

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

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»

«До захисту допущено»

Декан факультету

Завідувач кафедри

(підпис) Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)

(підпис) Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)

« 02 » грудня 2024 р.

« 02 » грудня 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

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

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична
біотехнологія»

на тему: «Біотехнологічні особливості одержання бета-лактамних антибіотиків
для використання у протипухлинній терапії»

Виконала: здобувачка II курсу, групи 1

(прізвище, ім'я, по батькові повністю) КУЦАК Аліна Анатоліївна _____
(підпис)

Керівник ЛИЧ Інна Валентинівна _____
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

(ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Олександр ЖУРАВЛІОВ _____
(ім'я та прізвище) (підпис)

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

Здобувач _____
(підпис)

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 «Промислова та фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри
біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 08 ” жовтня 2024 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

КУЦАК Аліни Анатоліївни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Біотехнологічні особливості одержання бета-лактамних антибіотиків для використання у протипухлинній терапії»

керівник роботи ЛИЧ Інна Валентинівна, доцент, кандидат біологічних наук
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 07 жовтня 2024р. № 876-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 01.12.2024

3. Вихідні дані до роботи: штам *Acetomonium chrysogenum* ВКМФ-4081D для одержання бета-лактамого антибіотика для використання у протипухлинній терапії.

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):

Реферат, Вступ, РОЗДІЛ 1.Огляд літератури РОЗДІЛ 2.Техніко-економічне обґрунтування. РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання цефотаксиму РОЗДІЛ 4. Опис технологічної схеми виділення і очищення цефотаксиму РОЗДІЛ 5. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції. РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 7. Проект заявки на корисну модель

5. Перелік графічного матеріалу Технологічні схеми : після ферментаційних процесів аркуш формату А₁. Апаратурні схеми : після ферментаційних процесів аркуш формату А₁

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 08 жовтня 2024 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.	01.10.24р.- 14.10.24р	
2	РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування.	15.10.24р.- 18.10.24р.	
3	РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання цефотаксиму	19.10.24р.- 20.10.24р.	
4	РОЗДІЛ 4. Опис технологічної схеми виділення і очищення цефотаксиму	21.10.24р.- 24.10.24р.	
5	РОЗДІЛ 5. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції.	25.10.24р- 29.11.24р.	
6	РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва.	30.10.24р.- 04.11.24р.	
7	РОЗДІЛ 7. Проект заявки на корисну модель	05.11.24р.- 08.11.24р.	
8	Оформлення апаратурних та технологічних схем	15.11.24р- 19.11.24р	
9	Оформлення вступу та реферату	20.11.24 р.- 22.11.24р.	

Здобувач _____
(підпис)

Аліна КУЦАК
(ім'я та прізвище)

Керівник роботи _____
(підпис)

Інна ЛИЧ
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Представлено кваліфікаційну роботу одержання бета-лактамних антибіотиків для використання у протипухлинної терапії. Як правило бета-лактамні антибіотики використовуються в онкології для унеможливлення внутрішньо лікарняної інфекції. Однак, деякі з них, мають протипухлинні властивості. Сучасні дослідження підтверджують, що такі властивості характерні для цефотаксиму, хоч він має суто специфічну протипухлинну дію.

Виділення та очищення цефалоспорину С у вигляді цефотаксиму натрієвої солі, при культивуванні штаму *Acetomonium chrysogenum* ВКМФ-4081D для використання у протипухлинній терапії.

Доведено дослідженнями як *in vitro*, так і *in vivo*, що Цефотаксим пригнічує ракові клітини при назофарингеальну карциномі.

Робота складається зі вступу, семи розділів, висновку та списку використаних джерел, технологічної (формат A1) та апаратурної схем (A1). Загальний обсяг роботи – 86 сторінки. Під час написання роботи було використано дані з 70 літературних джерел.

Ключові слова: бета-лактами, цефотаксим, цефалоспорин, антибіотик, штам-продуцент, *Acetomonium chrysogenum* ВКМФ-4081D, біосинтез, виділення.

ABSTRACT

The qualification work on obtaining beta-lactam antibiotics for use in antitumor therapy is presented. As a rule, beta-lactam antibiotics are used in oncology to prevent intrahospital infection. However, some of them have antitumor properties. Current studies confirm that such properties are characteristic of cefotaxime, although it has a very specific antitumor effect.

Isolation and purification of cephalosporin C in the form of cefotaxime sodium salt, when cultivating the *Acetivibrio chrysogenum* BKMF-4081D strain for use in antitumor therapy.

It has been proven by studies both *in vitro* and *in vivo* that cefotaxime inhibits cancer cells in nasopharyngeal carcinoma.

The work consists of an introduction, seven chapters, a conclusion and a list of sources used, technological (format A1) and hardware schemes (A1). The total volume of the work is 86 pages. During the writing of the work, data from 70 literary sources were used.

Key words: beta-lactams, cefotaxime, cephalosporin, antibiotic, producer strain, *Acetivibrio chrysogenum* BKMF-4081D, biosynthesis, isolation.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1.Огляд літератури.....	11
РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування.....	29
2.1. Характеристика цільового продукту.....	29
2.2. Розрахунок потреби у цільовому продукті та річної потужності виробництва.....	36
РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання цефотаксиму	40
3.1. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	44
3.2. Специфікація обладнання	47
РОЗДІЛ 4. Опис технологічної схеми виділення і очищення цефотаксиму..	49
РОЗДІЛ 5. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції	52
5.1. Обґрунтування вибору форми та упаковки лікарського засобу.....	55
5.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання лікарського засобу.....	56
РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва	60
6.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва субстанції	60
6.2. Методи контролю лікарського засобу (іншого цільового продукту)	68
РОЗДІЛ 7. Проект заявки на корисну модель	72
ВИСНОВКИ.....	78
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	79

ВСТУП

Одним з важливих питань медицини сьогодення є зростання кількості захворювань на рак. В останні роки досягнули певного успіху у створенні лікарських засобів, які використовують для лікування злоякісних новоутворень. Медикаментозна терапія має велике значення у лікуванні злоякісних новоутворень, вона покращує дієвість лікування хворих на рак і застосовується у ростущих обсягах. [1]

Станом на початок 2021 року в Україні на обліку в медичних установах перебувають 1 млн 187,6 тисяч пацієнтів з онкологічними захворюваннями. За 2019 рік в Україні було зафіксовано 138 тисяч 509 нових випадків захворювання на рак. Ризик розвитку онкологічних захворювань складає 27,7% для чоловіків і 18,5% для жінок. В Україні злоякісні пухлини вражають кожного четвертого чоловіка і кожну шосту жінку. Рак – це величезна група онкологічних захворювань, яким притаманний неконтрольований та стрімкий ріст клітин, які створюють новоутворення (пухлину). Ігнорування лікування веде до смерті хворого [2,3].

Ракові хвороби займають одну з передових серед причин гибелі в усьому світі. Ракові хвороби є другою причиною смертності у всьому світі. В 2021 році від онкологічних захворювань померло до 9,6 мільйона людей, кількість онокохворих була 18 мільйонів. У наступні 20 років кількість хворих може збільшитись на 60%, попереджає Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ).[4]

Незважаючи на досягнутий прогрес у лікуванні онкологічних захворювань за допомогою сучасних протипухлинних препаратів, більшість з них мають високу системну токсичність та відсутність селективності у відношенні до пухлинних тканин. Тому дана тема є актуальною для більш детального вивчення. [5,6].

					НУХТ БТЕК 02.02.06. КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Вступ	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	Куцак А. А.						7	87
<i>Перевір.</i>	Лич І.В.							
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	Стабніков В.П.							
						Кефедра БТМ /		

Але поряд з цим широке використання антибіотиків має і негативну сторону: повсюдно розвивається стійкість (резистентність) збудників інфекційних захворювань до антибіотиків. Резистентність розвивається в зв'язку з нераціональним призначенням антибіотиків, недотриманням при лікуванні необхідних разових та курсових доз препаратів, широким використанням в народному господарстві. [7] .

Вивчення використання існуючих препаратів, що продаються, і використання їх для нових застосувань є найбільш економічно ефективним способом відкриття ліків. Антибіотики визнані важливими ресурсами для застосування протипухлинних препаратів. Протиракові антибіотики, такі як блеоміцин, мітоміцин, хіноміцин, доксорубіцин та ін., успішно застосовуються в лікуванні раку. Більшість протипухлинних антибіотиків отримують з метаболітів цвілі.

До бета-лактамних антибіотиків відносяться: цефалоспорини та пеніциліни антибіотики, які мають сильну бактерицидну дію з мінімальною токсичністю для клітин людини. Цефалоспоринові антибіотики - це велика група препаратів, що застосовують при лікуванні бактеріальних інфекційних захворювань. Їх основною хімічною структурою є 7-(5-аміно-5-карбоксивалерамідо) цефалоспоранова кислота, яка є метаболітом цвілі *cephalosporium coronarium* .

Цефалоспоринові антибіотики є токсичними для бактерій через пригнічення активності бета-лактамази та синтезу пептидоглікану клітинної стінки. Labay E та ін. повідомили, що цефалоспорин підсилює дію іонізуючого випромінювання шляхом посилення пошкодження ДНК , ймовірно, через утворення активних форм кисню (АФК). Повідомляється, що β -лактами спричиняють мітохондріальну дисфункцію та надлишок АФК у клітинах ссавців. Ці ефекти, викликані антибіотиками, призводять до окисного пошкодження ДНК, білків і мембранних ліпідів. Shi L і Fang J повідомили, що клітини NPC мають вищий базальний рівень АФК порівняно з нормальними клітинами, а підвищення рівня АФК вважається токсичним для ракових клітин. Тому нам цікаво знати, чи можуть цефалоспоринові антибіотики також сприяти

цитотоксичності ракових клітин, особливо NPC [8] .

Однією з ключових проблем у дослідженні раку є те, як ефективно вбивати ракові клітини, залишаючи здорові клітини недоторканими. Ракові клітини часто мають дефекти в механізмах загибелі клітин, що є однією з головних причин стійкості до терапії. Щоб забезпечити ріст, ракові клітини виявляють підвищену потребу в залізі порівняно зі звичайними нераковими клітинами. Ця залежність від заліза може зробити ракові клітини більш вразливими до некрозу, каталізованого залізом, який називається фероптозом. Ідентифікація схвалених FDA препаратів як індукторів фероптозу породжує великі надії щодо потенціалу фероптозу як нового багатообіцяючого способу знищення стійких до терапії ракових захворювань.

Найчасніше в медицині застосовують антибіотики, що відносяться до групи азотовмісних гетероциклічних сполук, їх молекули мають різні кільцеві структури. Серед цієї групи найбільший практичний інтерес представляють β -лактамі антибіотики (пеніциліни і цефалоспорини), що містять β -лактаміне кільце. [7,9] .

Як правило бета-лактамі антибіотики використовуються в онкології для унеможливлення внутрішньо лікарняної інфекції. Однак, деякі з них, мають протипухлинні властивості. Сучасні дослідження підтверджують, що такі властивості характерні для цефотаксиму, хоч він має суто специфічну протипухлинну дію.

Цефалоспорини швидко проникає в тканини і можуть започаткувати терапію у випадках, коли потрібна оперативна антибіотикотерапія, що важливо в умовах імуносупресії. Цефотаксим виробляється в Україні на існуючих потужностях та може бути використаний, як протипухлинний препарат за значно нижчою ціною ніж існуючі.

Протипухлинні антибіотики – для клінічного використання на сьогодні допущено лише декілька антибіотиків: з групи антрациклінів – доксорубіцин (адрианаміцин), акларубіцин і рубоміцин (даунорубіцин); з групи актиноміцинів – актиноміцини С і Д; з групи ауреолової кислоти – олівоміцин; з групи

стрептонігрин – брунеоміцин [10] .

Метою даної роботи є проектування ділянки виробництва цефалоспорину С при культивуванні штаму *Acremonium chrysogenum* ВКМФ-4081D, для подальшого його транспортування до фармацевтичного підприємства, де відбуватиметься хімічний синтез цефотаксиму.

Актуальність теми: цефотаксим, через свої протипухлинні властивості, становить інтерес для вирішення проблеми лікування раку, так як дана хвороба набуває все ширшого розповсюдження по усій планеті, а також в Україні.

Новизною роботи є : багато антибіотиків, отриманих з метаболітів цвілі, мають антиканцерогенні властивості. Цефалоспоринові антибіотики показали високоспецифічну та селективну протипухлинну дію на клітини назофарингеальної карциноми *CNE2* як *invitro*, так і *vivo* з мінімальною токсичністю Цефотаксим, як специфічний та селективний протипухлинний препарат для лікування карциноми носоглотки. Механістично показано, що індукція ферроптозу через індукцію *HMOX1* опосередковує протипухлинну активність цефотаксиму.

РОЗДІЛ 1.Огляд літератури

Антибіотики для лікування пухлин

Класифікація пухлин за клінічним перебігом:

– доброякісні пухлини – зрілі новоутворення , які мають перевагу тканинного атипізму, ці пухлини відрізняються ростом, чітко відокремлені від інших тканин, нагадуючи тканину, з якої походять, вони, як правило, не метастазують і не мають загального впливу на організм, але можуть піддаватися малігнізації;

– злоякісні пухлини – незрілі новоутворення з перевагою клітинного атипізму, які відрізняються безмежним інфільтративним (проростають крізь навколишні тканини) ростом, метастазуванням і значною відмінністю від тканини, з якої вони походять, значно впливають на організм. [10,11]

Маштабне використання антибіотичних препаратів на протязі десятиліть в широкому масштабі, з санітарно-гігієнічними заходами, спричинило зниження кількості хворих на інфекційні хвороби.

Масове застоування антибіотиків також має і негативні наслідки: набувається резистентність збудників інфекційних захворювань до препаратів. Стійкість розвивається тому , що нераціонально призначають антибіотики, порушують спосіб та дози застосування, поширено застосовують в тваринництві та птахівництві. Розповсюдження стійких форм мікроорганізмів підкреслює потребу створення та використання у лікуванні нових дієвих препаратів, здійснювати контроль застосування даних препаратів на основі попередньої ідентифікації виділених збудників захворювання , визначати чутливість до антибіотиків. [1].

Найбільш широко в медицині використовуються антибіотики, які відносяться до групи азотовмісних гетероциклічних сполук, молекули яких містять різноманітні кільцеві структури.

					НУХТ БТЕК 02.02.06. КР ПЗ				
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>					
<i>Розроб.</i>		Куцак А. А.			Розділ 1. Огляд літератури		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркуші</i>
<i>Перевір.</i>		Лич І.В.						11	87
<i>Реценз.</i>							Кефедра БТМ ¹¹		
<i>Н. Контр.</i>									
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.							

Серед цієї групи найбільший практичний інтерес представляють β -лактамі антибіотики (пеніциліни і цефалоспорини), що містять β -лактаміне кільце. Антибіотики цієї групи представлені як природними, так і напівсинтетичними препаратами, що володіють високою клінічною ефективністю і низькою токсичністю. Механізм дії β -лактамічних антибіотиків спрямований на порушення синтезу клітинної стінки бактерій. [2]

Протипухлинні антибіотики – для клінічного використання на сьогодні допущено лише декілька антибіотиків: з групи антрациклінів – доксорубіцин (адрианаміцин), акларубіцин і рубоміцин (даунорубіцин); з групи актиноміцинів – актиноміцини С і Д; з групи ауреолової кислоти – олівоміцин; з групи стрептонігрини – брунеоміцин.

Антибіотик нанаоміцин активний проти грам-позитивних бактерій, мікоплазми, грибів та має антималярійну активність, аеробно синтезується продуцентом *Streptomyces rosa* var. *notoensis*. В останній час показана ефективність нанаоміцину А для лікування ракових захворювань [12].

Актиноміцети є активними продуцентами вторинних метаболітів з біологічною активністю. До вторинних метаболітів відносять протипухлинні (такі як, доксорубіцин та блеоміцин), протигрибкові (такі як, амфотерицин В та ністатин), імунодепресанти (такі як, FK-506 та рапаміцин), інсектициди (наприклад, спиносин А та авермектин В), гербіциди (наприклад, фосфінотрицин) та інші антибіотики, які мають клінічне та комерційне значення.

Продуценти антибіотичних речовин можуть бути ізольовані з найрізноманітніших субстратів: ґрунт, рослинні і тваринні рештки, мул, вода озер і рік, повітря і т.ін. Ґрунт є найбільш багатим на організми, які утворюють антибіотики. З ґрунту зачасту виділяють продуценти для антибіотиків.

Продуцентами антибіотиків є:

- бактерії
- актиноміцети
- гриби .

Якщо брати до уваги міцеліальні гриби, то плісєневі гриби, є

продуцентами бета-лактамних антибіотиків, а саме - пеніциліну і цефалоспорину.

Антрацикліни

Антрацикліни, створені мікроорганізмами, вони належать до роду *Streptomyces*. Їх продуцентами є актиноміцети *Str.coeruleorubidus*, *Str.Peuceticus*, *Actionomadura carminata*.

Особливість структури антрациклінових антибіотиків дозволяє їм утворювати комплекси з парами Уотсона-Крика в структурах ДНК, тобто вони інгібують їхній біосинтез. На цьому заснована їх протипухлинна дія. Незважаючи на чисельні спроби одержувати їх хімічним синтезом, природні представники залишилися більш ефективними.

