натрію	2064,63		
Мікрокристалічна целюлоза	2064,63		
Кремній діоксид колоїдний безводний	24,88		
Крохмаль кукурудзяний	1243,75		
Порошок талька	1243,75		
Стеарат магнія	62,19		
Всього:	8680,4	<u>Втрати(0,5%)</u>	<u>43,4</u>
		Всього:	8680,4
Стадія таблетування			
Маса для таблетування	8637	Таблетки	8593,82
Всього:	8637	<u>Втрати (0,5%)</u>	<u>43,18</u>
		Всього:	8637
Фасовка таблеток			
Контейнери	1797 уп.	Контейнери	1797
Всього:	1797 уп.	<u>Втрати (0%):</u>	<u>0</u>
		Всього:	1797 уп.

Сумарні втрати по виробництву препарату цекропін А становлять 1,5%

РОЗДІЛ 11
СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ТАБЛЕТОК
НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А

Специфікація обладнання, яке використовується для виробництва таблеток де діючою речовиною виступає цекропін А показано в табл.11.1.

Таблиця 11.1.

Специфікація обладнання фармацевтичного виробництва таблеток
на основі цекропіну А

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
ПЗ – 1	Повітрозабірник	1	Повітрозабірник DARCO. Виготовлений з оцинкованої листової сталі. Висота – 12 метрів. Максимальна робоча температура – 250 °С. Країна виробництва: Польща (DARCO) ¹
Ф - 2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр повітряний гофрований. Клас очистки – G4. Корпус створено з нержавіючої сталі. Фільтруючий матеріал – поліестер. Робоча температура до 80 °С. Країна виробництва: Україна (TWE GROUP) ²
К-3	Компресор	1	Компресор повітряний Dnipro-M AC-48. Об'єм ресивера – 48 л. Продуктивність на вході:180 л/хв. Продуктивність на виході:125 л/хв. Робочий тиск – 8 бар. Тип – масляний. Країна виробництва: Україна (Dnipro-M) ³
Т-4 Т-6	Теплообмінник-нагрівач Теплообмінник-охолоджувач	2	Теплообмінник BADER BL3-012-12Z. Продуктивність до 4 м ³ /год. Максимальна робоча температура – 130 °С. Матеріал теплообмінника – нержавіюча сталь. Теплообмінник водного типу. Країна виробництва: Австрія (BADER) ⁴
Р-5	Ресивер	1	Ресивер на 500 л. Оснащений запобіжним клапаном СЕ, ручним клапаном зливу конденсату, манометром, отвором повітря. Робочий тиск до 15 бар. Країна виробництва: Італія (FIAC) ⁵

<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>				
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розроб.</i>	<i>Собченко С.А.</i>			
<i>Перевір.</i>	<i>Воронцов О.О.</i>			
<i>Реценз.</i>				
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>			
РОЗДІЛ 11 СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ТАБЛЕТОК НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А			<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>
				<i>Аркушів</i>
			105	115
<i>Кафедра БТМ</i>				

Ф-7	Основний фільтр очистки вентиляційного повітря	1	Фільтр очистки стисненого повітря FYD - 3/4 – 035. Клас чистоти – ISO 7. Матеріал фільтру акрилове волокно, целюлоза. Мінімальна робоча температура 1,5 °С. Максимальна робоча температура 65 °С. Країна виробництва: Італія (Camozzi Group) ⁶
З-8	Змішувач фармацевтичний	1	Змішувач фармацевтичний SBH50. Максимальний об'єм заповнення – 25 кг. Швидкість обертання до 15 об/хв. Потужність двигуна – 0,55 кВт. Розмір (довжина × ширина × висота): 1000 × 1400 × 1200 мм. Країна виробництва: Китай (SBH) ⁷
ТП-9	Таблетпрес	1	Ексцентриковий (однопуансонний) таблетковий прес DP 12. Продуктивність, шт/год до 3600. Потужність двигуна 1,1 кВт. Розмір (довжина × ширина × висота): 450 × 550 × 750 мм. Країна виробництва: Китай (Diapazon-Pharm) ⁸
Б-10	Автоматична блістерна машина	1	Блістерна автоматична машина Alu Alu. Відповідає вимогам стандартів GMP. Виконана з міцної нержавіючої сталі SUS316. Розмір машини: 4460 × 760 × 1620 мм. Швидкість різання (кількість блістерів) – 25-60 раз/хв. Країна виробництва: Китай (Trustar Machinery Technology Co.,Ltd) ⁹
Ф-11	Фасувальна автоматична лінія	1	Фасувальна картонна машина MARYA. Виконано з нержавіючої сталі SUS304. Максимальна продуктивність – до 100 коробок/хв. Країна виробництва: Китай (MARYA) ¹¹

Примітка: 1 - <https://euro-kamin.com.ua/uk/shop/product/vozduhozabornyk-kruglyj-o-125>, 2 - <https://ventfilter.kiev.ua/goods/filtr-vozdushniy-gofrirovanniy-fvg/>, 3 - <https://dnipro-m.ua/tovar/kompressor-vozdushnyj-ac-48/>, 4 - <https://hot-land.com.ua/ua/p14802142-teploobmennik-bader-bl3.html>, 5 - <https://tehno-parts.com.ua/resiver-500-litrov-15-bar-ce>, 6 - <https://www.camozzi.ua/catalog/magistralna-pidgotovka-povitrya/magistralni-filtri/filtri-serii-fyd>, 7 - <https://prom.ua/ua/p1709629118-smesitel-farmatsevticheskij-mikser.html?&primelead=MS43>, 8 - <https://www.diapazon-pharm.ru/single-punch-tablet-press>, 9 - <https://ua.trustarpack.com/blister-packing-machine/mini-type-automatic-blister-packing-machine.html>, 10 - <https://ua.marya-pharmaceutical-solution.com/pharmaceutical-machinery/pharmaceutical-packing-machine/pharmaceutical-cartoning-machine.html>, 11 - <https://ua.marya-pharmaceutical-solution.com/pharmaceutical-machinery/pharmaceutical-packing-machine/pharmaceutical-cartoning-machine.html>

РОЗДІЛ 12

ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Атмосферне повітря забирають через повітрозабірник (ПЗ-1) на висоті 10 м, де концентрація пилових часток і мікроорганізмів є мінімальною.

ДР 1.2. Груба очистка повітря

Від повітрозабірника (ПЗ-1) повітря проходить крізь фільтр грубого очищення (Ф-2), досягаючи ступеня очищення в 90%.

ДР 1.3. Компресування повітря

Повітря стискають в компресорі (К-3), до тиску близько 0,9 МПа. Під час цього процесу температура збільшується, що потребує подальшого охолодження.

ДР 1.4. Охолодження повітря та зменшення надлишкової вологості

Повітря подають до теплообміннику-охолоджувача (Т-4) та знижують температуру приблизно до 19 °С. Ололоджене повітря потрапляє до ресиверу (Р-5) де зріджується зайва волога та видаляється за допомогою клапану. Тим самим вологість знижується до 60%.