Антрациклінові антибіотики (даунорубіцин, ідарубіцин, доксорубіцин, епірубіцин) відносяться до числа найбільш ефективних протипухлинних засобів. Даунорубіцин і доксорубіцин виділяють з культур *Streptomyces peucetius caesius*, ідарубіцин отримують синтетичним шляхом [13] .

Антрацикліни мають тетрациклінові кільцеві структури з даунозаміною групою, приєднаною глікозидним зв'язком. Вони є багатофункціональними похідними антрахінону і складаються з аглікону (4 кільця, з'єднаних один з одним) та цукрової частини. [3,4]

Антрациклінові антибіотики застосовуються в хіміотерапевтичному лікуванні раку, такого як лімфобластний лейкоз. Причина їхньої активності проти раку невідома, але, швидше за все, є результатом інтеркаляції ДНК антрациклінового антибіотика [4].

Єдина структурна відмінність між доксорубіцином і даунорубіцином полягає в тому, що бічний ланцюг доксорубіцину закінчується первинним спиртом, тоді як дауноміцин закінчується метильною групою [3].

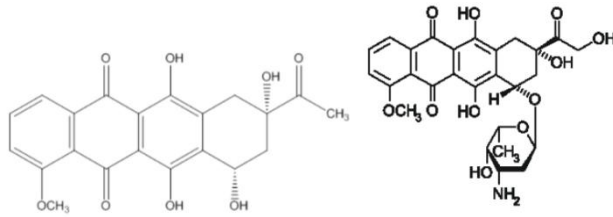


Рис.1.1.Хімічні структури антибіотиків

Першим виділеним антрацикліном був даунорубіцин (також званий дауноміцин), отриманий із бактеріального штаму *Streptomyces peucetius*. Іншим антрацикліном, який також широко використовується в онкології, є доксорубіцин (Adriamycin®)[14] .

Найбільш дослідженими антрацикліновими антибіотиками є доксорубіцин та дауноміцин. Широкого поширення в біотехнології даних антимікробних сполук набули методи генної інженерії, а саме методи генетичної експресії генів, які передбачають використання генетичної інформації для синтезу функціонального продукту (наприклад, білка).

Таким чином, в 2020 році було досліджено надмірну експресію гену, що кодує глікозилтрансферазу - DnrS у *Streptomyces peucetius*, як окремо так і разом з допоміжним білком DnrQ (P450 білок, який функціонує як алостеричний активатор ферментів). Таке інженерне рішення призвело до збільшення виходу антибіотику відповідно у 1,2 або 2,8 рази порівняно з контролем. Інактивація DnrQ або DnrS призвела до накопичення аглікону родоміцинону, демонструючи значущість обох генних продуктів для глікозилювання родоміцину D, що є попередником даунорубіцину. А надмірна експресія генів, які кодують ферменти TDP-D-глюкозосинтази (наприклад, DesIII) та TDP-D-глюкоза-4,6-дегідратаза (наприклад, DesIV) збільшила вихід доксорубіцину в 2,6 рази. Комбінована надмірна експресія desIII/desIV та dnrQ/dnrS продемонструвала синергетичне збільшення у 5,6 разів [5].

В 2011 році було створено новий генно-інженерний штам, *S. venezuelae* YJ028, який міг синтезувати одразу декілька антрациклінових антибіотиків, а саме доксорубіцин, даунорубіцин, родоміцин та епірубіцин. Геномні ДНК (ДНК, які містяться в хромосомах та відповідають за інформацію про спадковість) для

модифікації *S. venezuelae* YJ028 були отримані з різних актиноміцетів: *S. peucetius* ATCC 29050, *S. venezuelae* ATCC 15439 та ISP 5230, *S. avermitilis* K139, *S. galilaeus* ATCC 31615, *S. fradiae* ATCC 19609 та інших. В загальному, було отримано гени, які кодують наступні ферменти: нуклеотидилтрансфераза, 4,6-дегідратаза, 2,3-дегідратаза, 3-амінотрансфераза, епімераза, 4-кеторедуктаза, метилтрансфераза, N-метилтрансфераза, 3-кеторедуктаза, пара-глікозилтрансфераза/допоміжний білок (див. вище), 10-карбометокси-13-дезоксикарміноміцин естераза, карміноміцин-о-метилтрансфераза, цитохром P450 монооксигеназа. Всі ці ферменти мають велике значення у синтезі антрациклінових антибіотиків, адже лежать у корні схеми біотрансформації за якою і проходить синтез. Експресію генів проводили за допомогою *Escherichia coli* DH5 α [6,7].

Для деяких антибіотиків нині розглядають їх альтернативних продуцентів. В 2018 році розглядали *Nonomuraea rhodomycinica* NR4-ASC07 як одного з ймовірних промислових продуцентів антибіотику родоміцину. Даний ізолюваний штам може синтезувати майже 9,0 мг/л антибіотику, що робить його доволі привабливим біологічним агентом. Звичайним продуцентом даної антимікробної речовини вважається *S. purpurascens* [8,9].

Streptomyces globisporus 1912 є продуцентом антрациклінового антибіотика ландоміцину Е. Відомо, що антибіотики такої хімічної природи широко застосовуються в хіміотерапії пухлин, але це використання часто обмежене їх значною токсичністю .

Ногаламіцин

Streptomyces nogalater є продуцентом протипухлинного антрациклінового антибіотика ногаламіцину [15]. Серед продуктів деградації ногаламіцину та (S)-ногаміцину найбільш цікавими є 7(S)- та 7(R)-О-метилногаларол і 7(S)- та 7(R)-О-метилногарол. Ці сполуки з «R»- конфігурацією є більш ефективними щодо P388 лейкемії, ніж їхні «S»-ізомери, хоча така відмінність не спостерігалась у протипухлинній дії на клітини лінії В16 меланоми [16]. Серед усіх тестованих похідних ногаламіцину лише 7(R)-О-метилногарол (меногарил) проявив

найвищу активність щодо трьох типів клітин пухлинних ліній, тому цей препарат було обрано для подальших досліджень і клінічної оцінки [15,17].

Вчений Климишин Д.О. присвятив роботу визначенню експресії генів *snorA* і *relA* у клітинах *S. nogalater* продуцента антрациклінового антибіотика ногаломіцину, хімічні модифікації якого сьогодні використовуються в хімієтерапії ракових захворювань. Використанням міжродової кон'югації з *E. coli* ET12567 (pUB307), плазмиди pKCAII та pVWBA1 були перенесені в клітини штамів *S. nogalater* Lv65 та UV33, а також штамів *S. echinatus* та *S. peucetius*. За умов коекспресії регуляторних генів у складі олігокопійної плазмиди pKCAII та інтегративної pVWBA1 спостерігається зростання синтезу ногаламіцину в штамів Lv65 та UV33. Також досліджено, що гетерологічна експресія *snorA* і *relA* у складі pKCAII та pVWBA1 в клітинах *S. echinatus* LV 22 та *S. peucetius subsp. caesius* підвищує продукцію аранціаміцину та доксорубіцину, відповідно. [18]

Ногаламіцин переважно одержують шляхом екстракції поживного середовища, на якому росте *S. nogalater*, проте також робилися спроби синтезувати цю сполуку хімічним способом. За допомогою хімічної деградації молекули ногаламіцину одержано низку сполук, які знайшли широке застосування у лікуванні ракових захворювань [19].

Для продуцента ногаламіцину розроблена система селекції мутантних штамів з підвищеним рівнем синтезу антибіотика. З використанням різних поживних середовищ на основі вівсяної, кукурудзяної та соєвої круп як основних постачальників джерел живлення, досліджено мінливість окремих клонів *S. nogalater* за антибіотичною мінливістю. Оптимальним для росту й оцінки рівня антибіотичної активності цього штаму виявилось соєве середовище [20].

У наступній роботі Федоренко В.О. та співавтори отримали патент на спосіб отримання штамів *Streptomyces nogalater* – надпродуцентів ногаламіцину. Вони вдосконалили спосіб отримання штамів *S. nogalater*, шляхом експресії плейотропного регуляторного гена *relA*, клонованого у складі інтегративного

вектора pRTAI та автономного вектора pКСЕАП, що дає можливість спростити спосіб конструювання надпродуцентів ногаламіцину [18].

Доксорубіцин

Продуцентами доксорубіцину можуть бути штами *Streptomyces peucetius* 33-24, *S. peucetius* SIPI-DU-1557 та *S. peucetius* SIPI-11. *S. peucetius* 33-24 має суттєву перевагу над іншими, оскільки виявляє найбільшу здатність до синтезу доксорубіцину (1100 мг/л).

S. peucetius 33-24 є аеробом, здатним до росту і розмноження за оптимальної температури 28 °С (мезофіл). Бактерії здатні рости при рН 5,2 – 7,0, оптимальний рН 6,2 (ацидофіл). Оскільки штам *S. peucetius* 33-24 є аеробом, процес культивування має проходити в аеробних умовах, відповідно ферментер повинен бути оснащений барботером. Аерація 1 об/об*хв забезпечить культуру потрібною кількістю кисню [21].

Різні дослідження підтверджують, що гени *doxR*, *doxB*, *doxI*, *doxX*, *doxA*, *doxS*, *doxO*, *doxI*, *doxN*, *doxD*, *doxV* та *doxAB* частково або повністю впливають як на вихід кінцевої концентрації доксорубіцину та/або даунорубіцини, так і на їх активність. Наявність цих генів підтверджує, що біологічний агент здатний синтезувати один або обидва з зазначених антибіотиків. Також, існує ген, який інактивує синтез зазначених антибіотиків – *wblA* [22,23].

Бета-лактамі антибіотики

Бета-лактамі антибіотики — це антибіотики, що мають у своїй структурі бета-лактаміне кільце.

Антибіотики β-лактаміного класу взаємодіють із бактеріальними клітинами, порушуючи синтез клітинної стінки, що спричиняє бактеріоліз. Однак з урахуванням зростаючого рівня резистентності бактерій виникає необхідність постійного вдосконалення та розширення антибіотичних препаратів для подолання цієї проблеми.

Бета-лактамі антибіотики є широко використовуваними лікарськими препаратами для лікування бактеріальних інфекцій. Ця класифікація включає пеніциліни, цефалоспорини, карбапенеми та монобактами. Основне застосування

цих антибіотиків охоплює наступні аспекти [10].

Лікування бактеріальних інфекцій: бета-лактамі антибіотики використовуються для лікування широкого спектру бактеріальних інфекцій, включаючи респіраторні, сечостатеві, шкірні, м'які тканини та інші види інфекцій.

Профілактика інфекцій: вони можуть також використовуватися для профілактики інфекцій перед хірургічними втручаннями або у випадках імунодепресії.

Лікування нозокоміальних інфекцій: бета-лактамі антибіотики застосовуються для лікування інфекцій, які виникають в лікувальних закладах (нозокоміальні інфекції), такі як пневмонія, сепсис та інші ускладнені стани. Лікування відомих штамів бактерій: враховуючи різноманітність беталактамічних антибіотиків, їх використовують для лікування конкретних видів бактерій, таких як стафілококи, стрептококи, кишкові палички, гонококи тощо.

Дослідження цефалоспоринів

Найбільш багатим на організми, що утворюють антибіотики, є ґрунт. З нього найчастіше і виділяють продуценти антибіотиків.

Цефалоспорини - антибіотики, що утворюються грибами з роду *Cephalosporium*. Основний продуцент цих антибіотиків - гриб *C. acremonium*, пізніше перейменований в *Acremonium chrysogenum*. Препарати цього типу, що входять до групи бета-лактамів, відрізняються надзвичайною стійкістю до беталактамаз, що суттєво підвищує їхню протимікробну ефективність.

Для хімічної модифікації усіх цефалоспоринів спочатку синтезуємо цефалоспорин С. Його синтезують такі штами *T. variabilis*, генномодифіковані штами *E. Coli* і штами *A. chrysogenum*, які синтезують найбільшу кількість цефалоспорину С серед усіх продуцентів. Для того, щоб провести порівняння штамів *A. chrysogenum* синтезувати цефалоспорин С і для обрання перспективнішого з них, було обрано дані штами – *A. chrysogenum* RNCM F4081D, *A. chrysogenum* M35 і *A. chrysogenum* HC3.

Цефалоспорини – антибіотики, які продукуються мікроміцетом

Cephalosporium acremonium. Основна відмінність цефалоспоринів – висока антибактеріальна активність та мала токсичність. Хімічна структура цефалосоринів така, що з них можна отримувати велику кількість модифікованих антибіотиків. Цефалоспорини — антибіотики, що утворюються грибами роду *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*). В культуральній рідині *Cephalosporium acremonium* він виявив три варіанти цефалоспоринів: Р, N і С. Цефалоспорин С — основний антибіотик, на його основі створили безліч напівсинтетичних препаратів з важливими функціями. Цефалоспорини пригнічують розвиток грампозитивних і грамнегативних бактерій, але їх антибіотична активність нижча, ніж у пеніцилінів. [10].

Цефалоспоринові антибіотики використовуються у клінічній практиці з початку 60-х років ХХ ст. Синтезовано більше 50 представників цієї групи антибіотиків. Ядром молекули цефалоспоринів є 7-аміноцефалоспоринова кислота. За хімічною будовою належить до В-лактамних антибіотиків, близьких до пеніциліну, в біосинтезі основного ядра (цефемового) приймають участь дві амінокислоти L-цистеїн, L-валін.

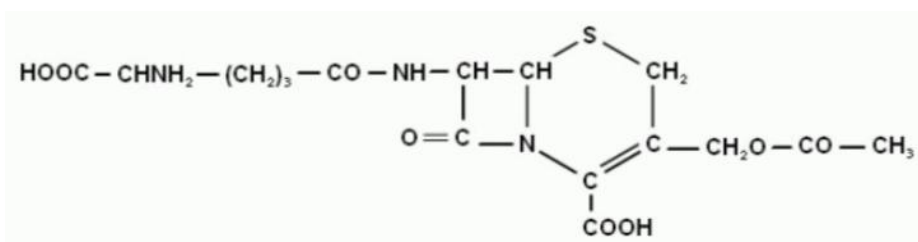


Рис.1.2. Цефалоспорин

Цефалоспорини – антибіотики, що утворюються грибами роду *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*). В культуральній рідині *Cephalosporium acremonium* він виявив три варіанти цефалоспоринів: Р, N та С. Цефалоспорин С головний антибіотик, на основі якого було створено багаточисельні напівсинтетичні препарати з цінними властивостями. За біологічною активністю цефалоспорини відрізняються від пеніцилінів. Цефалоспорини пригнічують розвиток грампозитивних і грамнегативних бактерій, але їхня антибіотична активність нижча ніж у пеніцилінів. Продуцент – *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*).[10]

Механізм біосинтезу цефалоспорину.

Первинні стадії біосинтезу пеніциліну і цефалоспорину ідентичні. До ізопеніциліну N. Лише після цього шляхи розходяться. Пеніцилін N перетворюється в деацетоксицефалоспорин. Далі за дії ферменту гідроксилази утворюється деацетилцефалоспорин. Який ферментом ацетил-Ко-трансферазою перетворюється у цефалоспорин С.

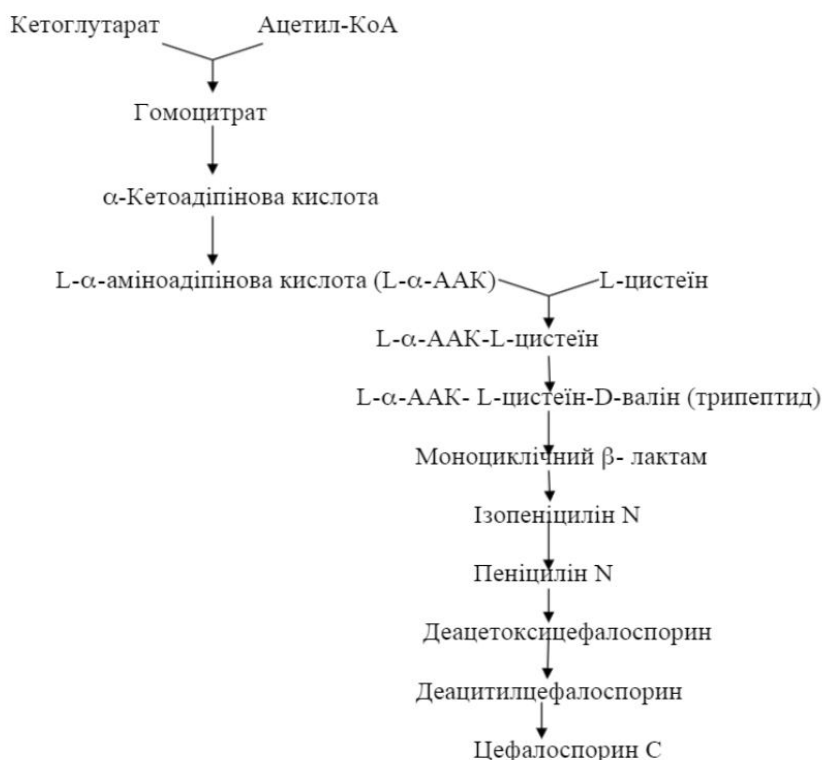


Рис.1.3. Напівсинтетичні цефалоспорини

Вихідною речовиною для отримання напівсинтетичних цефалоспоринів є 7-аміноцефалоспоранова кислота, яку отримують в результаті відщеплення від молекули цефалоспорину аміноадіпінової кислоти під дією фермента ацилази.