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Далі, повітря потрапляє до теплообміннику нагрівача (Т-6) задля зменшення виходу конденсату, а також нагрівання повітря до 20-24 °С.

ДР 1.6. Очищення повітря в головному фільтрі

Одержане підігріте повітря проходить крізь фільтр класу очистки ISO 7 (Ф-7), який очищає повітря до необхідного ступеня чистоти класу С. При цьому, кількість допустимих частинок розміром 0,5-5 мкм має становити 350 000, більше 5 мкм – 2000, а кількість життєздатних мікроорганізмів – 100 КУО/м³.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ</i>			
<i>Змн.</i>	<i>Лист</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		<i>Собченко С.А.</i>			<i>РОЗДІЛ 12 ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОТРИМАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		<i>Воронцов О.О.</i>					107	115
<i>Реценз.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

Одержане очищене повітря подається до виробничих приміщень виготовлення таблеток.

ТП 2. Змішування компонентів таблеток

На технічних вагах (що можуть зважувати до 3 кг з точністю 0,01 г) зважують 2075 г крохмальгліколяту натрію, 2075 г мікрористалічної целюлози, 25 г кремнію діоксиду колоїдного безводного, 1250 г крохмалю кукурудзяного, 1250 г тальку, 62,5 г стеарату магнію та 1986,5 г цекропіну А. Наважки сухих компонентів переносяться до фармацевтичного змішувача (З-8). Встановлюється швидкість перемішування – 15 об/хв. Тривалість змішування – 30 хв. Одержану суху суміш переносять в металеву ємність.

ТП 4. Таблетування лікарського засобу

З ємності, яку було одержано з ТПЗ, до бункеру таблетпресу (Т-9) висипають однорідну змішану суміш. Апарата автоматично дозує суміш по 390 мг на одну таблетку та утворює її шляхом пресування пуансону в матриці. Тривалість таблетування – 8 годин. З серії вилучають 10 таблеток для подальшого якісного та кількісного аналізу згідно аналітично-нормативної документації. Після перевірки на якість партію таблеток складають в металеву ємність.

ПМФ 6. Пакування таблеток цекропіну А в блістери

З ємності, яку було одержано з ТПЗ, до бункеру автоматичної блістерної машини (Б-10), обережно висипають пресовані таблетки. Також, до двох бабін вставляються рулони алюмінієвої фольги та поліетилену для утворення блістерної упаковки. Полімерний лист поліетилену нагрівається, стаючи м'яким та гнучким. Нагрітий лист розтягується і формується за допомогою матриці до необхідної форми блістера. Таблетки подаються до кожної комірки блістера. Додатково працює система вирівнювання часток для правильного розміщення таблеток у блістері. Верхній шар полімерного листа (алюмінієвої фольги) піддається високочастотній запайці, щоб герметично закрити блістер та зафіксувати таблетки усередині. Утворена упаковка охолоджується, щоб забезпечити стійкість та захист від зовнішнього впливу. Тривалість процесу 3 години. Утворені блістери далі конвеєром подаються до наступної стадії.

ПМФ 7. Фасування блістерів в картонні коробки

Блістери автоматично подаються на лінію пакування в коробки (Ф-11). Автомат збирає картонні заготовки та вкладає туди готові блістери та складені інструкції. Після цього, автомат закриває коробку та наносить на неї додаткову інформацію у вигляді номеру партії, дати виготовлення та дати терміну придатності. Тривалість процесу – 3 години.

ПМФ 8. Пакування готової продукції в групову упаковку

Після одержання готового лікарського препарату, одержані коробки вручну складаються в більшу групову картонну коробку. Після цього коробку заклеюють, наносять інформацію щодо назви лікарського препарату та серії і відносять на склад на зберігання при 25 °С.

РОЗДІЛ 13
ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А
ЗГІДНО АНД

Ця аналітично нормативна документація поширюється на лікарський засіб, який являє собою таблетки Цекропіну А по 122 мг.

Склад:

1 таблетка містить 122 мг цекропіну А

Допоміжні речовини: целюлоза мікрокристалічна, кремнію діоксид колоїдний безводний, крохмальгліколят натрію (тип А), крохмаль кукурудзяний, магнію стеарат, тальк

Призначення. Лікування гострого та хронічного циститу.

Форма випуску. По 10 таблеток в блістері.

Специфікація на лікарський засіб наведена в табл. 13.1.

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Визначають візуально.

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

2. Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу.

Випробування виконують згідно вимог ДФУ/ЄФ, 2.9.5

Випробування проводять з використанням автоматичної тест системи Автоматична система AutoTest 4 (див рис. 13.1).



Рис. 13.1. Автоматична система для випробувань таблеток [187].

					НУХТ БТЕК 02.02.18 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата						
Розроб.		Собченко С.А.			РОЗДІЛ 13 ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ЦЕКРОПІНУ А ЗГІДНО АНД					
Перевір.		Воронцов О.О.						Лит.	Арк.	Аркушів
Реценз.									110	115
Н. Контр.								Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.								

СПЕЦИФІКАЦІЯ

Найменування показників контролю	Допустимі межі	Методи контролю
1	2	3
Опис	Круглі, двояковипуклі таблетки, вкриті плівковою оболонкою, від білого до жовтувато-білого кольору	За п. 1 АНД, візуально
Однорідність маси для одиниці дозованого лікарського засобу	250 мг \pm 5 % (від 237,5 мг до 272,5 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 цекропіну А в одній таблетці має бути від 115,9 мг до 128,1 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.

Кожна з випробуваних одиниць таблеток повинні бути в регламентованих межах за масою - $250 \text{ мг} \pm 5 \%$ (від 237,5 мг до 272,5 мг).

3. Висота

Випробування проводять з автоматичної тест системи Автоматична система AutoTest 4 (див рис. 13.1).

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. 3.1).

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. 13.1).

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. 13.2).



Рис. 13.2. Прилад для визначення розпадання таблеток ED-2L [188]

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

Методика дослідження. У кожному з шести трубок кошика поміщують 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 [12]:

Стандартний зразок цекропіну А з визначеною концентрацією – 31,25 мг.

Розчинник – вода.

Тест культура - *E. coli* K12D31.

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

Розрахований вміст цекропіну А в одній таблетці має бути від 115,9 мг до 128,1 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 хвилинах та визначають вміст цекропіну А, відповідним методом кількісного визначення п.7.

Вивільнення цекропіну А 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:

$\sum k \times x / n$, 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 $< 10^3$ КУО; ТУМС $< 10^2$ 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 ПЕТ/алюмінієвому блістері.

По 1 блістеру 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. *E. coli*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
2. Kathayat D., Lokesh D., Ranjit S., Rajashekara G. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. *Pathogens*. 2021, 10(4): 467. <https://doi.org/10.3390%2Fpathogens10040467>
3. *E. coli*. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/e-coli#:~:text=Most%20E.,infections%2C%20respiratory%20illness%20and%20pneumonia.>
4. Edwards B. D., Somayaji R., Greysen-Wong J., Izydorczyk C., Waddell B., Storey D. G., et al. Clinical outcomes associated with *Escherichia coli* infections in adults with cystic fibrosis: a cohort study. *Open forum infectious diseases*. 2020, 7(1): ofz476. <https://doi.org/10.1093%2Fofid%2Fofz476>
5. *E. coli* bacteria exploits Crohn's disease inflammation. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://news.cornell.edu/stories/2022/04/e-coli-bacteria-exploits-crohns-disease-inflammation>
6. Terlizzi M. E., Gribaudo G., Maffei M. E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in microbiology*. 2017, 8: 1566. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2017.01566>
7. Інновації в профілактиці та ліченні інфекцій мочевиводящих путей. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kleemed.com.ua/innovatsii-v-profilaktike-i-lechenii-infektsiy-mochevyivodyashhih-putey/>
8. Як лікувати цистит: симптоми та дієві препарати для боротьби із запаленням сечового міхура. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.apteka24.ua/uk/blog/zdorove-semi/kak-lechit-cistit-simptomy-i-dejstvennye-preparaty-dlya-borby-s-vozpaleniem-mochevogo-puzyrya/>

9. Що таке антибіотикорезистентність. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://phc.org.ua/news/scho-take-antibiotikorezistentnist>
10. Silvestro L., Weiser J. N., Axelsen P. H. Antibacterial and antimembrane activities of cecropin A in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000, 44(3): 602-607. <https://doi.org/10.1128%2Faac.44.3.602-607.2000>
11. Peng J., Wu Z., Liu W., Long H., Zhu G., Guo G., Wu J. Antimicrobial functional divergence of the cecropin antibacterial peptide gene family in *Musca domestica*. *Parasites & vectors*. 2019, 12: 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3793-0>
12. Zhang J., Movahedi A., Wei Z., Sang M., Wu X., Wang M., et al. High-level SUMO-mediated fusion expression of ABP-dHC-cecropin A from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*. 2016, 509: 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.031>
13. Zakharchenko N. S., Furs O. V., Pigoleva S. V., Lebedeva A. A., Shchevchuk T. V., Dyachenko O. V., Buryanov Y. I. Biological activity of leaf extracts from cecropin P1-synthesizing *Kalanchoe plants*: pharmacological prospects. *Journal of Plant Physiology*. 2018, 65: 136-142. <https://doi.org/10.1134/S1021443718010119>
14. Belous A., Trubnikova E., Kljavs Y. Analysis of the influence of transgenic kalanchoe extract with cecropin P1 on the state of a non-infected wound in rats. In *BIO Web of Conferences*. EDP Sciences. 2021, 37, p. 00119. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213700119>
15. Zakharchenko N. S., Furs O. V., Rukavtsova E. B., Tarlachkov S. V., Kosobryukhov A. A., Kreslavski V. D., et al. The *Brassica napus* L. plants expressing antimicrobial peptide cecropin P1 are safe for colonization by beneficial associative microorganisms. *Journal of Plant Interactions*. 2021, 16(1): 432-442. <https://doi.org/10.1080/17429145.2021.1950228>
16. Hashemi S., Niazi A., Baghizadeh A., Taghizadeh M. S. Successful use of *Nicotiana tabacum* hairy roots for the recombinant production of Cecropin A peptide. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2022, 69(3): 876-886. <https://doi.org/10.1002/bab.2158>

17. García-Reina A., Rodríguez-García M. J., Cuello F., Galián J. Immune transcriptome analysis in predatory beetles reveals two cecropin genes overexpressed in mandibles. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2020, 171: 107346. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107346>
18. Mahmoud S., Hassab El-Nabi S., Hawash A., El-Seedi H. R., Khalifa S. A., Ullah S., et al. Curcumin-injected musca domestica larval *Hemolymph*: Cecropin upregulation and potential anticancer effect. *Molecules*. 2022, 27(5): 1570. <https://doi.org/10.3390/molecules27051570>
19. Zhang L., Gui S., Xu Y., Zeng J., Wang J., Chen Q., et al. Colon tissue-accumulating mesoporous carbon nanoparticles loaded with *Musca domestica* cecropin for ulcerative colitis therapy. *Theranostics*. 20, 11(7): 3417. <https://doi.org/10.7150%2Fthno.53105>
20. Lian K., Zhang M., Liang X., Zhou L., Shi Z., Tang Y., et al. Identification and characteristics of a novel cecropin from the armyworm, *Mythimna separata*. *BMC microbiology*. 2020, 20(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01925-1>
21. Kong H., Jing W., Yuan L., Dong C., Zheng M., Tian Z., et al. Bursicon mediates antimicrobial peptide gene expression to enhance crowded larval prophylactic immunity in the oriental armyworm, *Mythimna separata*. *Developmental & Comparative Immunology*. 2021, 115: 103896. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103896>
22. Wu R. C. C., Chang-Chien Y. C., Wang W. J., Cho W. L. Studies of Gene Regulation and Functions of An Antimicrobial Peptide *Aedes aegypti* Cecropin N (AaCECN) with Bactericidal Activity against a Multidrug Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Adaptive Medicine*. 2020, 12(2): 30-41. <https://doi.org/10.4247/AM.2020.ACA244>
23. Ibrahim S., Al-Saryi N., Al-Kadmy I. M., Aziz S. N. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular biology reports*. 2021, 48(10): 6987-6998. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>
24. Kalsy M., Tonk M., Hardt M., Dobrindt U., Zdybicka-Barabas A., Cytrynska M., et al. The insect antimicrobial peptide cecropin A disrupts uropathogenic *Escherichia*

coli biofilms. *NPJ biofilms and microbiomes*. 2020, 6(1): 6. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0116-3>

25. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Pawlikowska-Pawłęga B., Mak P., Luchowski R., Skrzypiec K., et al. Studies on the interactions of neutral *Galleria mellonella* cecropin D with living bacterial cells. *Amino Acids*. 2019, 51: 175-191. <https://doi.org/10.1007/s00726-018-2641-4>

26. Mathew B., Aoyagi K. L., Fisher M. A. *Yersinia pestis* lipopolysaccharide remodeling confers resistance to a *Xenopsylla cheopis* cecropin. *ACS infectious diseases*. 2021, 7(8): 2536-2545. <https://doi.org/10.1021%2Facsinfecdis.1c00275>

27. Maaroufi H., Potvin M., Cusson M., Levesque R. C. Novel antimicrobial anionic cecropins from the spruce budworm feature a poly-L-aspartic acid C-terminus. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2021, 89(9): 1205-1215. <https://doi.org/10.1002/prot.26142>

28. Msaad G. M., Charaabi K., Hamden H., Djobbi W., Fadhl S., Mosbah A., Cherif A. Probiotic based-diet effect on the immune response and induced stress in irradiated mass reared *Ceratitis capitata* males (Diptera: *Tephritidae*) destined for the release in the sterile insect technique programs. *Plos one*. 2021, 16(9): e0257097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257097>