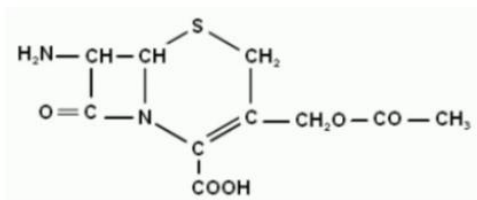


Рис.1.4. 7-аміноцефалоспоранова кислота

Для хімічної модифікації усіх цефалоспоринів необхідно синтезувати мікробіологічним шляхом їх попередник – цефалоспорин С. Його синтезують такі штами *T. variabilis* [11], *E. coli* [12], *A. chrysogenum*, наведені штами

синтезують максимальну кількість цефалоспоринової С в порівнянні з іншими штамми та продуцентами. Щоб зрівняти між собою можливості штамів *A. chrysogenum* синтезувати цефалоспорин С і зробити вибор найкращого з них продуцента, було обрано таких представників – *A. chrysogenum* RNCM F4081D, *A. chrysogenum* M35 і *A. chrysogenum* HC3 [26].

Пошук продуцентів нових антибіотиків триває. Величезні перспективи для отримання високопродуктивних штамів відкриваються у зв'язку з розвитком новітніх методів клітинної і генетичної інженерії. Окрім удосконалення природи мікроорганізмів-продуцентів антибіотичних речовин, оптимізації апаратури і технологій, велике значення для отримання нового спектру препаратів, що володіють цінними властивостями порівняно з початковими, має, так звана, модифікація антибіотиків і створення напівсинтетичних препаратів. Отримані мікробіологічним шляхом антибіотики піддають хімічній модифікації, внаслідок якої можливе здобуття препаратів з більш вираженою фізіологічною дією.

Розуміючи необхідність використання антибіотиків, слід розробляти і використовувати нові методи їх синтезу, що в даний час і відбувається.

Покоління цефалоспоринів

Залежно від спектра індивідуальної протимікробної активності розрізняють цефалоспорини:

- I покоління (цефадроксил, [цефазолін](#), [цефалексин](#), цефалотин, цефалірін, цефалоридин, цефрадин);
- II покоління (цефаклор, цефамандол, цефметазон, цефоніцид, цефотетан, цефокситин, цефпрозил, цефтрибутон, [цефуроксим](#), цефуроксим-аксетил, лоракарбеф, цефпрозил);
- III покоління (цефіксим, [цефоперазон](#), [цефотаксим](#), цефподоксим-проксетил, [цефтазидим](#), цефтризоксим, [цефтріаксон](#), моксалактам, цефетамет-повоксил);
- IV покоління ([цефепім](#), цефпіром, цефклідин, цефквіном, цефозопран, цефозеліз).

- V покоління (цефтаролін та цефтобіпрол)

Препарати I покоління проявляють активність проти грампозитивних мікроорганізмів, тоді як інші покоління проявляють підвищену активність проти грамнегативних аеробів.

Діють бактерицидно, викликаючи швидкий лізис бактерій. Механізм дії - пошкодження клітинної мембрани бактерій, які діляться, що зумовлено специфічним інгібуванням ферментів, які є пеніцилінпоєднувальними білками (ППБ). Конгруентність деяких цефалоспоринів із ППБ у різних мікроорганізмах допомагає пояснити різні спектри активності в цьому класі антибіотиків. Зниження проникності стінки бактерії й деформація ділянки зв'язування з ППБ сприяють бактеріальній резистентності. Особливістю цефалоспоринів I покоління є висока антистафілококова активність, у т.ч. проти *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis*, які утворюють пеніциліназу, а також *Streptococcus pneumoniae*, стрептококів групи B і бета-гемолітичного стрептокока групи A, гонококів. До чутливих грамнегативних організмів належать *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* і *Shigella*.

Цефалоспорини II покоління ефективні проти всіх мікроорганізмів, на які впливають препарати I покоління і мають додаткову активність проти *Branhamellacatarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Acinetobacter*, *Serratia*; *Bacteroides fragilis* чутливий до цефотетану і цефокситину. У цих препаратів більш виражена протимікробна активність до грамнегативної флори, але вони менш ефективні проти грампозитивних коків порівняно з препаратами I покоління.

Цефалоспорини III покоління мають ще більший спектр дії, особливо проти грамнегативних мікроорганізмів, включаючи штами, стійкі до Ц. I і II поколінь (псевдомонади, бактероїди та ін.), однак у них менше виражена грампозитивна активність, ніж у препаратів I та II поколінь. Препарати III покоління активні проти *Citrobacter*, *Serratia* і *Providencia*, а також проти бета-лактамазопродукуючих штамів *Haemophilus* і *Neisseria*. Цефтазидим і цефоперазон активно застосовують проти *Pseudomonas aeruginosa*. Як і Ц. II

покоління, препарати III покоління гідролізуються хромосомною бета-лактамазою, яку виробляє *Enterobacter*, і не мають достовірної активності проти штамів *Enterobacter*. Цефтизоксим і моксалактам мають активність проти *Bacteroides fragilis*. Важливою властивістю для більшості Ц. III покоління (крім цефоперазону і цефіксиму) є їх здатність проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр.

Цефалоспорини IV покоління характеризуються ще ширшим спектром дії, ніж препарати I–III поколінь, причому вони однаково високоактивні відносно грамнегативної й грампозитивної флори. Цефалоспорини IV покоління впливають на мультирезистентні мікроорганізми, стійкі до дії бета-лактамаз розширеного спектра і високоефективні відносно анаеробів. Це пов'язано з високою спорідненістю препаратів з ППБ, що дозволяє їм легко проникати крізь мембрану клітини і створювати високі концентрації всередині клітини. Із зони дії цих препаратів випадають бактероїди, тому для розширення впливу їх комбінують із карбоксипеніцилінами, метронідазолом та ін.

Цефалоспорини V покоління цефтаролін та цефтобіпрол активні проти метицилін-резистентного *S. aureus* (MRSA), стрептококів, стійких до пеніциліну, ампіцилін-чутливого *Enterococcus faecalis*, який продукує бета-лактамазу. Їх активність щодо інших грампозитивних коків та грамнегативних паличок подібна до активності цефалоспоринів 3-го покоління. Цефалоспорини 5-го покоління не діють на види *Pseudomonas*.

Продуцентом антибіотиків цефалоспоринового ряду є *A. chrysogenum*, що синтезує попередник усіх можливих цефалоспоринів – цефалоспорин С.

Поява цефаласпоринів пов'язана роботами професора бактеріолога Джузеппе Братц, якому в 1945 р. вдалося добути гриб *Cephalosporium acremonium* (нині іменований *Acremonium chrysogenum*) з морської води, отриманої поблизу зливу стічних вод в Сардинії. Після відкриття іншим вченим вдалося з продуктів обміну *A. chrysogenum* виділити бактерицидну субстанцію – цефаласпорин С, що стала вихідною речовиною для одержання 7-

аміноцефалоспоринової кислоти (7-АЦК) – структурної основи цефалоспоринових антибіотиків.

Цефтолозан — антибіотик широкого спектра дії, що належить до групи цефалоспоринів V покоління. Як і інші β-лактамі антибіотики діє бактерицидно. Механізм дії препарату полягає у порушенні синтезу клітинної стінки бактерій. Препарат є активним проти наступних мікроорганізмів: стрептококи, *Escherichia coli*, клебсієли, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*; нечутливими до препарату є стафілококи та *Enterococcus* spp. Цефтолозан схвалений для клінічного застосування у США в грудні 2014 року, а в Європейському Союзі у вересні 2015 року.

Цефтобіпрол

Цефтобіпрол, на даний час, є найефективнішим антибіотиком цефалоспоринового ряду. Синтез цефтобіпролу з цефалоспорину C відбувається хімічною модифікацією останнього, шляхом зміни бічних радикалів, таким же чином синтезується і всі інші антибіотики цефалоспоринового ряду. Цефалоспорин C використовується, в якості субстанції, для отримання антибіотиків цефалоспоринового ряду шляхом хімічної модифікації двох вільних радикалів даної сполуки. Дана речовина синтезується різними штамми міцеліальних грибів *A. chrysogenum* у стаціонарній фазі росту. *A. chrysogenum* RNCM F4081D, *A. chrysogenum* M35 і *A. chrysogenum* HC3.

Штам міцеліального гриба *A. chrysogenum* M35 належить до строгих аеробів, тому в процесі його культивування необхідний постійний доступ кисню у ферментаційний простір. Повітря повинно бути стерильним і подаватися за допомогою барботажноаерліфтною системи, щоб унеможливити руйнування міцелію в процесі культивування, але через те, що даний гриб росте при $t=27^{\circ}\text{C}$ і $\text{pH}=7$ можуть розвиватися нейтрофільні і мезофільні мікроорганізми, які є контамінуючим фактором в процесі культивування, тому обов'язковим етапом підготовки повітря є його знезараження.

A. chrysogenum M35 як джерело вуглецю і енергії може використовувати глюкозу, суміш глюкози, галактози та інших цукрів з водоростей, а також різні напівсинтетичні субстрати. До складу поживного середовища, що використовується для вирощування *A. chrysogenum* M35, входить гідролізат водоростей, в складі якого наявна суміш цукрів (переважно, глюкози і галактози). Згідно Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), катаболізм глюкози буде відбуватися за шляхом гліколізу.

Цефтобіпрол – цефалоспорин з бактерицидною активністю відносно широкого спектра грампозитивних бактерій, включаючи резистентні до метициліну види стафілококів, чутливі до ампіциліну *Enterococcus faecalis* та резистентні до пеніциліну *Streptococcus pneumoniae*. Цефтобіпрол активний також щодо багатьох грамнегативних бактерій, включаючи штами *Enterobacteriaceae* та *Pseudomonas aeruginosa*.

Цефтобіпрол стійкий до гідролізу пеніциліназами *S. aureus*, а також до гідролізу багатьох бета-лактамаз класу C та класу A, що продукуються грамнегативними бактеріями. Як і більшість цефалоспоринів, цефтобіпрол гідролізується бета-лактамазами розширеного спектра (ESBL), серинкарбапенемазами і метало-бета-лактамазами. До цефтобіпролу чутлива велика кількість видів мікроорганізмів (*Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Morganella morganii*, види родин *Neisseria* та *Providencia*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Streptococcus lugdunensis*, *Streptococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, стрептококи групи *Viridans* та ін.). Не чутливі до цефтобіпролу збудники групи *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium*, види родин *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Proteus vulgaris*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Цефтобіпрол, на даний час, є найбільш ефективним антибіотиком цефалоспоринового ряду. Синтез цефтобіпролу з цефалоспоринової С відбувається хімічною модифікацією останнього, шляхом зміни бічних радикалів, таким же чином синтезується і всі інші антибіотики цефалоспоринового ряду [18]

Сті́йкість до антибіотиків

Існує два типи стійкості до антибіотиків: природна і набута.

Природна стійкість є видовою ознакою. Вона притаманна всім представникам даного виду і не залежить від первинного контакту (контактів) з даним антибіотиком, в її основі немає ніяких специфічних механізмів. Найчастіше така резистентність пов'язана з відсутністю мішеней для даного антибіотика, обумовлена дуже слабкою проникністю клітинної стінки або цитоплазматичної мембрани або іншими причинами.

Набута стійкість виникає у окремих представників даного виду бактерій лише в результаті зміни їхнього геному. Можливі два варіанти генетичних змін. Один з них пов'язаний з мутаціями в тих чи інших генах бактеріальної хромосоми, внаслідок чого продукт гену, що атакується, перестає бути мішенню для даного антибіотика. Це відбувається або через зміну структури білка, або тому, що він стає недоступним для антибіотика. В іншому випадку бактерії стають стійкими до одного або декількох антибіотиків завдяки отриманню додаткових генів, носіями яких є R-плазміді. [10].

Набуваючи стійкість до антибіотика, а тим більше до декількох антибіотиків, такі бактерії отримують значні переваги: завдяки селективному тиску антибіотиків відбувається витіснення чутливих до них штамів даного виду, а стійкі варіанти виживають і починають відігравати головну роль в епідеміології даного захворювання. Саме тому вони і стають джерелами формування тих клонів, які забезпечують епідемічне поширення збудника. Вирішальна роль в розповсюдженні стійкості, в тому числі і множинної, належить R-плазмідам завдяки їхній здатності до самопереносу.

Слід відмітити, що на сьогоднішній день більше 60 % збудників інфекційних захворювань є стійкими до більшості антибіотиків, а за прогнозами

ВООЗ через 10-12 років резистентність до антибіотичних препаратів буде притаманна переважній більшості мікроорганізмів . Причини розвитку антибіотикорезистентності бактерій за даними літератури полягають у генних мутаціях, в результаті яких обмін речовин мікроорганізму змінюється таким чином, що блоковані антибіотиком реакції більше не являються критичними для життєдіяльності мікроорганізму або бактерії набувають здатності «викачувати» антибіотик з клітини [28].

Антибіотикорезистентність - це стійкість бактерій до одного або кількох антибіотиків.

Мікроорганізми можуть розвивати резистентність, і вони її розвивають. Є два шляхи набування бактерією резистентності. Перший — шляхом мутації генів, другий — шляхом набування резистентності від інших бактерій (рисунок). Перший шлях проявляється, наприклад, при неоптимальному антимікробному лікуванні (субоптимальні препарати, субінгібіторні концентрації). Другий шлях проявляється тоді, коли при низькому рівні ерадикації залишаються стійкі бактерії, які можуть передати резистентну інформацію іншим, раніше чутливим збудникам. [29]

Таким чином, загроза виникнення «епідемії резистентності» робить актуальним пошук альтернативних шляхів боротьби з інфекційними захворюваннями.

Вимоги до протипухлинних антибіотиків

Протипухлинні антибіотики мають важливе значення в онкологічній медицині для лікування пухлин. Основні вимоги до протипухлинних антибіотиків включають:

- Медикамент повинен бути ефективним у виявленні та знищенні пухлинних клітин, забезпечуючи лікувальний ефект для пацієнтів. Значний антимікробний ефект в умовах організму. Зберігання антимікробної дії у різних умовах середовища, фізіологічних рідин та тканин організму

- Протипухлинний антибіотик повинен бути специфічним до пухлинних клітин, маючи мінімальний вплив на здорові тканини. Відсутність або низькій рівень токсичності препарату та продуктів його руйнування в організмі
- Важливо, щоб протипухлинний антибіотик мав низьку токсичність для організму пацієнта та не спричиняв серйозних побічних ефектів.
- Деякі протипухлинні антибіотики можуть використовуватись у комбінації з іншими препаратами для підвищення їх ефективності.
- Повільний розвиток стійкості у процесі застосування

Забезпечення виконання цих вимог допомагає забезпечити успішне лікування пацієнтів з онкологічними захворюваннями. [30,31] .

РОЗДІЛ 2. Техніко-економічне обґрунтування

2.1. Характеристика цільового продукту

Цефотаксим — це бета-лактаміний антибіотик, він має широкий діапазон антимікробної дії. Діє бактерицидно; пригнічуючи синтез клітинної стінки бактерій, як і інші β-лактаміні антибіотики. Нові дослідження також довели протипухлинну дію Цефотаксиму, завдяки цьому він є найефективнішим антибіотиком цефалоспоринового ряду [32].

Цефотаксим — це (6R,7R)-3-(ацетилоксиметил)-7-[[(2Z)-2-(2-аміно-1,3-тіазол-4-іл)-2-метоксиіміноацетил]аміно]-8-оксо-5-тіа-1-азабіцикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбонова кислота. Синтез Цефотаксиму з цефалоспорину С відбувається хімічною модифікацією останнього, шляхом зміни бічних радикалів, таким же чином синтезується і всі інші антибіотики цефалоспоринового ряду.

Діюча речовина: цефотаксим (у вигляді цефотаксиму натрієвої солі стерильної) – 500 мг або 1000 мг. [33]

Хімічна назва: Cefotaximesodium. Цефотаксим натрій.

Хімічна формула: $C_{16}H_{17}N_5O_7S_2 \cdot Na$.

Молекулярна маса: 455,46548 г / моль.

Структурна формула Цефотаксиму:

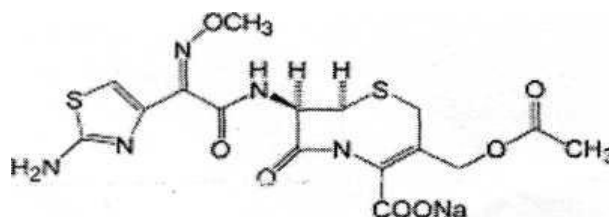


Рис.2.1.1. Структурна формула Цефотаксиму

Агрегатний стан: Твердий.

Температура (діапазон) плавлення: 162-163 °С.

					НУХТ БТЕК О2.02.06. КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Куцак А. А.			Розділ 2. Техніко-економічне обґрунтування	Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.		Лич І.В.					29	87
Реценз.						29		
Н. Контр.						Кефедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Температура (діапазон) кипіння: Не досягається через розкладання.