29. Saviane A., Romoli O., Bozzato A., Freddi G., Cappelletti C., Rosini E., et al. Intrinsic antimicrobial properties of silk spun by genetically modified silkworm strains. *Transgenic research*. 2018, 27: 87-101. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0059-0>

30. Ramos-Martín F., Herrera-León C., d'Amelio N. Molecular basis of the anticancer, apoptotic and antibacterial activities of *Bombyx mori* Cecropin A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021, 715: 109095. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109095>

31. Zeng T., Bai X., Liu Y. L., Li J. F., Lu Y. Y., Qi Y. X. Intestinal responses of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel) after ingestion of an entomopathogenic bacterium strain. *Pest management science*. 2019, 76(2): 653-664. <https://doi.org/10.1002/ps.5563>

32. Ali M. K. M., Edosa T. T., Jang H. A., Keshavarz M., Jo Y. H., Han Y. S. Critical roles of *spätzle5* in antimicrobial peptide production against *Escherichia coli* in *Tenebrio molitor* malpighian tubules. *Frontiers in Immunology*. 2021, 12: 760475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.760475>
33. Reid W. R., Zhang L., Gong, Y., Li T., Liu N. Gene expression profiles of the Southern house mosquito *Culex quinquefasciatus* during exposure to permethrin. *Insect science*. 2018, 25(3): 439-453. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12438>
34. Wang J., Ma K., Ruan M., Wang Y., Li Y., Fu Y. V., et al. A novel cecropin B-derived peptide with antibacterial and potential anti-inflammatory properties. *PeerJ*. 2018, 6: e5369. <https://doi.org/10.7717/peerj.5369>
35. Dhania N. K., Chauhan V. K., Chaitanya R. K., Dutta-Gupta A. Midgut de novo transcriptome analysis and gene expression profiling of *Achaea janata* larvae exposed with *Bacillus thuringiensis* (Bt)-based biopesticide formulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*. 2019, 30: 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.02.005>
36. Erviana R., Saengkun Y., Rungsa P., Jangpromma N., Tippayawat P., Klaynongsruang S., et al. Novel Antimicrobial peptides from a cecropin-like region of Heteroscorpine-1 from *Heterometrus laoticus* venom with membrane disruption activity. *Molecules*. 2021, 26(19): 5872. <https://doi.org/10.3390/molecules26195872>
37. Tinoco-Nunes B., Telleria E. L., da Silva-Neves M., Marques C., Azevedo-Brito D. A., Pitaluga A. N., Traub-Csekö Y. M. The sandfly *Lutzomyia longipalpis* LL5 embryonic cell line has active Toll and Imd pathways and shows immune responses to bacteria, yeast and *Leishmania*. *Parasites & Vectors*. 2016, 9(1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1507-4>
38. Ouyang L., Xu X., Freed S., Gao Y., Yu J., Wang S., et al. Cecropins from *Plutella xylostella* and Their Interaction with *Metarhizium anisopliae*. *PLoS One*. 2015, 10(11): e0142451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142451>
39. Yagi-Utsumi M., Yamaguchi Y., Boonsri P., Iguchi T., Okemoto K., Natori S., Kato K. Stable isotope-assisted NMR characterization of interaction between lipid A and sarcotoxin IA, a cecropin-type antibacterial peptide. *Biochemical and Biophysical*

- Research Communications.* 2013, 431(2): 136-140.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.009>
40. Shen D., Ji J., Zhang S., Liu J., An C. A short-type peptidoglycan recognition protein 1 (PGRP1) is involved in the immune response in Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *International Journal of Molecular Sciences.* 2021, 22(15): 8198.
<https://doi.org/10.3390/ijms22158198>
41. Zhao S., Wang X., Cai S., Zhang S., Luo H., Wu C., et al. A novel peptidoglycan recognition protein involved in the prophenoloxidase activation system and antimicrobial peptide production in *Antheraea pernyi*. *Developmental & Comparative Immunology.* 2018, 86: 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.009>
42. Zhang J., Su X., Yang D., Luan C. Label-free liquid crystal biosensor for cecropin B detection. *Talanta.* 2018, 186: 60-64.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.004>
43. Su X., Xu J., Zhang J., Yang D., Huo W., He C. Detection of Cecropin B by liquid-crystal biosensor based on AuNPs signal amplification. *Liquid Crystals.* 2020, 47(12): 1794-1802. <https://doi.org/10.1080/02678292.2020.1729425>
44. Wang M., Huang M., Zhang J., Ma Y., Li S., Wang J. A novel secretion and online-cleavage strategy for production of cecropin A in *Escherichia coli*. *Scientific Reports.* 2017, 7(1): 7368. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07411-5>
45. Zakharchenko N. S., Furs O. V., Pigoleva S. V., Dyachenko O. V., Aripovskii A. V., Buryanov Y. I., Shevchuk T. V. Obtainment and analysis of marker-free oil plants *Camelina sativa* (L.) expressing of antimicrobial peptide Cecropin P1 Gene. *Applied biochemistry and microbiology.* 201, 55: 888-898.
<https://doi.org/10.1134/S0003683819090096>
46. Park A. R., Kim S. W., Kim S. Y., Kwon K. C. Expression of antimicrobial peptide (AMP), cecropin B, in a fused form to SUMO tag with or without three-glycine linker in *Escherichia coli* and evaluation of bacteriolytic activity of the purified AMP. *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* 2021, 13(6): 1780-1789.
<https://doi.org/10.1007/s12602-021-09797-1>

47. Fang Y. T., Li S. Y., Hu N. J., Yang J., Liu J. H., Liu Y. C. Study on cecropin B2 production via construct bearing intein oligopeptide cleavage variants. *Molecules*. 2020, 25(4): 1005. <https://doi.org/10.3390/molecules25041005>
48. Wang M., Zheng K., Lin J., Huang M., Ma Y., Li S., et al. Rapid and efficient production of cecropin A antibacterial peptide in *Escherichia coli* by fusion with a self-aggregating protein. *BMC biotechnology*. 2018, 18(1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0473-7>
49. Wang M., Lin J., Sun Q., Zheng K., Ma Y., Wang J. Design, expression, and characterization of a novel cecropin A-derived peptide with high antibacterial activity. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019, 103: 1765-1775. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09592-z>
50. Zhang L., Li X., Zhan N., Sun T., Li J., Shan A. Maltose induced expression of cecropin AD by SUMO technology in *Bacillus subtilis* WB800N. *The Protein Journal*. 2020, 39: 383-391. <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09908-x>
51. Gong G. L., Wei Y., Wang Z. Z. Functional expression, purification, and antimicrobial activity of a novel antimicrobial peptide MLH in *Escherichia coli*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2018, 48(1): 57-63. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1387562>
52. Thomas D. S., Manoharan C., Rasalkar S., Mishra R. K., Gopalapillai R. Recombinant expression of sericin-cecropin fusion protein and its functional activity. *Biotechnology Letters*. 2020, 42: 1673-1682. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02911-3>
53. Fang Y. T., Lai W. S., Liu J. H., Liu Y. C. Enhanced cecropin B2 production via chitin-binding domain and intein self-cleavage system. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2019, 66(2): 209-215. <https://doi.org/10.1002/bab.1716>
54. Wu C. L., Chih Y. H., Hsieh H. Y., Peng K. L., Lee Y. Z., Yip B. S., et al. High Level Expression and Purification of Cecropin-like Antimicrobial Peptides in *Escherichia coli*. *Biomedicines*. 2022, 10(6): 1351. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061351>

55. Jiang R., Zhang P., Wu X., Wang Y., Rehman T., Yao X., et al. Expression of antimicrobial peptide Cecropin P1 in *Saccharomyces cerevisiae* and its antibacterial and antiviral activity in vitro. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2021, 50: 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.12.006>
56. Cao J., de la Fuente-Nunez C., Ou R. W., Torres M. D. T., Pande S. G., Sinskey A. J., Lu T. K. Yeast-based synthetic biology platform for antimicrobial peptide production. *ACS synthetic biology*. 2018, 7(3): 896-902. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00396>
57. Xia L., Liu Z., Ma J., Sun S., Yang J., Zhang F. Expression, purification and characterization of cecropin antibacterial peptide from *Bombyx mori* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*. 2013, 90(1): 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.02.013>
58. Zhang R., Yu J., Yin X., Ren X., Kong Q. Biocontrol of Postharvest Decay on Cherry Tomatoes by Recombinant Strain GS115/CEC and Its Possible Mechanism. *Food Biotechnology*. 2018, 32(3): 163-177. <https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1443823>
59. Sang M., Wei H., Zhang J., Wei Z., Wu X., Chen Y., Zhuge Q. Expression and characterization of the antimicrobial peptide ABP-dHC-cecropin A in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 2017, 140: 44-51.
60. Song K. D., Lee W. K. Antibacterial activity of recombinant pig intestinal parasite cecropin P4 peptide secreted from *Pichia pastoris*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2014, 27(2): 278-283. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2013.13615>
61. Liu Z., Zhu M., Chen X., Yang G., Yang T., Yu L., et al. Expression and antibacterial activity of hybrid antimicrobial peptide cecropinA-thanatins in *Pichia pastoris*. *Frontiers in Laboratory Medicine*. 2018, 2(1): 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.flm.2018.04.001>
62. Yu W., Gao X. J., Liu Y., Wang Q. Fusion expression of cecropin B-like antibacterial peptide in *Pichia* GS115 and its antibacterial mechanism. *Biotechnology letters*. 2016, 38: 305-312. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1978-y>

63. Agrawal A., Rangarajan N., Weisshaar J. C. Resistance of early stationary phase *E. coli* to membrane permeabilization by the antimicrobial peptide Cecropin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2019, 1861(10): 182990. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.012>
64. Agrawal A., Weisshaar J. C. Effects of alterations of the *E. coli* lipopolysaccharide layer on membrane permeabilization events induced by Cecropin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2018, 1860(7): 1470-1479. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.04.009>
65. Peng J., Mishra B., Khader R., Felix L., Mylonakis E. Novel cecropin-4 derived peptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 2021, 10(1): 36. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010036>
66. Dai J., Zheng J., Ou W., Xu W., Ai Q., Zhang W., et al. The effect of dietary cecropin AD on intestinal health, immune response and disease resistance of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & shellfish immunology*. 2020, 100: 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.052>
67. Hu H., Jiang C., Zhang B., Guo N., Li Z., Guo X., et al. Investigation of morphological changes of HPS membrane caused by cecropin B through scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Journal of Veterinary Science*. 2021, 22(5). <https://doi.org/10.4142%2Fjvs.2021.22.e59>
68. Peng C., Liu Y., Shui L., Zhao Z., Mao X., Liu Z. Mechanisms of Action of the Antimicrobial Peptide Cecropin in the Killing of *Candida albicans*. *Life*. 2022, 12(10): 1581. <https://doi.org/10.3390/life12101581>
69. Muchintala D., Suresh V., Raju D., Sashidhar R. B. Synthesis and characterization of cecropin peptide-based silver nanocomposites: its antibacterial activity and mode of action. *Materials Science and Engineering: C*. 2020, 110: 110712. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110712>
70. Wang W., Liu S., Deng L., Ming J., Yao S., Zeng K. Control of citrus post-harvest green molds, blue molds, and sour rot by the Cecropin A-Melittin hybrid peptide BP21. *Frontiers in microbiology*. 2018, 9: 2455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02455>

71. Vergis J., Malik S. V. S., Pathak R., Kumar M., Sunitha R., Barbuddhe S. B., Rawool D. B. Efficacy of indolicidin, cecropin A (1-7)-melittin (CAMA) and their combination against biofilm-forming multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2020, 12: 705-715. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09589-8>
72. Shrestha A., Duwadi D., Jukosky J., Fiering S. N. Cecropin-like antimicrobial peptide protects mice from lethal *E. coli* infection. *PloS one*. 2019, 14(7): e0220344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220344>
73. Rishi P., Vashist T., Sharma A., Kaur A., Kaur A., Kaur N., et al. Efficacy of designer K11 antimicrobial peptide (a hybrid of melittin, cecropin A1 and magainin 2) against *Acinetobacter baumannii*-infected wounds. *Pathogens and disease*. 2018, 76(7): fty072. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty072>
74. Zhang M., Shan Y., Gao H., Wang B., Liu X., Dong Y., et al. Expression of a recombinant hybrid antimicrobial peptide magainin II-cecropin B in the mycelium of the medicinal fungus *Cordyceps militaris* and its validation in mice. *Microbial Cell Factories*. 2018, 17(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0865-3>
75. Masadeh M. M., AL-Kahsi A. E. A., Haddad R., Alsaggar M., Alzoubi K. H., Sabi S. H., Alrabadi N. An antibacterial novel peptide based on cecropin and MAP-27: Design and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2023, 13(3): 141-152. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2023.62382>
76. Zheng Z., Tharmalingam N., Liu Q., Jayamani E., Kim W., Fuchs B. B., et al. Synergistic efficacy of *Aedes aegypti* antimicrobial peptide cecropin A2 and tetracycline against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017, 61(7): e00686-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00686-17>
77. Wei X. B., Wu R. J., Si D. Y., Liao X. D., Zhang L. L., Zhang R. J. Novel hybrid peptide cecropin A (1–8)-LL37 (17–30) with potential antibacterial activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17(7): 983. <https://doi.org/10.3390/ijms17070983>
78. Ocampo-Ibáñez I. D., Liscano Y., Rivera-Sánchez S. P., Oñate-Garzón J., Lugo-Guevara A. D., Flórez-Elvira L. J., Lesmes M. C. A novel cecropin D-Derived short

cationic antimicrobial peptide exhibits antibacterial activity against wild-type and multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolutionary Bioinformatics*. 2020, 16: 1176934320936266. <https://doi.org/10.1177/1176934320936266>