Розчинність у воді: Добре розчиняється. Розчинність у жирах: Інформація не виявлена. Розчинність в інших розчинниках: Помірно розчиняється у метанолі, слабо – у діетиловому ефірі.

Змішування (речовина-вода, 20 ° С): Змішується.

Водневий показник: рН = 4,5-6,5 (10% водний розчин).

Запах: Відсутній.

Реакційна здатність: Окислюється.

Форма випуску: Білий чи жовтуватий кристалічний гігроскопічний порошок. [33]

Цефалоспорини (*Cephalosporins*) — це бета-лактамі антибіотики, в структурі є 7-аміноцефалоспоринова кислота. Їх мол. м. 400–450 МЕ, розчинні у воді, сталі до зміни температури та рН. За хімічним походженням і фармакологічно схожі з пеніцилінами. У структурі антибіотика є бета-лактаміне кільце, що володіє здатністю інгібування синтезу пептидоглікану клітинної стінки. Антибіотики використовуються в лікуванні інфекцій, викликаних грам (-) бактеріями. Вони пригнічують ферменти в клітинній стінці чутливих бактерій, що порушує синтез клітинної стінки. Один з найбільш великих класів антибіотиків. Завдяки високій ефективності та низькій токсичності вони набули широке розповсюдження. Характерна особливість цефалоспоринів — висока антибактеріальна активність і низька токсичність. Хімічна структура цефалоспоринів така, що з них можна отримувати велику кількість модифікованих антибіотиків [34].

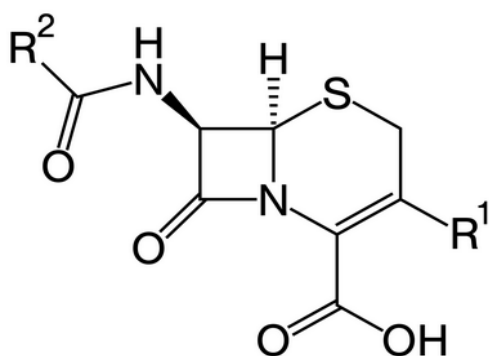


Рис.2.1.2. Структура цефалоспоринів

Продуцентом цеф С або 7-АЦК, метаболітів які є основою для хімічного синтезу цефалоспоринових антибіотиків є нитчасті гриби *Acremonium chrysogenum* (Рис. 1.1.3.). Вони є мезофілами, температурний діапазон 25-28 °С, вони є аеробами. При культивуванні рівень рН середовища має бути в межах 5,4-5,7. При культивуванні рівень рН середовища повинен складати 5,4-5,7. Мають хемоорганогетеротрофний спосіб живлення. [18,19].

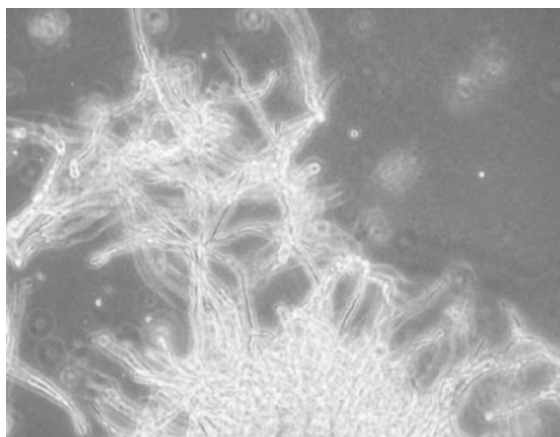


Рис. 2.1.3. *Acremonium chrysogenum* культивована у рідкому поживному середовищі [37].

Для отримання антибіотика Цефотаксиму будемо використовувати новий штам-продуцент антибіотика *Acremonium chrysogenum* ВКМФ-4081D. *Acremonium chrysogenum* ВКМФ-4081D культивують на ферментаційних поживних середовищах, що містить джерела вуглеводів - глюкозу, Кукурудзяний крохмаль, декстрин, джерела азоту - кукурудзяний екстракт, Фармамедиа, сульфат аммонія, а також неорганічні солі - фосфорнокислий калій, сірчаноокислий калій, крейда, сірчаноокисла мідь, сірчаноокислий цинк, сірчаноокислий марганець, сірчаноокисле залізо, а в якості рослинного жиру - рапсове масло і допоміжно фосфатидилхолін і/або сітостерин.

Продуцент збільшує вихід антибіотика в 2 рази, а також на 20% скорочує час ферментації. Процес виділення та очищення цефаласпорина С з гриба-продуцента з роду *Acremonium* задокументовано і проведено багато досліджень. Відома здатність різних штамів *Acremonium chrysogenum* до біосинтезу цефаласпорина С. Одним із близьких є штам *Acremonium chrysogenum* 12/9 [34].

Штам *Acremonium chrysogenum* VKMF-4081D має такі культурально-морфологічні ознаки на середовищі складу, г/л: бакто-пептон - 10, мальтоза 40, мальт-екстракт сухий 20 г на 15 добу росту має діаметр колонії 0,7 мм. Має при піднятті колонії, конусоподібні, трохи плікативні, молоді колонії володіють голкоподібною поверхнею, колір ніжний, кремовий, пігментацією не володіють, повітряний міцелій не розвирнений. Помітний ріст відбувається при 28 °C дець на 8 добу інкубації. На вищенаведеному середовищі з додаванням 0,1% метіоніну на 15 добу росту діаметр колоній в середньому 0,9 мм. Колонії при піднятті, слабо нерегулярно складчасті, світло бежевого відтінку, повітряний міцелій практично відсутній, пігменту в середу не виділяють [36].

Зростання штаму *A. chrysogenum* найбільш помітне на 4 добу при зростанні на поживному середовищі TSA складу, г/л: агар – 15, казеїновий пептон – 15, NaCl – 5, соєвий пептон – 5 [37].

Вперше цефаласпорини згадані в роботах професора Джузеппе Братц, який був бактеріологом. В 1945 р. йому вдалося винайти гриб *Cephalosporium acremonium* (нині іменованій *Acremonium chrysogenum*) із води моря, взятої в Сардинії, поруч із стічними водами. Після даного відкриття інші вчені змогли з продуктів обміну *A. chrysogenum* виділити бактерицидну субстанцію – цефаласпорин С, яка стала вихідною речовиною для одержання 7-аміноцефалоспоринової кислоти (7-АЦК) – структурної основи цефаласпоринових антибіотиків.

Цефалоспорин С синтезують такі штами: *T. variabilis* [38], *A. Chrysogenum*, *E. coli* [39], вони синтезують найбільше цефалоспорину С серед всіх інших продуцентів. Щоб порівняти здатність штаму *A. chrysogenum* синтезувати цефалоспорин С, а також щоб обрати найпродуктивніший продуцент, обрали такі варіанти – *A. chrysogenum* RNCM F4081D, *A. chrysogenum* M35 і *A. chrysogenum* HC3 [40].

Штам *A. chrysogenum* RNCM F4081D отримують шляхом 11тициклічного мутагенезу дикого штамму ATCC 11550 з використанням диметилсульфату, етиленіміну, Nнітрозонметилсечовинита Nнітрозонметилбіурета, послідовно.

Концентрація цефалоспорину С, при такій модифікації, збільшується у 100 разів, порівняно з диким штамом . Проводячи УФопромінення штаму *ATCC20339* виділяють штам *A. chrysogenum M35*. Штам *A. chrysogenum HC3* зберігали в суспензії з 20%им гліцерином при 20°C , його предоставила компанія CSPC Hebei Zhongrun Pharmaceutical Co Ltd, [40,41,42].

Основною ознакою вирощення штаму *M35* виділяють приготування гідролізату гліцерину та водоростей (сухих). Щоб отримати гідролізат : висушуємо 100г/л водоростей, потім доливаємо 37%ої соляної кислоти , щоб в сумі було 100 мл.

Перед початком приготування гліцерину обираємо технічний чи очищений гліцерин будемо використовувати .

До складу гідролізату входять вуглеводи 9,94% (з них 55% це глюкоза і 45% галактоза), протеїнм 56,61%, клітковина становить 0,64%, ліпіди 4,55%а також зола 7,86%. Гідролізат постачає азот та вуглець.

Із очищеним гліцерином вміст цефалоспорину С буде 7,1 г/л, але його вища, в порівнянні з вартістю гліцерину технічного. Технічний гліцерин отримується як відходи при виробництві біодизелю, це є перевагою. При його застосуванні концентрація цефалоспорину С - 6,7 г/л, що тільки на 0,4 г/л менше за концентрацію попереднього гліцерину. Дана відмінність не є впливовою, тоді для культивування *A. chrysogenum M35* будемо брати технічний гліцерин .

Багато антибіотиків, отриманих з метаболітів цвілі, мають антиканцерогенні властивості. Цефалоспоринові антибіотики показали високоспецифічну та селективну протипухлинну дію на клітини назофарингеальної карциноми *CNE2* як *in vitro*, так і *in vivo* з мінімальною токсичністю [32] .

Назофарингеальна карцинома (NPC) — це злоякісна пухлина, спричинена декількома генами, залученими до синергічного ефекту генетичних факторів і факторів навколишнього середовища , і її виникнення тісно пов'язане з інфекцією вірусу Епштейна–Барра (EBV) .

NPC характеризується високою агресивністю та метастатичним

потенціалом , а частота метастазування в лімфатичних вузлах досягає 60–80%. Завдяки широкому застосуванню променевої терапії з модульованою інтенсивністю в лікуванні NPC рівень локального контролю та загальна виживаність значно покращилися. Однак дистальні метастази залишаються основною причиною смерті від NPC . Тому необхідно терміново вивчити потенційні механізми прогресування та метастазування NPC, ідентифікувати специфічні біомаркери та розробити нові терапевтичні стратегії для NPC [43].

Назофарингеальна карцинома - це епітеліальна карцинома, яка виникає зі слизової оболонки носоглотки. У носоглотці пухлина часто спостерігається на глотковій западині (ямка Розенмюллера). Незважаючи на те, що карцинома носоглотки та інші епітеліальні пухлини голови та шиї походять від подібних клітинних або тканинних ліній, вони чітко відрізняються [44].

Отже, *Acremonium chrysogenum VKMF-4081D* найефективніший штам, який може синтезувати цефалоспорин С. Він має найбільшу концентрацію серед розглянутих штамів, та має низьку вартість, що має вагоме значення. У даній кваліфікаційній роботі пропонується використовувати *Acremonium chrysogenum VKMF-4081D*, як продуцент цефалоспорину С.

Цефалоспорини швидко проникає в тканини і можуть започаткувати терапію у випадках, коли потрібна оперативна антибіотикотерапія, що важливо в умовах іммуносупресії. Доведено дослідженнями як *in vitro*, так і *in vivo*, що Цефотаксим пригнічує ракові клітини при назофарингеальну карциномі.

Цефотаксим натрію суттєво регулював 11 протипухлинних відповідних генів у клітинах *CNE2* залежно від концентрації. Аналіз шляху вказує на апоптоз і сигнальні шляхи *ErbB-MAPK-p53* значно збагачені. *HMOX1* представляє найкращий ген з підвищеною регуляцією за COS і збігається з 16 із 42 збагачених апоптотичних сигнальних шляхів. Інгібування *HMOX1* значно знижувало протипухлинну ефективність цефотаксиму в клітинах *CNE2* [32] .

Дане відкриття підкреслює потенціал цефалоспоринових антибіотиків ,

а саме Цефотаксиму, як специфічного та селективного протипухлинного препарату для лікування карциноми носоглотки. Механістично показано, що індукція ферроптозу через індукцію *HMOX1* опосередковує протипухлинну активність цефотаксиму. Наші результати забезпечують альтернативне лікування карциноми носоглотки, показуючи, що існуючі цефалоспоринові антибіотики є специфічними та селективними протипухлинними препаратами

Огляд ринку протипухлинних препаратів.

Таблиця 2.1.1. Огляд ринку існуючих протипухлинних препаратів

Препарат	Виробник	Торгова назва	Країна
Дактиномицин	ЦЕЙЛОН ЛАБС	Дактиномицин 0,5 мг №1	Індія
Мітоксантрон	ФАРЕВА Унтерах ГмбХ	Мітоксантрон "Ебеве" 2 мг/мл (20 мг) по 10 мл №1	Австрія
Доксорубіцин	СИНДАН ФАРМА С.Р.Л.	Доксорубіцин-Віста 2мг/мл флакон 25мл №1	Румунія
	ЕБЕВЕ ФАРМА ГЕС.М.Б.Х	Доксорубіцин 2 мг/мл флакон 25 мл (50 мг) №1	Австрія
Епірубіцин	Сіндан Фарма С.Р.Л.	Епірубіцин-Віста розчин д/ін. 2 мг/мл (50 мг) №1	Румунія
	ФАРЕВА Унтерах ГмбХ	Епірубіцин "Ебеве" 2 мг/мл (50 мг) №1	Австрія
Блеоміцин,	ТОВ «Люм'єр Фарма»,	Блеоцин-С по 15000 МО №1	Україна
	Ніппон Каяку Ко.	Блеоцин по 15 мг №1	Японія
Мітоміцин	Медак ГмбХ	Мітоміцин Медак 20 мг	Німеччина
Цефотаксим	ПАТ "Борщагівський -ХФЗ"	Цефотаксим-БХФЗ по 1000 мг №1	Україна
	ПАТ «Київмедпрепарат».	Цефотаксим по 1 г №10	Україна
	ПАТ «Лекхім-Харків»	Цефотаксим по 1 г №1	Україна
	ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»	Цефотаксим-Дарниця по 1 г №1	Україна
	ACS DOBFAR	Цефотаксим ВІСТА 1г №10	Італія

Проаналізувавши дані літератури щодо проблеми резистентного до використовуючи протипухлинних антибіотиків, робимо висновок ,що потрібно підбирати нові препарати. Одним із нових досліджень є застосування Цефотаксиму для лікування ракових пухлин. Цефотаксим суттєво регулював 11 протипухлинних відповідних генів у клітинах CNE2 залежно від концентрації. Аналіз шляху вказує на апоптоз і сигнальні шляхи ErbB-МАРК-p53 значно збагачені. НМОХ1 представляє найкращий ген з підвищеною регуляцією за COS і збігається з 16 із 42 збагачених апоптотичних сигнальних шляхів. Інгібування НМОХ1 значно знижувало протипухлинну ефективність цефотаксиму в клітинах CNE2 [32] .

Дане відкриття підкреслює потенціал цефалоспоринових антибіотиків , а саме Цефотаксиму, як специфічного та селективного протипухлинного препарату для лікування карциноми носоглотки. Механістично показано, що індукція ферроптозу через індукцію НМОХ1 опосередковує протипухлинну активність цефотаксиму. Дані результати забезпечують альтернативне лікування карциноми носоглотки, показуючи, що існуючі цефалоспоринові антибіотики є специфічними та селективними протипухлинними препаратами [32].

Також важливою перевагою використання цефотаксиму є те, що він поширено виробляється в Україні та по доступний по ціні , від 19,91 грн до 29,00 грн за 1 флакон, що значно нижче за інші протипухлинні антибіотики [45].

2.2. Розрахунок потреби у цільовому продукті та річної потужності виробництва.

Станом на початок 2021 року в Україні на обліку в медичних установах перебувають 1 млн 187 тисяч пацієнтів з онкологічними захворюваннями [46] .

За статистикою НКРУ, в 2021 р. в Україні було зареєстровано 120 055 нових випадків захворювання на рак (56 781 у чоловіків і 63274 у жінок) та 53 009 смертей від ЗН (29 534 чоловіки і 23 475 жінок). До даної статистики не враховані випадки хворих, які знаходяться на окупованих територіях Луганської та Донецької областей – через відсутність інформації.

Серед дітей в 2021 році було 886 захворілих на ЗН, з них 398 дівчат та 488 хлопців. 174 дитини померло від ракових захворювань[45,47] .

Прогнозуюча кількість використання цефотаксиму в протипухлинній терапії може варіюватися в залежності від типу пухлини, стадії хвороби, пацієнтських характеристик та інших факторів.

Серед зазначеної кількості захворювань представлені випадки захворювань як для дітей так і дорослих, враховуючи що дозування препарату передбачає внесення певної кількості на 1 кг особи, в подальших розрахунках розглядатимемо лише доросле населення, так як середню вагу для дітей за віковою групою буде складно передбачити. З огляду на зазначену інформацію, в статистичних даних кількість захворювань для осіб від 18 років та старше становить 1 млн 145 тисяч випадків онкологічних захворювань .

Так як зазначені дані представлені на 2021 рік, а враховуючи що наявна кількість населення значно менша, слід провести перерахунок для цього спочатку визначимо на який відсоток зменшилась чисельність населення України і в подальшому на даний відсоток зменшимо кількість випадків онкологічних захворювань, так як кількість захворювань по рокам не сильно відрізнялась.

В 2021 році чисельність населення України становила 41 270 899 осіб, а так як офіційна інформації по чисельності населення України на сьогодні відсутня приймемо дані ООН, за якими станом на 1 січня 2024 року чисельність населення України становить 37 441 000 осіб , отже відсоток на який зменшилась кількість населення становить [45,47] :

$$100 - 37\,441\,000 / 41\,270\,899 * 100 = 9,27 \%$$

Визначивши відсоток на який зменшилась чисельність населення України, визначимо теоретичну кількість людей з онкологічними захворюваннями у 2024 році :

$$1\,870\,000 - 9,27 \% = 1\,696\,651 \text{ чол.}$$

Спосіб застосування та дози Цефотаксиму. Цефотаксим призначають внутрішньом'язово та внутрішньовенно, струминно і краплинно.