79. Islam M. M., Kim D., Kim K., Park S. J., Akter S., Kim J., et al. Engineering of lysin by fusion of antimicrobial peptide (cecropin A) enhances its antibacterial properties against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*. 2022: 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.988522>

80. Zhang J., Li, J., Movahedi A., Sang M., Xu C., Xu J., et al. A novel inclusion complex (β -CD/ABP-dHC-cecropin A) with antibiotic properties for use as an anti-*Agrobacterium* additive in transgenic poplar rooting medium. *Enzyme and microbial technology*. 2015, 81: 72-79. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.08.007

81. Zhang J., Movahedi A., Wang X., Wu X., Yin T., Zhuge Q. Molecular structure, chemical synthesis, and antibacterial activity of ABP-dHC-cecropin A from drury (*Hyphantria cunea*). *Peptides*. 2015, 68: 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.011>

82. Zhai Z., Zhang F., Cao R., Ni X., Xin Z., Deng J., et al. Cecropin A alleviates inflammation through modulating the gut microbiota of C57BL/6 mice with DSS-induced IBD. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10: 1595. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01595>

83. Mahdavi A. F., Pirestani M., Dalimi A. Anti-amoebic activity of a cecropin-melittin hybrid peptide (CM11) against trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2019, 131: 427-434. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-01540-9>

84. Sun C. Q., Peng J., Yang L. B., Jiao Z. L., Zhou L. X., Tao R. Y., et al. A cecropin-4 derived peptide c18 inhibits *Candida albicans* by disturbing mitochondrial function. *Frontiers in Microbiology*. 2022: 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.872322>

85. Wei X., Zhang L., Zhang R., Koci M., Si D., Ahmad B., et al. A novel cecropin-LL37 hybrid peptide protects mice against EHEC infection-mediated changes

in gut microbiota, intestinal inflammation, and impairment of mucosal barrier functions. *Frontiers in Immunology*. 2020, 11: 1361. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01361>

86. Abdelkader K., Gutiérrez D., Tamés-Caunedo H., Ruas-Madiedo P., Safaan A., Khairalla A. S., et al. Engineering a lysin with intrinsic antibacterial activity (LysMK34) by cecropin A fusion enhances its antibacterial properties against *Acinetobacter baumannii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2022, 88(1): e01515-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01515-21>

87. Arias D. C. H., Toro L. J., Ramirez G. A. T., Osorio-Méndez J. F., Rodríguez-Carlos A., Valle J., et al. Novel antimicrobial cecropins derived from *O. curvicornis* and *D. satanas* dung beetles. *Peptides*. 2021, 145: 170626. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170626>

88. Gordya N., Yakovlev A., Kruglikova A., Tulin D., Potolitsina E., Suborova T., et al. Natural antimicrobial peptide complexes in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots. *PLoS One*. 2017, 12(3): e0173559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173559>

89. Dosler S., Karaaslan E. Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*. 2014, 62: 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.021>

90. Ebbensgaard A., Mordhorst H., Aarestrup F. M., Hansen E. B. The role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides for the sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Frontiers in microbiology*. 2018, 9: 2153. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02153>

91. Hu H., Wang C., Guo X., Li W., Wang Y., He Q. Broad activity against porcine bacterial pathogens displayed by two insect antimicrobial peptides moricin and cecropin B. *Molecules and cells*. 2013, 35: 106-114. <https://doi.org/10.1007%2Fs10059-013-2132-0>

92. Xu J., Zhong F., Zhang Y., Zhang J., Huo S., Lin H., et al. Construction of *Bacillus subtilis* strain engineered for expression of porcine β -defensin-2/cecropin P1 fusion antimicrobial peptides and its growth-promoting effect and antimicrobial activity.

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2017, 30(4): 576.
<https://doi.org/10.5713%2Fajas.16.0207>

93. Gadwala M., Vootla S., Tewary P. Immune mechanism in silkworm *Bombyx mori* L. *Methods in Microbiology.* 2021, 49: 115-141.
<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2021.04.006>

94. Cecropin A – Potent antimicrobial and anticancer peptide. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.sb-peptide.com/peptide-service/peptide-catalog/antimicrobial-peptides/cecropin-a/>

95. Cecropin A. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Сecropin-A>

96. *E. coli*. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058#:~:text=Escherichia%20coli%20\(E.%20coli\),cramps%2C%20bloody%20diarrhea%20and%20vomiting.](https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058#:~:text=Escherichia%20coli%20(E.%20coli),cramps%2C%20bloody%20diarrhea%20and%20vomiting.)

97. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infection - Annual Epidemiological Report for 2020. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/shiga-toxin-producing-escherichia-coli-stec-infection-annual-epidemiological-0>

98. Kim J. S., Lee M. S., Kim J. H. Recent updates on outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2020, 10: 273. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00273>

99. Hu J., Afayibo D. J. A., Zhang B., Zhu H., Yao L., Guo W., et al. Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Frontiers in Microbiology.* 2022, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1049391>

100. *E. coli* septicemia in broiler carcasses. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://sesc.cat/en/e-coli-septicemia-in-broiler-carcasses/>

101. Wijetunge D. S. S., Gongati S., DebRoy C., Kim K. S., Couraud P. O., Romero I. A., et al. Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing

Escherichia coli (NMEC). *BMC microbiology*. 2015, 15(1): 1-15.
<https://doi.org/10.1186/s12866-015-0547-9>

102. Shah C., Baral R., Bartaula B., Shrestha L. B. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC microbiology*. 2019, 19: 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1587-3>

103. Tanabe R. H., Dias R. C., Orsi H., de Lira D. R., Vieira M. A., Dos Santos L. F., et al. Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* reveals hybrid isolates of uropathogenic and diarrheagenic (UPEC/DEC) *E. coli*. *Microorganisms*. 2022, 10(3): 645. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030645>

104. Behzadi P., Urbán E., Gajdác M. Association between biofilm-production and antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): an in vitro study. *Diseases*. 2020, 8(2): 17. <https://doi.org/10.3390/diseases8020017>

105. Stærk K., Andersen M. Ø., Andersen T. E. Uropathogenic *Escherichia coli* can cause cystitis at extremely low inocula in a pig model. *Journal of Medical Microbiology*. 2022, 71(4): 001537. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001537>

106. Li R., Leslie S. W. Cystitis. *StatPearls Publishing*. 2022.

107. Global Antimicrobial Peptides Market – Industry Trends and Forecast to 2029. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://databridgemarketresearch.com/reports/global-antimicrobial-peptides-market>

108. Antibiotics Market Size. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.fortunebusinessinsights.com/antibiotics-market-104583>

109. Ліки при циститі. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://apteka911.ua/ua/shop/lekarstvennyie-preparaty/tsistit>

110. Гранули. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3051/granuli>

111. Порошки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/900/poroshki>

112. Інфузійні (або еквілібровані) розчини. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3368/infuzijni-abo-ekvilibrovani-rozchini>

113. Супозиторії. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/702/supozitorii>

114. Що краще: капсули чи таблетки? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://3i.ua/scho-krasche-kapsuli-chi-tabletki>

115. What are the different types of pills? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.singlecare.com/blog/pill-form/>

116. ВИДИ УПАКОВКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ – ІНФОРМАЦІЯ ВІД ФАХІВЦІВ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://balenko.com/vydy-upakovky-likarskyh-zasobiv-informacziya-vid-fahivcziv/>

117. Становська, І. І., Становська, І. І., Кравченко, І. А., Кравченко, І. А., Науменко, С. О., Науменко, Е. А., & Монова, Д. А. (2020). Фармацевтичні упаковки на основі фенол-формальдегідного полімеру. Моделювання в прикладних наукових дослідженнях, (8), 35-39.