Оскільки лікування онкологічних захворювань Цефотаксимом ще не проводяться, то візьмемо за приклад по аналогії особливостей дозування Доксорубіцину, рекомендована стандартна доза доксорубіцину становить 20-30 мг/м² площі поверхні тіла у вигляді одноразової внутрішньовенної дози протягом 3х діб кожні 3-4 тижні. Сумарна курсова доза незалежно від схеми лікування не повинна перевищувати 550 мг/м².

Для розрахунків лікування онкологічних захворювань Цефотаксимом приймаємо за середню дозу – 25 мг/м².

Середня вага дорослих українців становлять 80 кілограмів (чоловіки) та 70 кілограм (жінки). Далі для розрахунку беремо середню вагу між чоловіками та жінками – 75 кг. Для дорослої людини, що важить 75 кілограм, середній показник ППТ (Площа поверхні тіла) – 1,75 м² (для жінок – 1,6, для чоловіків – 1,9) [31].

Добова доза для однієї людини:

$$1,75 * 25 \text{ мг} = 43,75 \text{ мг}$$

Отже, для лікування однієї людини на курс 3 дні потрібно забезпечити (під час розрахунку терміну лікування брався один курс):

$$43,75 \text{ мг} * 3 = 131,25 \text{ мг}$$

Отже, для лікування українців з онкологічними захворюваннями у 2024 році потрібно (під час розрахунку терміну лікування брався один курс 3 дні):

$$1\ 696\ 651 * 131,25 \text{ мг} = 222\ 685\ 444 \text{ мг}$$

Дослідивши потребу в Цефотаксимі та визначивши можливу потребу в ньому слід провести визначення потужності виробництва, для цього необхідно прийняти наступні вихідні дані:

На сьогодні в Україні відсутнє виробництво власного препарату цефалоспоринової солі, а саме – Цефотаксиму На солі. Є потреба у створенні відповідних виробничих підприємств. Тому що, зважаючи на високу онкологічну захворюваність в Україні і дорого вартість імпортованих лікарських препаратів для лікування, оптимальним рішенням є побудова власних ділянок для отримання цефалоспоринових препаратів у різних формах. Уявімо, що

Україна виробляє п'яту частину (тобто 20 %) Цефотаксиму від усієї потреби.

Інші країни виробляють :

$$222\,685\,444 \text{ мг} - 20\% = 167\,014\,083 \text{ мг}$$

Україна виробляє :

$$222\,685\,444 \text{ мг} - 167\,014\,083 \text{ мг} = 55\,671\,361 \text{ мг / рік}$$

$$55\,671\,361 \text{ мг / рік} = 55,671 \text{ кг / рік}$$

Знаючи синтезуючи здатність продуцента, можемо розрахувати річну суму культуральної рідини, яку потрібно отримати. Штам *Acremonium chrysogenum* *BKMF-4081D* синтезує 37 грам антибіотика на 1 літр культуральної рідини.

Сума культуральної рідини для 55,671 кг / рік Цефотаксиму становить 0,037 кг антибіотика – 0,001 м³ культуральної рідини

$$55,671 \text{ кг} - x \text{ м}^3$$

$$X = 55,671 / 0,001 * 0,037 = 1,505 \text{ м}^3 \text{ на рік}$$

Також беремо до уваги втрати у розмірі 10 % :

$$1,505 \text{ м}^3 + 10\% = 1,656 \text{ м}^3 \text{ на рік культуральної рідини}$$

РОЗДІЛ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання цефотаксиму

Штам *Acremonium chrysogenum* ВКМ F-4081D характеризується такими культурально-морфологічними ознаками: на середовищі, що містить бактопептон 10 г/л, мальтозу 40 г/л, сухий мальт-екстракт 20 г/л на 15 добу зростання має діаметр колонії 07 мм. Колонії підняті, конусоподібні, нерегулярно складчасті, поверхня молодих колоній голчаста, колір слонової кістки або рожеві, пігменту в середу не виділяють, повітряний міцелій дуже слабо виражений. Прототроф, строгий аероб, оптимальна температура зростання на агаровому середовищі – 24-28°C. Видиме зростання колоній проявляється на 8-ту добу інкубації при 28°C. На наведеному вище середовищі з додаванням 0,1% метіоніну на 15 добу зростання діаметр колоній у середньому 0,9 мм. Колонії підняті, нерегулярно складчасті, світло-бежеві, повітряний міцелій практично відсутній, пігменту в середовище не виділяє.

Культивування даного мікроорганізма проводиться глибинним способом з використанням рідкого поживного середовища періодичним методом. Це зумовлено тим, що цефалоспорин С – це вторинний метаболіт, який синтезується тільки на стаціонарній фазі росту, для досягнення якої підходить тільки періодичний спосіб культивування, бо при безперервному культивуванні досягти стаціонарної фази неможливо, через штучну зупинку на експоненційній фазі.

Також, використання рідкого поживного середовища зумовлене тим, що цефалоспорин С виділяється з клітини в культуральну рідину (супернатант), а не залишається всередині, а при рості на щільному поживному середовищі виділення цефалоспорину С не відбудеться або відбудеться в дуже незначних кількостях [48].

					НУХТ БТЕК 02.02.06. КР ПЗ					
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання цефотаксиму					
Розроб.	Куцак А. А.							Літ.	Арк.	Аркушів
Перевір.	Лич І.В.								40	87
Реценз.								Кефедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.	Стабніков В.П.									

Після успішного біосинтезу цефалоспорину в продуценті, потім виділяється в середовище з клітини. Наступним кроком в процесі його виробництва є виділення, концентрування та очищення. Ці етапи є важливими для отримання чистого, стабільного та високоякісного продукту цефалоспорину, який може використовуватись в фармацевтичній промисловості.

Цефалоспорин утворюється поза клітиною, він є вторинним метаболітом, тому починаємо з відділення міцелію від супернатанту. Це можна зробити за допомогою фільтрації, центрифугування, або ж флотації. Флотацію як правило застосовують для видокремлення біомаси кормових дріжджів, за допомогою спінування. Тому даний метод є недоречним. Фільтрація та центрифугування мають плюси та мінуси, важливо брати до уваги всі показники. Такі як: тип культури, її щільність, компоненти поживного середовища та його об'єм [48].

Фільтрація – застосовується для того, щоб відокремити біомасу від супернатанта. Вона є ефективною для видалення клітин та інших твердих частинок з рідини. Фільтрацію застосовують для відділення більших фракцій біомаси, наприклад клітину чи клаптики. Застосування фільтрів дає змогу задавати потрібний розмір пор, що утримує біомасу та пропускає супернатант.

Для відокремлення міцелію від супернатанту можна використати барабанний вакуум фільтр, це забезпечить безперервне фільтрування зовнішньої поверхні. Дані фільтри мають високу автоматизацію і дозволяють виконувати фільтрацію різних суспензій зі сталою швидкістю. Вони складаються з барабана, який занурений у резервуар, де постійно надходить культуральна рідина. Поверхня барабана має перфорації і покрита фільтруючою тканиною [49].

Після відділення міцелію в супернатанті залишається розчин з 3 - 6% сухих речовин, де 30 - 40% складають мінеральні речовини і 15 - 30% цефалоспорин. Крім того, розчин містить 50 - 200 мг білка на 100 г розчину, а

в деяких випадках навіть до 700 мг білка. Це ускладнює процес виділення цефалоспорину, оскільки потрібно видалити білкові домішки. Для виділення та очищення цефалоспорину можна використовувати різні методи: екстракції, ультрафільтрації, осадження, іонообмінний метод [50].

Ультрафільтрація це спосіб розділення речовин за допомогою мембранних фільтрів. В основі ультрафільтрації лежить використання мембран з діаметром пор від 0,001 до 0,1 мкм. Для поділу клітин і молекул застосовується ультрафільтрація.

Ультрафільтрація є кращим варіантом, тому що: має простоте апаратурне обладнання, не має температурного, хімічного та механічного впливу на продукт, мізерні енергетичні витрати. Ультрафільтраційні установки мають легку конструкцію та експлуатацію. У нашій країні є виробництво ультрафільтраційних установок ацетатцелюлозні мембрани: УАМ 50м, УАМ 100м, УАМ150м, УАМ 200м, УАМ 300м, УАМ 500м [51].

Суспензію під тиском пропускають через напівпроникну мембрану з великою кількістю пор дрібного діаметра (0,02—0,001 мкм), у результаті чого колоїдні частинки затримуються мембраною, а вода і молекули, що містяться в ній, проходять крізь стінки ниток і накопичуються в корпусі патрона. Навіть при низькому тискові забезпечується інтенсивний потік фільтрату. Активна частина мембрани — це поверхня, по якій проходить суспензія. Розділення фракцій відбувається саме на цій тонкій поверхні. Мембрана неоднорідна по товщині, унаслідок чого опір протіканню рідини по всій її поверхні мінімальний [51].

Наступним етапом є очищення супернатанту, що допомагає зменшити обсяг розчину та збільшити концентрацію цефалоспорину. Іонообмінне сорбування — водні розчини антибіотика, пропускають крізь колонки з відповідними іонообмінними смолами. Антибіотики сорбуються на смолах, а розчин із домішками, що мають заряд, протилежний заряду антибіотика, проходить крізь колонку. Смоли, залежно від їх заряду, називають катіонітами та аніонітами. Потім за допомогою специфічних елюентів

(розчини, що порушують зв'язок антибіотика зі смолою)здійснюють процес десорбування [52] .

Потім потрібно доочистити. Готові антибіотики цефалоспоринового ряду застосовується для лікування внутрішньовенно, тому субстанція, на основі якої і створені дані препарати, повинна мати високий ступінь очищення, щоб унеможливити потрапляння сторонніх об'єктів в кров пацієнта, що може викликати різні патологічні стани хворого, або навіть смерть .

Концентрування очищених розчинів антибіотика відбувається за допомогою вакуум-випарювання, бо він є найпростішим методом. Вакуум-випарний апарат — апарат, в якому проводять процеси концентрування рідких розчинів нелетких речовин шляхом часткового видалення розчинника при кипінні рідини в умовах вакууму . При випарюванні під вакуумом можна проводити процес при більш низьких температурах, що запобігає руйнуванню речовин, схильних до розкладання. У фармацевтичній промисловості застосовують для концентрування розчинів, що киплять при високій температурі, з метою економії енергоносіїв та зменшення часу проведення технологічного процесу; розчинів термолабільних речовин [53].

Після концентрування цефалоспорину його необхідно висушити, тобто виділити вільну і зв'язану воду. Цефалоспорини є термолабільними речовинами, тому в умовах підвищених температур вони розкладаються та втрачають свою біологічну активність. Для попередження цього, доцільно використовувати ліофільну сушку. При даному методі випаровування води відбувається при низькому тиску, коли лід переходить з твердого стану безпосередньо в газоподібний, минаючи рідкий. Під впливом низького тиску та додаткової нагрівання лід випаровується безпосередньо з твердого стану, залишаючи сухий залишок цефалоспорину. Сублімаційне (ліофільне) сушіння. Метод сублімаційного зневоднення дає можливість отримати продукти найвищої якості, оскільки в них повністю зберігається біологічна активність [49].

Для отримання однорідної та подрібненої форми висушений цефотаксим подрібнюють та просіюють. Пропонується використовувати молотковий млин для подрібнення, в який сировина завантажується через жолоб, а потім потрапляє між ротором та спеціальними молотками. [54].

Після подрібнення цефотаксиму його необхідно просіяти для отримання часточок однакового розміру. Для цього використовується машина для просіювання або сито. Вібраційна машина для просіювання розділяє твердий матеріал по розмірам часточок з допомогою вібрацій. Коливання від вібрацій передаються на сито та під їх дією цефалоспорин починає просіюватись. Більш дрібні частинки проходять через сито і потрапляють в нижню частину, а далі надходять на стадію пакування та маркування [55].

3.1. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Для доречного підбору обладнання для початку необхідно знати об'єм культуральної рідини, що припадає на один виробничий цикл. Припустимо, що наше виробництво працюватиме всього 30 днів на рік.

$$V_d = V_{кр} / T_{рд} = 1,656 / 30. \approx 55,2 \text{ л/добу.}$$

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

$$V_{крц} = K_1 * V_d * T_{цф} / 24 = (1,1 * 55,2 * 120) / 24 \approx 303,6 \text{ л/цикл.}$$

де $T_{цф}$ – цикл роботи ферментера (130 год), що включає час біосинтезу (110 год), та час підготовки ферментера – 10 год. Підготовка ферментатора включає: миття та огляд – 2 год, перевірка на герметичність – 2 год, стерилізація – 2 год, охолодження – 1 год, завантаження середовища – 1,5 год, засів – 0,5 год, відвантаження культуральної рідини – 1 год; K_1 – коефіцієнт запасу, що враховує ймовірність нестерильних операцій (1,1-1,5).

Тож, маючи початкові дані, можна розрахувати, що кількість цефотаксиму за цикл (без втрат) становитиме 9715,2 г або ж близько 9,71 кг. З врахуванням втрат цей показник становитиме 8743,68 г або ж близько 8,74 кг. Кількість біомаси при цьому складає близько 285 г/л, тоді, при її відокремленні з

культуральної рідини піде близько 86,5 кг [48].

За підбором обладнання з врахуванням матеріальних потоків складено табл.3.1.1.

Таблиця 3.1.1.

Підбір обладнання з врахуванням матеріальних потоків для виробництва субстанції цефотоксиму

№ п/п	Назва стадії (операції)	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Необхідне обладнання
			Надійшло	Втрати	Вийшло	
1	2	3	4	5	6	7
ТП 1. Зберігання культуральної рідини						
1	Зберігання культуральної рідини	Культуральна рідина	303,6 л	-	303,6 л	Збірник об'ємом 350 л
ТП 2. Відокремлення супернатанту на барабанному вакуум-фільтрі						
2	Відокремлення супернатанту на барабанному вакуум-фільтрі	Культуральна рідина	303,6 л	-	-	До вакуум-фільтраційної установки об'ємом завантаження 350 л
		Біомаса	-	-	86,5 кг	На утилізацію
		Супернатант	-	2%	214 л	До збірника об'ємом 250 л
ТП 3. Виділення цефотоксиму на ультрафільтраційній установці						
3	Виділення цефотоксиму на ультрафільтраційній установці	Супернатант	214 л	-	-	До ультрафільтраційної установки з продуктивністю 500 л/год
		Пермеат	-	-	144 л	На утилізацію
		Ретентат (зконцентрований тричі)	-	3%	70 л	До збірника об'ємом 100 л
ТП 4. Очистка цефотоксиму на катіонообмінній колонці						
4	ТП 4.1. Нанесення перетентату на колонку	Перетентат	70 л	-	-	На промислову катіонообмінну колонку з об'ємом завантаження 20 кг
		Сополімер стирол-дивінілбензол	7 кг	-	-	
		0,5 М хлорид натрію	21 л	-	-	
		Завантажена колонка	-	-	17 кг	На елювання
		Розчин з баластними речовинами	-	-	60 л	На утилізацію
		Відпрацьований 0,5 М хлорид натрію	-	-	21 л	

Продовження табл.3.1.1.

	1	2	3	4	5	6
5	ТП 4.2. Елюювання цефотаксиму	Фосфатний буфер	51 л	-	-	На промисловій катіонообмінній колонці з об'ємом завантаження 20 кг
		Відпрацьована смола	-	-	7 кг	На регенерацію
		Елюат	-	6%	58 л	До збірнику об'ємом 100 л
ТП 5. Концентрування елюату у вакуум-випарному апараті						
6	Концентрування елюату у вакуум-випарному апараті	Елюат	58 л	-	-	До вакуум-випарної установки об'ємом 100 л
		Концентрат (в 5 раз)	-	2%	11,47 л	На деко до ліофільної сушарки
ТП 6. Сублімація цефотаксиму						
7	Сублімація цефотаксиму	Концентрат	11,47 л	-	-	В ліофільній сушарці об'ємом заповнення 15 л
		Сухий цефотаксим	-	2%	8841 г	До молоткового млина на подрібнення
ТП 7. Подрібнення цефотаксиму						
8	Подрібнення цефотаксиму	Сухий цефотаксим	8841 г	-	-	На молотовому млині об'ємом завантаження 10 кг
		Подрібнений цефотаксим	-	1,5%	8792 г	До вібросита
ТП 8. Просіювання цефотаксиму						
9	Просіювання цефотаксиму	Подрібнений цефотаксим	8841 г	-	-	На віброситі об'ємом завантаження 10 кг
		Просіяний цефотаксим	-	1,5%	8744	До ємності об'ємом 10 л
ПМФ 9. Фасування та маркування						
10	ПМФ 9.1. Фасування цефотаксиму	Просіяний цефотаксим	8744г	-	-	Ручна фасовка
		Поліетиленові пакети	10 шт.	-	-	
		Пофасовані пакети цефотаксимом	-	-	10 пакетів по 874 г в кожному	На маркування

ПМФ 9.2. Маркування цефотаксиму	Пофасовані пакети цефотаксимом	10 шт	-	-	Ручне маркування
	Наліпки	10 шт.	-	-	
	Промарковані пакети цефотаксимом	-	-	10 шт.	На групове пакування
ПМФ 9.3. Пакування в групову тару	Промарковані пакети цефотаксимом	10 шт	-	-	Ручне пакування
	Картонна коробка	1 шт.	-	-	
	Групова тара з пакетами цефотаксиму	-	-	1 шт. з 10 пакетами	На склад

3.2. Специфікація обладнання.

Таблиця 3.2.2.

Список обладнання, що необхідно для виробництва цефотаксину

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
1	2	3	4
З-1	Збірник для зберігання культуральної рідини	1	Збірник об'ємом 350 л СУМІО. Максимальна робоча температура – 200 °С. Оснащений подвійною сорочкою та перемішуючим пристроєм. Розміри: 620*1000 мм. Робочий тиск – 5,25 бар [56].
Н-2	Насос перистальтичний для перекачування культуральної рідини	1	Перистальтичний насос РТ 25. Продуктивність до 1,4 м ³ /год. Максимальна робоча температура 80 °С. Максимальний робочий тиск – 15 бар [57].
БФ-3	Барабанний вакуум-фільтр	1	Барабанний вакуум-фільтр KLN-600. Продуктивність - до 2 м ³ /год. Створений зі сталі нержавіючої. Швидкість обертів 4-20 об/хв. Робочий тиск менше 0,4 МПа [58].
Н-4 Н-6	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий М-80 PL. Продуктивність: 2,4 м ³ /год. Потужність: 0,55 кВт [59].
Н-9 Н-11 Н-13 Н-15	Насос відцентровий	4	Насос відцентровий М-300С. Продуктивність до 7 м ³ /год. Корпус насоса виготовлений з нержавіючої сталі AISI 304. Корпус двигуна - з дюралі. Макс. робочий тиск: 8 бар. Темп. рідини: від -15 °С до +50 °С [59].
З-5	Збірник для зберігання супернатанту	1	Збірник об'ємом 250 л. Оснащений подвійною сорочкою та перемішуючим пристроєм. Розміри: 900*1700 мм. Робочий тиск – 5,25 бар [60].

Закінчення табл.3.2.2.

УФ-7	Ультрафільтраційна установка	1	Ультрафільтраційна установка АК-UFS-0.5. Продуктивність – 500 л/год. Ефективність – 97-98%. Оснащена системою керамічних фільтрів різних діаметрів пор [61].
З-8 З-12	Збірник для зберігання перетентату Збірник для зберігання елюату	2	Збірник об'ємом 100 л. Оснащений подвійною сорочкою та перемішуючим пристроєм. Розміри: 500*500 мм. Робочий тиск – 4 бар [62].
К-10	Катіонообмінна колонка	1	Катіонообмінна колонка на замовлення. Об'єм завантаження до 20 кг. Корпус зі сталі нержавіючої. Оснащений датчиками подачі розчинів[63].
В-14	Вакуум-випарна установка	1	Вакуум-випарний апарат VST 100 об'ємом завантаження 100 л. Розміри: 2000*1100 мм. Корпус зі сталі нержавіючої. Оснащений датчиками контролю температури [64].
Л-16	Сублимаційна сушарка	1	Ліофілізатор промисловий. Корисна площа полок: 1,2 м ² . Виробнича потужність: 12 кг/партія. Потужність: 3 кВт[65]
М-17	Молоткова дробарка	1	Молоткова дробарка Vektor ХН-230. Продуктивність 80-100 кг/год. Частота обертів ротора 28000 об/хв [66].
В-18	Вібросито	1	Вібросито ВС-300. Продуктивність може налаштовуватись до 300 кг/год. Частота коливань – 3000 кол/хв. Вага продукції не більше 80 кг [67].

РОЗДІЛ 4. Опис технологічної схеми виділення і очищення

Цефотаксиму.

Технологічна схема виробництва цефотаксиму складається з кількох основних стадій, кожна з яких виконує певну функцію для отримання кінцевого продукту – цефотаксиму у формі порошку. Нижче надано розширений опис кожного етапу, починаючи зі зберігання культуральної рідини і завершуючи пакуванням продукту.

ТП 1. Зберігання культуральної рідини

На першому етапі культуральна рідина, що містить цефотаксим, зберігається в спеціальному збірнику (З-1) ємністю 350 літрів. Загальний обсяг культуральної рідини становить 303,6 літра. Під час зберігання підтримується температура в 4 °С шляхом подачі до сорочки апарату холодної води. Цей етап є підготовчим для подальшого відокремлення компонентів культуральної рідини.

ТП 2. Відокремлення супернатанту на барабанному вакуум-фільтрі

Культуральна рідина подається на барабанний вакуум-фільтр (БФ-3) за допомогою перистальтичного насосу (Н-2) для відокремлення біомаси від супернатанту. Установка має об'єм завантаження 350 літрів. Встановлюється основні параметри процесу: швидкість обертів барабану – 10 об/хв, тривалість 1 година. Після фільтрації 86,5 кг біомаси видаляється для утилізації, а 214,1 літра супернатанту передаються до збірника (З-5) об'ємом 250 літрів за допомогою відцентрового насосу (Н-4) для подальшої обробки.

ТП 3. Виділення цефотаксиму на ультрафільтраційній установці

На цьому етапі супернатант в об'ємі 214,1 літра піддається ультрафільтрації, використовуючи установку з продуктивністю 500 літрів на годину. Рідина передається на ультрафільтраційну установку (УФ-7) за допомогою відцентрового насосу (Н-6).

					НУХТ БТЕК 02.02.06. КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	Розділ 4. Опис технологічної схеми виділення і очищення Цефотаксиму	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб.</i>	Куцак А. А.						49	87
<i>Перевір.</i>	Лич І.В.					Кефедра БТМ ⁴⁹		
<i>Реценз.</i>								
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>	Стабніков В.П.							

Встановлюється основні параметри процесу: діаметр пор фільтрів – 420 Да (до подачі супернатанту) та тривалість процесу – 5 годин. В процесі цього етапу, перетентат, який містить концентрований цефотаксим (70 літрів), тричі концентрується і передається до збірника (З-8). Пермеат об'ємом 144 літра видаляється на утилізацію.

ТП 4. Очистка цефотаксиму на катіонообмінній колонці

Очистка цефотаксиму проводиться на катіонообмінній колонці з використанням сополімеру стирол-дивінілбензолу.

ТП 4.1. Нанесення перетентату на колонку

На цьому етапі 70 літрів перетентату наносять на колонку (К-10) за допомогою відцентрового насосу (Н-9), що заповнена 7 кг смоли (сополімер). Для промивання колонки використовують 0,5 М розчин хлориду натрію об'ємом 21 літр. Швидкість подачі розчинів – 500 мл/хв. Тривалість процесу – 5 годин. Баластні речовини (60 літрів) виводяться на утилізацію.

ТП 4.2. Елюювання цефотаксиму

Після цього проводиться елюювання за допомогою 51 літра фосфатного буфера. Швидкість подачі розчину – 250 мл/хв. Тривалість процесу – 7 годин. Отримується 57,95 літра елюату, який містить цефотаксим та перекачується до збірника (З-12) за допомогою насосу (Н-11), а відпрацьована смола (7 кг) підлягає регенерації.

ТП 5. Концентрування елюату у вакуум-випарному апараті

Елюат в об'ємі 57,95 літра піддається концентруванню у вакуум-випарному апараті (В-14) шляхом перекачування рідини за допомогою насосу (Н-13). Встановлюється температура в 40 °С. Тривалість упарювання 12 годин. Установка має об'єм 100 літрів і дозволяє сконцентрувати елюат до 11,47 літра. Концентрат передається на наступний етап сублімації шляхом перекачки концентрату за допомогою насосу (Н-15) до деко, що входять до ліофілізаційної сушарки.

ТП 6. Сублімація цефотаксиму

Концентрат, що містить цефотаксим (11,47 літра), піддається сублимації (ліофілізації) у ліофільній сушарці (Л-16) з об'ємом заповнення 15 літрів. Температура процесу -40 °С. Тривалість упарювання 24 години. Після сублимації отримується 8840,8 г сухого цефотаксиму, який переходить на стадію подрібнення. Сухий цефотаксим зсипають в металеву ємність об'ємом 10 л.

ТП 7. Подрібнення цефотаксиму

Сухий цефотаксим (8840,8 г) завантажується у бункер молоткового млину (М-17), де відбувається подрібнення до дрібнодисперсної форми (0,5 мм). Тривалість процесу – 20 хв. Після подрібнення отримується 8792,26 г продукту, готового для просіювання.

ТП 8. Просіювання цефотаксиму

Просіювання здійснюється на віброситі (В-18) з об'ємом завантаження 10 кг. Подрібнений цефотаксим (8792,26 г) просіюється, щоб відокремити дрібні частки (0,5 мм) і отримати чистий порошок. Після просіювання отримується 8743,68 г просіяного цефотаксиму.

ПМФ 9. Фасування, маркування та пакування цефотаксиму

ПМФ 9.1. Фасування цефотаксиму

Просіяний цефотаксим (8743,68 г) фасується вручну в поліетиленові пакети. Загалом отримується 10 пакетів, по 874 г кожен.

ПМФ 9.2. Маркування цефотаксиму

Пакети з цефотаксимом маркуються вручну за допомогою наклейок. Наліпки наклеюються на кожен з 10 пакетів.

ПМФ 9.3. Пакування в групову тару

Промарковані пакети (10 штук) пакуються в картонну коробку для подальшого зберігання. Групова тара містить одну картонну коробку з 10 пакетами цефотаксиму.

РОЗДІЛ 5. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції

При виробництві лікарських засобів необхідно суворо дотримуватися всіх необхідних вимог для уникнення ризику контамінації мікроорганізмами, частками, а також перехресної контамінації. Якість вироблених лікарських засобів залежить від дотримання регламентованих параметрів виробничого процесу, високоефективної роботи технологічного обладнання, від досвіду і кваліфікації персоналу, його підготовки і ставлення до виконуваної роботи.

Чисте приміщення (*cleanroom*) – це приміщення, яке спроектували, обслуговують і контролюють так, щоб запобігати контамінації лікарських засобів частинками і мікроорганізмами. У такому приміщенні має забезпечуватись і регулярно відтворюватись відповідний рівень чистоти повітря.

Постачання повітря класу А (*grade A air supply*) - повітря, що проходить через фільтр, який кваліфіковано щодо здатності забезпечувати повітря із загальним вмістом частинок відповідно до вимог для класу А, але до якого не висувають вимог щодо безперервного моніторингу загального вмісту частинок або щодо кількості життєздатних мікроорганізмів згідно з нормами для класу А. Таке повітря використовують виключно для захисту повністю закупорених флаконів, коли на них ще не обтиснутий ковпачок.

HEPA-фільтр (*HEPA filter*) – високоефективний фільтр для очищення повітря від частинок згідно з відповідними міжнародними стандартами.

Персонал, задіяний у виробництві лікарських засобів, повинен суворо дотримуватися вимог технологічних інструкцій, інструкцій з пакування, інструкцій з охорони праці, інструкцій по експлуатації обладнання, стандартних операційних процедур, чітко визначених правил поведінки у виробничих приміщеннях та дотримання особистої гігієни. [68].

					НУХТ БТЕК О2.02.06. КР ПЗ			
<i>Змн.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб.</i>		Куцак А. А.			Розділ 5. Технологічні особливості отримання готового продукту з субстанції	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевір.</i>		Лич І.В.					52	87
<i>Реценз.</i>						Кефедра БТМ ⁵²		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		Стабніков В.П.						

Для забезпечення виконання всіх вимог, що пред'являються до виробництва лікарських засобів на дільниці виробництва стерильних антибіотиків проводиться постійний технологічний контроль фахівцями дільниці.

Технологічний контроль на дільниці виробництва стерильних антибіотиків здійснюється з метою підтвердження, а, при необхідності, коригування, правильного виконання робочим персоналом дільниці всіх вимог ведення технологічного процесу. Фахівці дільниці здійснюють постійний контроль за дотриманням усіх вимог технологічного процесу, а також цеховий контроль якості проміжного продукту виробництва відповідно до затверджених методик контролю. Контроль роботи технологічного обладнання, функціонування приміщень здійснює механік ВГМ, інженер з організації експлуатації та ремонту ВГМ, технік з експлуатації та ремонту устаткування ВГМ. Контроль роботи систем водопідготовки і підготовки повітря здійснює інженер дільниці ВК та ВП.

Очікуваний вихід залежить від фактичного кількісного вмісту активної речовини, вказаного у протоколі випробувань вхідного контролю. Розрахунок розміру серії та очікуваного виходу виконують відповідно до методик розрахунку, поданих у ТІ. Допускається збільшення або зменшення розміру серії препарату залежно від розміру серії субстанції та з урахуванням кількості субстанції в одній упаковці виробника субстанції.

Очікуваний вихід повинен знаходитися в межах $\pm 5,0$ % від розрахованого розміру серії.

Допоміжні роботи :

- *контроль вхідної сировини, матеріалів і друкованої продукції;*

Контроль вхідної сировини, матеріалів і друкованої продукції здійснювати візуально інженеру-технологу/майстру цеху під час надходження сировини, матеріалів і друкованої продукції з центрального складу на дільницю виробництва. Параметри контролю:

- цілісність групової тари;

- маркування основної сировини, матеріалів, друкованої продукції (найменування, кількість, номер серії/партії, термін придатності, наявність етикетки «Дозволено до використання у виробництві»);

- супровідна документація (протоколи аналізу вхідного контролю ВКЯ).

• *контроль за технологічними параметрами виробництва і ведення технологічного процесу;*

Реєстрацію параметрів ведення технологічного процесу, і інші дані виробництва серії конкретного препарату, фіксувати робочим персоналом дільниці в Протоколах виготовлення серії препарату по ходу ведення технологічного процесу.

• *контроль санітарної підготовки обладнання і приміщень;*

Санітарну підготовку обладнання і приміщень дільниці здійснювати робочому персоналу дільниці відповідно до СОП з підготовки обладнання і приміщень.

• *контроль мікроклімату і лічильної концентрації часток в виробничих приміщеннях;*

Постійний контроль лічильної концентрації аерозольних часток в приміщенні фасування (зони «А») здійснюється системою автоматичного контролю. Періодичний контроль лічильної концентрації аерозольних часток в приміщенні фасування (зони «В») здійснювати персоналу відповідно нормативної документації. Відповідальність за правильне виконання процедури вимірювання концентрації аерозольних часток, в приміщеннях класу чистоти А та В, лазерним лічильником аерозольних часток MET ONE 3400 несуть апаратники дозування. Виміри проводяться тільки відкаліброваними лічильниками. Калібрування приладу здійснюється не рідше одного разу на рік.

З метою недопущення перевищення максимально допустимої рахункової концентрації аерозольних часток в повітрі робочої зони, а також своєчасного виявлення тенденцій з погіршення умов експлуатації чистих зон, необхідно контролювати значення рахункової концентрації аерозольних часток з урахуванням рівня тривоги та дій.

Максимально допустиме значення рівня тривог та дій по концентрації частинок в 1 м³ повітря для зон різних класів чистоти надані в таблиці [69].

Таблиця 5.1.

Клас чистоти	Найменування рівня контролю	Максимально допустима кількість часток в 1 м ³ повітря при розмірі часток однакового чи більшому за зазначений			
		Оснащений стан		Експлуатований стан	
		0,5 мкм	5 мкм	0,5 мкм	5 мкм
А	Рівень тривог	3 170	26	3 170	26
	Рівень дій	3 340	28	3 340	28
В	Рівень тривог	3 170	26	3 170	2 600
	Рівень дій	3 340	28	3 340	2 800

- *контроль допуску та поведінки персоналу у виробничих приміщеннях;*
- *контроль дотримання персоналом особистої гігієни;*
- *контроль функціонування обладнання, приміщень, систем;*

Щодня перевіряти стан всіх одиниць обладнання і блокувань, приміщень і систем перед початком зміни, в процесі роботи, після закінчення зміни.

- *контроль за запобіганням перехресної контамінації;*
- *контроль підготовки комплекту одягу для роботи в чистих приміщеннях;*
- *контроль приготування розчинів дезінфікуючих засобів;*
- *контроль якості проміжного продукту виробництва.*

5.1. Обґрунтування вибору форми та упаковки лікарського засобу

Дозування: форма лікарського засобу, порошок для розчину для ін'єкцій, повинна бути такою, щоб забезпечити достатню дозу лікарського засобу для лікування. Упаковка повинна забезпечувати захист від впливу зовнішніх факторів, таких як світло, волога та температурні зміни, що можуть вплинути на стабільність препарату.

Упаковка повинна бути зручною для пацієнта та медичного персоналу для зберігання та використання лікарського засобу.

Враховуючи ці фактори, оптимальною формою та упаковкою цефотаксиму може бути порошок для розведення в розчині, що постачається в флаконах №1

разом із інструкцією запаковані в пачку, які забезпечують легкість дозування та зберігання, а також зручність для використання у медичних установах.

5.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання лікарського засобу

Підготовка виробництва

Підготовку виробництва виконують відповідно до стандартних операційних процедур (вказаних у ТІ та ІІІ).