118. What Materials Are Used in Blister Packaging? [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://completepackaginggroup.com/thermoforming/what-materials-are-used-in-blister-packaging/>

119. АЛЬБЕНТАБС-360 36% ТАБЛЕТКИ (БЛИСТЕР) №100. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://vetopt.com/goods/Albentabs-250-25-h10-TB-v-blisterah-dlya-produktivnyh-zhivotnyh-s-aromatom-myasa-7>

120. ВТОРИННА УПАКОВКА ТАБЛЕТОК – ОПИС І ОСОБЛИВОСТІ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://balenko.com/vtorynna-upakovka-tabletok-opys-i-osoblyvosti/>

121. Ципрофлоксацин таблетки, в/о по 500 мг №10. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/uk/%D0%A6%D0%B8%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BD/6415/#productCardFeatures>

122. Фурадонін таблетки по 100 мг №20 (10x2). [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%A4%D1%83%D1%80%D0%B0%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D0%B8%D0%BD/11504/#productCardFeatures>

123. Нітроксолін таблетки, в/плів. обол. по 50 мг №50 (10x5). [Електронний ресурс].

Режим

доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%9D%D0%B8%D1%82%D1%80%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BD/10973/>

124. Левофлоксацин-Тева таблетки, в/плів. обол. по 500 мг №10 (5x2). [Електронний ресурс].

Режим

доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%9B%D0%B5%D0%B2%D0%BE%D1%84%D0%BB%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BD-%D1%82%D0%B5%D0%B2%D0%B0/35093/#productCardFeatures>

125. Тайгерон таблетки, в/о по 750 мг №5. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%A2%D0%B0%D0%B9%D0%B3%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%BD/7155/>

126. Норфлоксацин-Здоров'я таблетки, в/плів. обол. по 400 мг №10. [Електронний ресурс].

Режим

доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%d0%9d%d0%be%d1%80%d1%84%d0%bb%d0%be%d0%ba%d1%81%d0%b0%d1%86%d0%b8%d0%bd-%d0%b7%d0%b4%d0%be%d1%80%d0%be%d0%b2%d1%8c%d0%b5/24081/#productCardFeatures>

127. Фосфоміцин гранули д/ор. р-ну по 3 г №1 у саше. [Електронний ресурс].

Режим

доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%A4%D0%BE%D1%81%D1%84%D0%BE%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B8%D0%BD/37464/>

128. Монурал гранули д/ор. р-ну по 3 г №1 у пак. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://tabletki.ua/uk/%D0%9C%D0%BE%D0%BD%D1%83%D1%80%D0%B0%D0%BB/8299/>

129. Cecropin A. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://toku-e.com/cecropin-a/>

130. Cecropin A Peptide. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.anaspec.com/en/catalog/cecropin-a-peptide~bf0a69e4-48df-4b4d-9487-a2fdcef680a7>

131. Cecropin A. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/product/sigma/c6830>

132. Cecropin A. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.medchemexpress.com/Cecropin_A.html

133. Cecropin. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://world.taobao.com/item/551670397347.htm>

134. Українське населення у 2023: ООН вказує на 36,7 мільйона осіб. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://slovoproslovo.info/ukrainske-naselennya-v-2023-oon-vkazue-na-36-7-milyoniv-osib>

135. Al-Her H. A. A., Yassin M. M., Mahmood Z. A., Abd B., Abd Al-Sahib A. A. A Comparative Study of Different Antibiotics Against Escherchia Coli Isolated From Urinary Tract Infection By Minimal Inhibitory Concentration Test. *Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020, 18: 83-92

136. Лікування циститу в Києві. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://medikom.ua/lechenie-cistita-kiev/#:~:text=%D0%93%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%80%D1%96%20%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B8%20%D1%86%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B8%D1%82%D1%83%20%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%B2%D0%B0%D1%8E%D1%82%D1%8C%20%D0%B2%D1%96%D0%B4,%D0%B2%D0%B6%D0%B5%20%D0%B7%203%2D5%20%D0%B4%D0%BD%D1%8F>

137. Лікування хронічного циститу. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://mdclinics.com.ua/ua/uslugi/xronicheskij-cistit/>

138. Kakko N., Ivanona N., Rantasalo A. Cell disruption methods. CHEM-E3140 Bioprocess Technology II. 2016: 11-13.

139. Islam, M. S., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. R. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. <https://doi.org/10.3390%2Fmi8030083>

140. Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., Tripathy, B. C., Gupta, V., Sengupta, M., ... & Tripathy, B. C. (2017). Production of recombinant pharmaceutical proteins. Basic and applied aspects of biotechnology, 77-101. https://doi.org/10.1007%2F978-981-10-0875-7_4

141. Gifre, L., Arís, A., Bach, À., & Garcia-Fruitós, E. (2017). Trends in recombinant protein use in animal production. Microbial cell factories, 16, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0654-4>

142. Yang, K., Su, Y., Li, J., Sun, J., & Yang, Y. (2012). Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides. Protein expression and purification, 85(2), 200-203. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.007>

143. Основи біотехнології : підручник для студ. освітнього рівня бакалавр спец. «Біологія» / уклад. Н. Ю. Мацай. – Луганськ : Держ. закл. «Луган. нац. ун-т імені Тараса Шевченка». – Луганськ : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011. – 153 с.

144. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Навч. посібник. –К.:НУХТ, 2022. –373 с.