Для проведення санітарної підготовки використовують деззасоби згідно з вимогами стандартних операційних процедур щодо приготування розчинів дезінфікуючих засобів. Прибиральнику виробничих приміщень перед початком робочої зміни, або при необхідності, отримати у майстра зміни ємності з дезінфікуючими та мийно-дезінфікуючими засобами, антисептик для обробки рук "Стерилліум", інвентар для прибирання і занести в матеріальний шлюз. У матеріальному шлюзі виконати дезобробку 3% розчином перекису водню. Витримати час експозиції 30 хвилин. Увійти в матеріальний шлюз з боку чистих приміщень і забрати підготовлені матеріали в приміщення приготування і зберігання дезінфікуючих розчинів. [70].

Мікробіологічний контроль санітарної підготовки виконують відповідно до стандартних операційних процедур щодо контролю мікробної контамінації приміщень, обладнання і персоналу виробництва стерильних лікарських засобів та контролю мікробної контамінації повітря приміщень виробництва стерильних лікарських засобів.

Підготовка сировини та матеріалів

У виробництві препарату використовують сировину, що пройшла попередній контроль ВКЯ та відповідає всім показникам якості відповідно до специфікації для вхідного контролю.

Пакувальні матеріали, які використовують у виробництві препарату, надходять у виробництво після контролю ВКЯ. Вхідний контроль проводять у

ВКЯ згідно до стандартних операційних процедур щодо порядку проведення вхідного контролю пакувальних та поліграфічних матеріалів.

Сировину та матеріали беруть у виробництво після відповідного дозволу, що видається Уповноваженою особою згідно стандартних операційних процедур щодо порядку видачі дозволу або відхилення вхідної сировини, пакувальних матеріалів, проміжних продуктів, готової продукції.

Проводять розтарювання та дезобробку пакувань зі стерильною субстанцією, флаконами, пробками гумовими та ковпачками.

Флакони миють та ополіскують у машині для мийки флаконів, стерилізують у стерилізаційному тунелі при регламентованих технологічних параметрах.

Пробки гумові та ковпачки стерилізують у паровому стерилізаторі при регламентованих технологічних параметрах. Контроль підготовки пробок, ковпачків, флаконів проводять згідно з методиками контролю якості проміжного продукту.

Первинне упакування субстанції проходить стерилізацію парами перекису водню у ізоляторі згідно програми стерилізації.

Стерилізацію допоміжних матеріалів та частин обладнання, що знімаються проводять у паровому стерилізаторі при відповідній програмі стерилізації.

Матеріали, що не підлягають паровій стерилізації, проходять обробку дезінфікуючим засобом у перчаточному передаточному шлюзі.

Фасування стерильного порошку у флакони, маркування

Фасування стерильного порошку у флакони, укупорювання стерильними гумовими пробками проводять на машині наповнення та закупорювання флаконів, закатку флаконів стерильними алюмінієвими ковпачками – на автоматі закатки флаконів. Даний процес відбувається в стерильних умовах, в класі чистоти А.

Проводять зовнішню мийку наповнених флаконів на машині зовнішньої мийки флаконів, автоматичне відбракування негерметичних флаконів - на машині контролю герметичності флаконів, етикетування флаконів – на

етикетувавальному автоматі. Даний процес відбувається у некласифікованих приміщеннях.

Контроль якості (цеховий та у лабораторії ВКЯ) здійснюють згідно з методиками контролю якості проміжного продукту.

Пакування та маркування

Перед початком пакування продукції укладальники (при необхідності) готують необхідні матеріали для роботи: маркують пачки, маркують етикетки групові, готують гофрокороби.

Проводять перевірку флаконів на герметичність та видимі пошкодження .

Маркування етикеток самоклеючих, а також нанесення етикеток самоклеючих на флакони виконують на етикетувальному автоматі або автоматичній лінії пакування флаконів.

Пакування отриманих флаконів разом з інструкцією для медичного застосування у пачки здійснюють у приміщенні фасування на картонуючому автоматі.

Внести дані в принтер автомату для кодування та перевірки пачок необхідні номер серії, термін придатності, згідно зі змінним завданням.

Пачки автоматично формують у блоки по 10 шт. на автоматі для групової обмотки пачок.

Блоки по 21 шт. (210 пачок) вкладають у гофрокороби (410x290x245) мм на столі пакування готової продукції. У кожний гофрокороб вкладають заповнену для конкретного пакувальника етикетку т/х “Пакувальник”. Гофрокороби скотчем. За допомогою скотчу прозорого приклеюють етикетку групову затвердженого зразку з нанесеними номером серії та терміном придатності та передають готову продукцію у приміщення карантинного зберігання.

Проводять контроль готової продукції згідно з методиками контролю якості лікарського засобу.

У процесі виробництва серії препарату заповнюють протоколи виготовлення серії, які разом із іншою визначеною документацією, яка стосується виготовлення серії, формують Досьє на серію згідно з процедурою

формування Досьє на серію готової продукції та видачі сертифікату серії. Архівні зразки зберігають відповідно до стандартних операційних процедур щодо порядку ведення архіву контрольних зразків вхідної сировини та готових лікарських форм.

Примітка. При поставці препарату на експорт, фасування, вид, розмір, комплектність упаковки, маркування та пакування лікарського засобу, його дизайн та текст інструкції (або листка-вкладиша) повинно відповідати реєстраційному досьє, що сформовано за вимогами країни-імпортера та заявлене під час реєстрації до реєстраційного органу країни-імпортера. За необхідності проводиться серіалізація/агрегація продукції.

РОЗДІЛ 6. Контроль виробництва

6.1. Підбір сучасних методів контролю виробництва субстанції

Концентрація біомаси

Для визначення біомаси пропонується використовувати метод висушування до сталої маси. Беремо пробу культуральної рідини 10 мл та центрифугуємо при 2500-3000 об/хв. Міцелій висушують при температурі 105 °С у сушильній шафі до постійної маси [50].

Ідентифікація цефотаксиму

Хімічні тести для ідентифікації цефотаксиму спрямовані на підтвердження присутності специфічних функціональних груп в молекулі антибіотика. Ці реакції можуть бути менш специфічними, ніж хроматографічні або спектральні методи, але використовуються як додаткові методи у фармакопейних аналізах [46].

Основні хімічні тести для ідентифікації цефотаксиму:

1. Тест на β-лактамне кільце [46]

Цефотаксим, як цефалоспориновий антибіотик, містить β-лактамне кільце. Хімічна реакція полягає у відкритті цього кільця при взаємодії з певними реагентами. Один із найбільш поширених реагентів – це натрій гідроксид (NaOH) або сильна лугова основа, яка викликає гідроліз β-лактамного кільця. Гідроліз β-лактамного кільця супроводжується зміною кольору розчину, що свідчить про присутність β-лактамного кільця в структурі молекули.

2. Тест на тiazолідинове кільце [46]

Цефотаксим також містить тiazолідинове кільце, яке можна ідентифікувати шляхом його специфічних хімічних реакцій. Реакція з хлоридом заліза (FeCl₃) дозволяє визначити наявність тiazолідинового кільця через характерну зміну кольору. Реагентами для цього аналізу є FeCl₃ або інші комплекси заліза.

					НУХТ БТЕК 02.02.06. КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 6. Контроль виробництва	Лім.	Арк.	Аркуші
Розроб.		Куцак А. А.					60	87
Перевір.		Лич І.В.				60		
Реценз.						60		
Н. Контр.						Кефедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

При позитивній реакції розчин змінює колір на темно-фіолетовий або бурий.

3. Тест на присутність аміногрупи [46]

Цефотаксим містить аміногрупу ($-\text{NH}_2$), яку можна виявити реакцією з нінгідрином або іншими специфічними реагентами для аміногруп. До необхідних реактивів для цього аналізу відносяться нінгідрин або натрій нітрит (NaNO_2) у кислому середовищі. У разі наявності аміногрупи утворюється фіолетовий або синій колір після додавання нінгідрину, що підтверджує присутність аміногруп.

4. Реакція з натрієм нітропрусидом [46]

Натрій нітропрусид використовується для виявлення сульфгідрильних ($-\text{SH}$) або тиольних груп у структурі цефотаксиму. До необхідних реактивів для цього аналізу відносяться натрій нітропрусид і аміачний розчин. Позитивна реакція призводить до утворення характерного червоного або фіолетового кольору.

5. Тест на карбоксильні групи [46]

Карбоксильні групи ($-\text{COOH}$) у цефотаксимі можна визначити за допомогою реакцій з сильними кислотами або лугами. Наприклад, для ідентифікації використовують реакцію з кальцієм хлоридом (CaCl_2), утворюючи білий осад кальцію карбонату. Утворення білого осаду або помутніння розчину свідчить про наявність карбоксильної групи.

6. Реакція з бромною водою [46]

Бромна вода реагує з подвійними зв'язками або іншими ненасиченими групами в молекулі. У разі цефотаксиму реакція з бромною водою призводить до знебарвлення розчину, що свідчить про насичення подвійних зв'язків. До необхідних реактивів для цього аналізу відносяться розчин бромної води. Знебарвлення розчину означає, що реакція пройшла і подвійні зв'язки були насичені.

Хімічні тести не є настільки точними або специфічними, як спектральні або хроматографічні методи. Вони використовуються здебільшого як додаткові

до основних методів ідентифікації. Проте, водночас, хімічні тести прості в застосуванні і не вимагають дорогого обладнання, тому можуть використовуватися в лабораторіях із обмеженими ресурсами [46].

Визначення цитотоксичності цефотаксиму

Для визначення активності цефотаксиму або інших антибіотиків проти клітинних ліній раку необхідно застосовувати спеціалізовані методики з використанням клітинних культур та цитотоксичних тестів. Оскільки цефотаксим не є традиційним засобом для лікування раку, такі дослідження можуть бути спрямовані на вивчення його потенційної здатності пригнічувати ріст або виживання ракових клітин [47]. Далі викладена покрокова методика дослідження[48].

1. Вибір клітинних ліній [48]

- Мета: перший крок полягає у виборі специфічних онкологічних клітинних ліній для дослідження. Для цього можна використовувати відомі ракові клітинні лінії, наприклад:
 - HeLa (рак шийки матки)
 - MCF-7 (рак молочної залози)
 - A549 (рак легенів)
 - PC-3 (рак простати)
 - HT-29 (колоректальний рак)
- Інструменти: клітинні лінії можна придбати в спеціалізованих біобанках (наприклад, ATCC).

2. Культивування клітин [48]

- Мета: підготовка клітин до експерименту включає їх вирощування в оптимальних умовах.
- Процедура:
 - Використовують живильні середовища, такі як DMEM або RPMI-1640, з додаванням 10% фетальної телячої сироватки (FBS) і антибіотиків (стрептоміцин і пеніцилін).
 - Клітини вирощують у стерильних умовах при температурі 37°C в

інкубаторі з 5% CO₂.

- Періодично проводять субкультивування (підтримка росту клітин у логарифмічній фазі) за допомогою трипсинізації.

3. Приготування розчину цефотаксиму [48]

- Мета: приготування різних концентрацій антибіотика для оцінки дозозалежної відповіді.
- Процедура:
 - Розчинити цефотаксим у стерильній дистильованій воді або фосфатно-сольовому буфері (PBS).
 - Підготувати серійні розведення (наприклад, 10, 25, 50, 100, 200, 500 мкг/мл) для визначення концентрації, при якій спостерігається ефект.

4. Оцінка цитотоксичності за допомогою тесту МТТ [48]

Тест МТТ є одним із найбільш поширених методів оцінки цитотоксичності і використовується для визначення життєздатності клітин після обробки цефотаксимом.

- Мета: оцінка впливу цефотаксиму на життєздатність ракових клітин.
- Принцип: життєздатні клітини метаболізують МТТ (3-(4,5-диметилгіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід) до фіолетового кристалу формагану, що дозволяє кількісно оцінити життєздатність клітин.
- Процедура:
 1. Насіяти клітини в 96-лункові планшети (приблизно 1×10^4 клітин/лунку) і інкубувати їх 24 години для прикріплення.
 2. Після цього додати різні концентрації цефотаксиму до кожної лунки.
 3. Інкубувати клітини з антибіотиком 24, 48 або 72 години (залежно від експериментальної мети).
 4. Додати до кожної лунки розчин МТТ і залишити на 3-4 години.
 5. Після інкубації обережно видалити середовище і додати диметилсульфоксид (DMSO) для розчинення формагану.
 6. Виміряти абсорбцію при довжині хвилі 570 нм на спектрофотометрі

або мікропланшетному рідером.

- Результат: зменшення абсорбції свідчить про зниження кількості життєздатних клітин, що може вказувати на цитотоксичну дію цефотаксиму.

5. Оцінка апоптозу [48]

- Мета: визначити, чи призводить цефотаксим до індукції апоптозу ракових клітин.
- Процедура:
 1. Після обробки клітин цефотаксимом можна використовувати тест Annexin V-FITC/PI (пропідій йодид), який дозволяє визначати ранні стадії апоптозу.
 2. Клітини забарвлюють Annexin V та пропідій йодидом і аналізують за допомогою проточної цитометрії.
 3. Виявлення клітин, що забарвлені тільки Annexin V, вказує на ранній апоптоз, тоді як забарвлення Annexin V та PI — на пізню стадію апоптозу або некрозу.

6. Оцінка впливу на цикл клітини (аналіз за допомогою проточної цитометрії) [48]

- Мета: дослідити, чи впливає цефотаксим на цикл поділу ракових клітин (зупинка клітин у певній фазі).
- Процедура:
 1. Після обробки цефотаксимом клітини фіксують у 70% етанолі.
 2. Забарвлюють ДНК специфічним барвником, таким як пропідій йодид.
 3. Вивчають клітинні популяції на проточному цитометрі, щоб визначити частку клітин у фазах G0/G1, S, G2/M циклу.

7. Статистичний аналіз даних [48]

- Мета: оцінити достовірність результатів.
- Процедура:
 - Дані обробляють за допомогою програмного забезпечення для

статистичного аналізу (наприклад, GraphPad Prism).

- Використовують методи, такі як ANOVA або t-тест, для оцінки значимості різниць між контрольними та дослідними групами.

8. Інтерпретація результатів [48]

- Мета: визначити активність цефотаксиму проти онкологічних клітин.
- Оцінка IC50: визначення концентрації цефотаксиму, при якій 50% клітин гинуть або втрачають життєздатність.
- Висновки: якщо цефотаксим проявляє значну цитотоксичність або індукує апоптоз у ракових клітинах, це може свідчити про його потенційну антиракову активність. Однак необхідні додаткові дослідження для перевірки механізмів дії.

Візуальний контроль цефотаксиму

Візуальний контроль антибіотика, зокрема цефотаксиму, є важливим етапом у забезпеченні якості препарату. Цей метод дозволяє оцінити фізичні властивості лікарської форми і виявити можливі відхилення, які можуть свідчити про порушення технологічного процесу або зниження стабільності препарату. Основні показники візуального контролю цефотаксиму можуть включати [48]:

1. Зовнішній вигляд

Колір: цефотаксим зазвичай має білий або майже білий колір. Будь-які зміни кольору (наприклад, пожовтіння) можуть свідчити про розпад препарату або порушення умов зберігання.

Однорідність: порошок повинен бути однорідним без ознак агрегації, злипання або утворення грудок.

Кристалічність: у деяких випадках можна візуально оцінити структуру порошку. Важливо, щоб не було сторонніх частинок чи ознак забруднень.

2. Колір розчину після розведення

Після додавання розчинника (вода для ін'єкцій або інший відповідний розчин) розчин цефотаксиму повинен бути прозорим або злегка опалесцентним. Будь-які зміни кольору розчину (поява жовтого, коричневого або іншого

відтінку) можуть свідчити про деградацію активної речовини або контамінацію. Поява мутності або осаду в розчині вказує на можливе забруднення або порушення технології приготування.

3. Контроль на запах

Порошок цефотаксиму не повинен мати будь-якого вираженого запаху. Поява специфічного запаху може свідчити про його розкладання або присутність сторонніх домішок.

4. Розчинність

Після додавання розчинника (вода для ін'єкцій або 0,9% NaCl) порошок повинен швидко розчинитися без утворення осаду або піни. Повільна розчинність або утворення видимих частинок після розчинення може вказувати на погану якість порошку або порушення умов зберігання.

Визначення ваги та вологості цефотаксиму

Для визначення вологості та ваги цефотаксиму (або інших порошкових речовин) використовують гравіметричний метод із застосуванням вологоміра. Вологомір дозволяє вимірювати вологість препарату на основі втрати маси під час нагрівання зразка до певної температури[49].

1. Підготовка зразка [49]

- Вибрати необхідну кількість порошку цефотаксиму для аналізу (зазвичай 0,5–1 г, залежно від вимог).
- Уникати контакту з повітрям або вологістю під час зважування, щоб зразок не набрав додаткової вологи.
- Висипати зразок на вагову платформу вологоміра.

2. Зважування початкової маси [49]

- Вологомір автоматично зважує зразок перед початком вимірювання вологості.
- Початкова маса зразка фіксується приладом і використовується для подальшого розрахунку втрати вологи.