145. Overview of Continuous Flow Centrifugation. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20160926/Overview-of-Continuous-Flow-Centrifugation.aspx>

146. Continuous flow centrifuge. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Tubular-Centrifuge-Large-Industrial-Centrifugal-Fans_1600595288620.html?spm=a2700.7724857.0.0.19d05621VE7k3l&s=p

147. Руйнування клітин – визначення, методи, застосування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://microbiologynote.com/uk/%D0%BC%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4%D>

0%B8-

%D1%80%D1%83%D0%B9%D0%BD%D1%83%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F-%D0%BA%D0%BB%D1%96%D1%82%D0%B8%D0%BD/#cell-disruption-definition-what-is-cell-disruption

148. Промислові ультразвукові прилади. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.hielscher.com/uk/industry.htm>

149. Industrial basket centrifuge solid liquid separation vertical centrifuge. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.alibaba.com/product-detail/Industrial-Basket-Centrifuge-Solid-Liquid-Separation_1600570199463.html?spm=a2700.7724857.0.0.102d596ePd64fB&s=p

150. High-Salt Loading Conditions. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://trialogbioscience.com/blogs/protein-corner/high-salt-loading-conditions>

151. Different Types of Extraction Buffers and When to Use Them. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://info.gbiosciences.com/blog/different-types-of-extraction-buffers-and-when-to-use-them>

152. Bottom Discharge Centrifuge. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://zzkeda.com/stainless-steel-centrifuge/KDCM-30-stainless-steel-centrifuge.html>

153. Сушильне устаткування. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ukravtonomgaz.ua/blog/sushilne-ustatkuvannya>

154. Сушильна шафа лабораторна СП-30 на 33 л до 300°C з примусовою конвекцією. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://labimpex.com.ua/ua/p97657459-sushilnyj-shkaf-laboratornyj.html>

155. Уровнемер емкостной Liquicap FMI51. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ru.endress.com/ru/Tailor-made-field-instrumentation/uroven/Liquicap-FMI51?t.tabId=product-overview>

156. Лабораторний високоточний кондуктометр MP515. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://spectrolab.com.ua/ua/p1112370670-laboratornyj-vysokotochnyj-konduktometr.html>

157. Golnabi H., Matloob M. R., Bahar M., Sharifian, M. Investigation of electrical conductivity of different water liquids and electrolyte solutions. *Iranian Physical Journal*. 2009, 3-2: 24-28.

158. Ваги лабораторні Axis AD 500. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p386273787-vesy-laboratornye-axis.html>

159. Ваговий аналізатор вологості JS50-5T. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://thermolab.net.ua/ua/p507855157-vesovoj-analizator-vlazhnosti.html?source=merchant_center&gclid=Cj0KCQjwsIejBhDOARIsANYqkD07Qwj5t6S-tCxhUufSmoxXrA7-KiiiFFHY1uwos2jhpriNbJqMr4aAvkzEALw_wcB

160. Yang K., Su Y., Li J., Sun J., Yang Y. Expression and purification of the antimicrobial peptide cecropin AD by fusion with cationic elastin-like polypeptides. *Protein expression and purification*. 2012, 85(2): 200-203. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.007>

161. Microplate Reader DR-200B - LED lamp. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.hiwelldiatek.com/83e428e6-04a7-2038-a480-e403456dcc18/Microplate-Reader-DR-200B-LED-lamp.shtml>

162. The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html>

163. SDS-PAGE 12%. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://static.igem.org/mediawiki/2018/7/70/T--UiOslo_Norway--ProtSDS.pdf

164. SDS-PAGE Protocol. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://static.igem.org/mediawiki/2015/7/78/NEAU15_06-SDS-PAGE.pdf

165. Електрофорез в нативном полиакриламидном геле (PAGE). [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://microbiologynote.com/ru/polyacrylamide-gel-electrophoresis/>

166. Electrophoresis Gel Systems. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.bio-rad.com/featured/en/electrophoresis-gel.html>

167. КЛАСИФІКАЦІЯ ВИРОБНИЧИХ ПРИМІЩЕНЬ. [Електронний ресурс]. Режим доступу:

<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3558/klasifikaciya-virobnichix-primishhen>

168. Кваліфікація чистих приміщень згідно до ISO. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://novations.ua/kvalifikaciya-ta-klasyfikaciya-povitrya-chystyh-primishhen-zgidno-do-iso/>

169. Фільтри Серії FYD. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.camozzi.ua/catalog/magistralna-pidgotovka-povitrya/magistralni-filtri/filtri-serii-fyd>

170. Лебединець, В. О. (2014). Підготовка персоналу підприємства з виробництва лікарських засобів при впровадженні та в умовах функціонування системи управління якістю. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*, (1), 28-35.

171. Сучасні засоби для дезінфекції та гігієни. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/article-sovremennye-sredstva-dlya-dezynfekciy-y-gygyeny>

172. БАЦИЛІКВІД ЛОНГ. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.disinfector.com.ua/ua/catalog_item?attr_id=37185

173. Лізоформін 3000. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://biovet.ua/ua/dezinfitsiruushchee-sredstvo-lizoformin-3000/>

174. Ласепт форте. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://33korovy.com.ua/ua/p1340566387-lasept-forte.html>

175. Терацид, 5 л. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p1798536644-terratsid.html>

176. Біопагdez. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hlorka.in.ua/ua/p967269068-biopagdez.html>

177. Засіб дезінфекційний HEALER концентрат-25%. 5000 мл. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://cosmichno-market.com.ua/dezinficiruyushchie/sterilizacii-instrumentov-poverhnostej/zasib-dezinfekciynij-healer-koncentrat-25-5000-ml/>

178. MDF 100 концентрований засіб для миття підлоги і поверхонь. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://med-line.com.ua/ua/mdf100-5000>

179. Велідез. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.xn--80aaolbmrsqje.com.ua/ua/catalog_item?attr_id=24056

180. CD-AMIN. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.greenpax.com.ua/uk-ua/dezinfektanty/0111198-zasib-universalnyj-dlya-dezinfekciyi-cd-amin-koncentrat-11>

181. Про блістерну упаковку. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://ua.beirenpress.com/news/chinese-blister-packaging-61453301.html>

182. Блістерна Пакувальна Машина Alu Alu. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ua.trustarpack.com/blister-packing-machine/mini-type-automatic-blister-packing-machine.html>

183. Ципрофлоксацин евро таблетки. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tabletki.ua/%D0%A6%D0%B8%D0%BF%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%B%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B0%D1%86%D0%B8%D0%BD-%D0%B5%D0%B2%D1%80%D0%BE/36044/>

184. Змішувач SBH-10. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1709629118-smesitel-farmatsevticheskij-mikser.html?&primelead=MS43>

185. Однопуансонный автоматический таблетпресс. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.diapazon-pharm.ru/single-punch-tablet-press>

186. Фармацевтична Картонна Машина. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://ua.marya-pharmaceutical-solution.com/pharmaceutical-machinery/pharmaceutical-packing-machine/pharmaceutical-cartoning-machine.html>

187. Автоматическая система AutoTest 4. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://dlu.com.ua/%D0%90%D0%B2%D1%82%D0%BE%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F-%D1%81%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%B5%D0%BC%D0%B0-AutoTest-4>

188. Прилад для визначення розпаданя таблеток ED-2L фірми ELECTROLAB. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://unilab.kiev.ua/catalog/tester-tabletok/PribordlyaopredeleniyaraspadaemostitabletokED2LfirmyELECTROLAB/>