3. Налаштування параметрів вологоміра [49]

- Встановити температуру сушки. Залежно від фізико-хімічних властивостей цефотаксиму, температура сушки зазвичай становить 105°C.
- Встановити тривалість вимірювання. Час сушіння може варіюватися від кількох хвилин до 30 хвилин або більше, залежно від кількості зразка і його вмісту вологи.
- Вибрати режим завершення сушки. Можна встановити автоматичне завершення процесу сушки, коли втрата маси зразка стабілізується (менш ніж 0,01% за певний період часу).

4. Вимірювання вологості [49]

1. Вологомір починає нагрівати зразок до заданої температури.
2. Під час нагрівання зразок втрачає вологу, а вологомір постійно відстежує зміну маси.
3. Як тільки вологість зразка досягає стабільного рівня, вологомір автоматично зупиняє процес вимірювання.

5. Розрахунок втрати маси (вологості) [49]

- Вологомір розраховує вологість як процентну втрату маси за формулою:

$$\text{Вологість}(\%) = \frac{\text{Початкова маса} - \text{Кінцева маса}}{\text{Початкова маса}} \times 100$$

Переваги гравіметричного методу з використанням вологоміра:

- Швидкість. Більшість сучасних вологомірів дозволяють отримати результати за кілька хвилин.
- Точність. Цей метод забезпечує високу точність визначення вологості, що важливо для контролю якості лікарських препаратів.
- Простота використання. Вологомір легко налаштовується і автоматично проводить усі необхідні вимірювання.

6.2. Методи контролю лікарського засобу Цефотаксиму

МК-1. Опис. Порошок білого або злегка жовтого кольору, гігроскопічний.

МК-2. Час розчинення.

Вміст одного флакона розчиняють у 4 мл води для ін'єкцій Р або у 50 мл розчину натрію хлориду ізотонічного 0,9% для ін'єкцій, або в 50 мл 5 % розчину глюкози для ін'єкцій.

Час розчинення вмісту одного флакона у воді для ін'єкцій Р або в розчині натрію хлориду ізотонічного 0,9 % для ін'єкцій, або в 5 % розчині глюкози для ін'єкцій не має перевищувати 2 хв.

МК-3. Ідентифікація.

А. На хроматограмі випробовуваного розчину, одержаній у МК-10.1 або МК-10.2 «Кількісне визначення», час утримування основного піка цефотаксиму має збігатися з часом утримування піка цефотаксиму на хроматограмі розчину порівняння (а).

В. Близько 2 мг вмісту флакона поміщають у пробірку висотою близько 150 мм і діаметром 15 мм, змочують 0,05 мл води Р, додають 2 мл розчину формальдегіду в кислоті сірчаній Р і перемішують обертальними рухами; одержаний розчин повинен мати яскраво-жовте забарвлення. Потім пробірку поміщають у водяну баню на 1 хв; поступово з'являється коричневе забарвлення (цефотаксим).

С. Препарат дає реакцію (а) на натрій (ЄФ/ДФУ, 2.3.1).

МК-4. Прозорість розчину.

Вміст флакона розчиняють у 10 мл води, вільній від вуглецю діоксиду, Р. Одержаний розчин має бути прозорим.

МК-5. Оптична густина (ЄФ/ФУ, 2.2.25). Вимірюють оптичну густину розчину, приготованого в МК-4 "Прозорість розчину", на спектрофотометрі за довжини хвилі 430 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння воду Р.

Оптична густина розчину не має перевищувати 0,60.

МК-6. рН (ЄФ/ДФУ, 2.2.3). Від 4,5 до 6,5 (використовують розчин,

приготований в МК-4 "Прозорість розчину").

МК-7. Однорідність дозованих одиниць (ЄФ/ФУ, 2.9.40).

Розрахунок приймального числа (AV) здійснюють розрахунково-ваговим методом згідно з вимогами ЄФ/ФУ, 2.9.40 (таблиця 2.9.40.-2). Вимоги ОДО вважаються виконаними, якщо приймальне число для перших 10 одиниць менше або дорівнює 15,0 (L1). Якщо приймальне число більше 15 (L1), випробуванню піддають наступні 20 одиниць і обчислюють приймальне число.

МК-8. Вода (ЄФ/ФУ, 2.5.12). Не більше 3,0 %.

Визначення проводять з 0,3 г (точна наважка) препарату напівмікрометодом.

МК-9. Супровідні домішки. Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ЄФ/ФУ, 2.2.29), однією з нижче наведених методик.

9.1. Супровідні домішки. Визначення проводять методом високоефективної рідинної хроматографії. Розчини готують безпосередньо перед використанням.:

Розчин А: рухома фаза В - рухома фаза А (14:86).

Випробовуваний розчин. 40,0 мг маси змішаного вмісту 10 контейнерів розчиняють у розчині А та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл.

Розчин порівняння (а). 8,0 мг СЗ цефотаксиму кислоти розчиняють у розчині А та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 10,0 мл.

Розчин порівняння (b). 1,0 мл випробовуваного розчину доводять розчином А до об'єму 100,0 мл.

Розчин порівняння (с). До 4,0 мл випробовуваного розчину додають 1,0 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р, витримують при температурі 40 °С протягом 2 год. До одержаного розчину додають 5 мл буферного розчину рН 6,6 Р, 1,0 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром (150 x 3,9) мм, заповнена сорбентом силікаге-лем октадецилсилільним для хроматографії Р* з розміром частинок 5 мкм («Waters», США), або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»,

- рухома фаза А: розчин 7,1 г/л динатрію гідрофосфату Р, рН якого доводять до 6,25 кислотою фосфорною Р;

- рухома фаза В: метанол Р;

- швидкість рухомої фази 1 мл/хв;

- детектування за довжини хвилі 235 нм;

- температура колонки 30 °С;

- об'єм проби, що вводиться, 10 мкл;

МК-10. Кількісне визначення.

Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ЄФ/ДФУ, 2.2.29) одним з нижче наведених методів.

МК-10.1. Кількісне визначення. Визначення проводять методом рідинної хроматографії (ЄФ/ДФУ, 2.2.29), як описано в МК-9.1. "Супровідні домішки".

Визначають масу вмісту кожного флакона і середню масу вмісту флакона (ЄФ, ДФУ, 2.9.5). Для хроматографування використовують розчини, приготування яких, описано у МК- 9.1 "Супровідні домішки".

Попеременно хроматографують випробовуваний розчин і розчин порівняння (а).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- відносне стандартне відхилення для площі піка цефотаксиму на хроматограмах розчину порівняння (а) не перевищує 1,5 %;

- число теоретичних тарілок, розраховане за піком цефотоксиму на хроматограмах розчину порівняння (а), становить не менше 1500.

Вміст цефотаксиму (X) в флаконі, у перерахунку на середню масу вмісту флакона, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{S_1 * m_0 * P * 50 * b}{S_1 * m_1 * 10 * 100} = \frac{S_1 * m_0 * P * b * 0.05}{S_0 * m_1}$$

де S_1 , - середнє значення площ піків цефотаксиму, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 - середнє значення площ піків цефотаксиму, розраховане з хроматограм розчину по рівняння (а);

m_1 - маса наважки препарату, у міліграмах;

m_0 - маса наважки СЗ цефотаксиму кислоти, у міліграмах;

P - вміст цефотаксиму у СЗ цефотаксиму кислоти, у відсотках;

b - середня маса вмісту флакона, у міліграмах.

МК-11. Стерильність.

Має витримувати випробування на стерильність. Випробування проводять відповідно до вимог ЄФ/ДФУ 1.4, 2.6.1, методом мембранної фільтрації за допомогою приладу "Стері-тест" з використанням каністр та стерідиллятора.

Вміст 10 флаконів розчиняють за допомогою стерідиллятора в 300 мл стерильної рідини № 2 (пептон ферментативний - 5 г, полісорбат-80 - 10 г, вода очищена - 1000 мл, рН після стерилізації 7.10.2), з попередньо внесеною пеніциліназою 1000000 ОД (Penase, виробництва OXOID LTD, WADE ROAD, BASINGSTOKE, HAMPSHIRE, ENGLAND).

100 мл одержаного розчину негайно фільтрують через фільтраційну установку "Стері-тест", мембрани якої попередньо зволожені 30 мл стерильної рідини №2.

Після закінчення фільтрації мембрани каністр відмивають 5 раз порціями по 100 мл стерильної рідини № 2.

Після фільтрації в одну каністру вносять 100 мл стерильного рідкого тогліколевого середовища, з попередньо внесеною пеніциліназою 500000 ОД та інкубують в термостаті при температурі 30-35 °С протягом 14 діб, в іншу каністру вносять 100 мл стерильного соєво-казеїнового живильного середовища, з попередньо внесеною пеніциліназою 500000 ОД та інкубують в термостаті при температурі 20 °С -25 °С протягом 14 діб.

Випробування проводять в двох повторностях.

МК-12. Бактеріальні ендотоксини. (ЄФ/ДФУ, 2.6.14).

Випробування проводять гель-тромб методом (метод А, граничне випробування) відповідно до вимог ЄФ/ДФУ, 2.6.14. Граничний вміст ендотоксинів - менше 0,05 МО в 1 мг.

Мінімально допустима концентрація цефотаксиму у випробовуваному розчині 0,625 мг/мл при використанні лізату з чутливістю 0,03 МО/мл.

**РОЗДІЛ 7.ПРОЄКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ .
СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЦЕФАТОКСИМУ НА ОСНОВІ
ВИСОКОПРОДУКТИВНОГО ШТАМУ**

***Acetmonium chrysogenum* RNCMF-4081D**

Галузь і застосування корисної моделі

Винахід належить до галузі фармацевтичної біотехнології, зокрема до розробки технології підвищення виходу антибіотиків, спрямованих на покращення і охорону здоров'я населення. Запропонована корисна модель стосується створення штаму *Acetmonium chrysogenum* RNCMF-4081D, що володіє високою цефалоспорин-синтезувальною здатністю і культивується на оптимізованому поживному середовищі.

Антибіотик призначений для подальшої трансформації у цефатоксим у медичній практиці з метою лікування пухлин.

Корисна модель може бути впроваджена в рамках системи заходів на біотехнологічних підприємствах з метою оптимізації біотехнологічної технології виробництва цефалоспориноу С і цефатоксиму. Насичення вітчизняного ринку протипухлинними лікарськими засобами на основі цефалоспориноу С, сприяє значному покращенню статистики лікування ракових захворювань населення.

Відомі аналоги та їх основні недоліки

Виходячи з біосинтетичного шляху цефалоспориноу, у його синтезі ключову роль відіграють гени *cefT*, *cefM* і *cefP*, що кодують мембранні білки, що відіграють значну роль у регулюванні синтезуантибіотику. Гени *cefG* і *cefEF* кодують білки, відповідальні за останні етапи синтезу цефалоспориноу С. Згідно з попередніми дослідженнями, експресія *cefG* часто являє собою обмежувальний етап, вузьке місце для біосинтезу. Експресія *CefG* досить низька у багатьох високопродуктивних штамів *A. chrysogenum*, що призводить до неефективного перетворення деацетилцефалоспориноу С у цефалоспорин[10-13, 15].

					НУХТ БТЕК 02.02.06. КР ПЗ			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Куцак А. А.			Розділ 7. Проект заявки на корисну модель	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
Перевір.		Лич І.В.					73	87
Реценз.						73		
Н. Контр.						Кефедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В.П.						

Однак у всіх дослідженнях підвищення виходу цефалоспорину було зосереджено на штаммах дикого типу з низьким виходом цефалоспорину С [11, 16-18]. Тому вкрай важлива генетична модифікація високоврожайних штамів для промислового застосування з метою отримання антибіотику у промислових масштабах та як наслідок, зниження ціни кінцевого продукту.

У цьому дослідженні штам *A. Chrysogenum* ATCC 11550 був використаний для подальшої генетичної модифікації у штаму *A.chrysogenum* RNCMF-4081D, що закладає основу для майбутнього широкомасштабного промислового виробництва цефалоспорину С і цефатоксиму, шляхом прямої ферментації [11].

Постановка задачі корисної моделі та її вирішення

Задача корисної моделі полягає у створенні високопродуктивного штаму *A. chrysogenum*, що володіє високою цефалоспорин синтезувальною здатністю і за рахунок впливу мутагенних речовин, здатен до синтезу максимальної кількості антибіотику.

Поставлена задача вирішується тим, що із штаму *A. Chrysogenum* ATCC 11550, отримують *A. chrysogenum* RNCM F-4081D шляхом 11 раундів класичного мутагенезу з використанням послідовно диметилсульфату, етиленіміну, N-нітрозон-метилсечовини та N-нітрозон-метилбіурету.

Отриманий сконструйований штам *A. chrysogenum* RNCM F-4081D продукував у майже 100 разів більше цефалоспорину, ніж *A. Chrysogenum* ATCC 11550.

Опис запропонованого способу

Використання генномодифікованого штаму *A. chrysogenum* RNCM F-4081D, дає змогу отримати високий вихід цефалоспорину С, з метою в подальшому впровадити технологію у промислове виробництво цефатоксиму і забезпечити вітчизняний фармацевтичний ринок відносно дешевим протипухлинним антибіотиком.

Клітини *A. chrysogenum* RNCM F-4081D вирощують на поживному

середовищі у колбах при 240 об/хв протягом 120 год за 28° С. Склад поживного середовища: кукурудзяний екстракт– 100г/л, декстрин – 60г/л, кукурудзяний крохмаль – 25г/л, K_2HPO_4 – 5г/л, глюкоза – 5 г/л, MgSO_4 – 3,5 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 14 г/л, соєва олія – 20 г/л і з доповненням р-н мікроелементів (мг/л: $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 18, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 150, $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 30, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ –70)[11].

Щоб оцінити рівень експресії генів використовували ПЦР. Для розрізнення ампліфікації мРНК і гДНК використовували інтронфланкуючіпраймери, за винятком безінтронних генів *pcbAB*, *pcbC* і *cefEF*. Як контроль нормалізації використовувався ген, що кодує гамма-актин. Реакції ПЛР проводили з використанням суміші SYBR Green I PCR MasterMix згідно з протоколом виробника. Реакції проводили за допомогою CFX96 Real-Time. Система детекції ПЦР (Bio-Rad, США). Були використані наступні умови: (1) 95 °С протягом 3 хв, (2) 95 °С протягом 10 с, (3) 60 °С протягом 50 с–зчитування пластини, (4) перехід до 2, 40 разів. Отримані результати аналізували за допомогою програмного забезпечення Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, США).

Позаклітинні титри цефалоспорину та його проміжних сполук у культуральному середовищі визначали аналізом ВЕРХ із використанням ізократичного потоку в ацетонітрил/ортофосфорна кислота/вода. Сполуки розділяли на колонці YMC-Pack ODSA з розміром частинок 5 мкм при швидкості потоку 1,0 мл/хв і детектували при довжині хвилі 254 нм.

Щоб отримати чистий цефалоспорин С, культуральну рідину відфільтровують і центрифугують при 12000 об/хв протягом 15 хв. Отриманий супернатант повторно відфільтровують і екстрагують розчинником, що дозволяє отримати водний розчин цефалоспорин С. Далі, на етапі хімічного синтезу, цефалоспорин перетворюється на цефотаксиму натрієва сіль.Отриману цефотаксиму натрієву сільвисушують до кристалічного стану і контролюють за показниками у таблиці 1 [18].

Специфікація на Цефотаксиму натрієва сіль

Показник	Нормування
Опис	Порошок білого або злегка жовтуватого кольору. Гігроскопічний. Розчинність. Легко розчинний у воді Р, помірно розчинний у метанолі Р, практично не розчинний в ефірі Р.
Ідентифікація	<p>А. Інфрачервоний спектр субстанції має відповідати спектру ФСЗ цефотаксиму натрієвої солі</p> <p>В. Визначення проводять методом тонкошарової хроматографії, використовуючи як тонкий шар силікагель HF2[^] силанізований Р. Випробовуваний розчин. 20 мг субстанції розчиняють у 5.0 мл суміші рівних об'ємів метанолу Р і 0.067М фосфатного буферного розчину рН 7.0 Р. Розчин порівняння (а). 20 мг ФСЗ цефотаксиму натрієвої солі розчиняють у 5.0 мл суміші рівних об'ємів метанолу Р і 0.067 М фосфатного буферного розчину рН 7.0 Р.</p> <p>С. Близько 2 мг субстанції поміщають у пробірку заввишки близько 150 мм і діаметром 15 мм і змочують 0.05 мл води Р. Потім додають 2 мл розчину формальдегіду в кислоті сірчаній Р і перемішують обертальними рухами; одержаний розчин має бути яскраво-жовтим. Пробірку нагрівають у водяній бані протягом 1 хв; поступово з'являється коричневе забарвлення.</p> <p>Д. Субстанція дає реакцію на натрій.</p>
Кількісне визначення	<p>Визначення проводять методом рідинної хроматографії. Випробовуваний розчин. 25.0 мг субстанції розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл. Розчин порівняння (а). 25.0 мг ФСЗ цефотаксиму натрієвої солі розчиняють у рухомій фазі та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 25.0 мл.</p> <p>Розчин порівняння (с). До 1.0 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р додають 4.0 мл випробовуваного розчину. Одержаний розчин нагрівають при температурі 40 °С протягом 2 год, додають 5.0 мл буферного розчину рН 6.6 Р і 1.0 мл розчину натрію гідроксиду розведеного Р.</p> <p>Поперемінно хроматографують 10 мкл розчину порівняння (а) і 10 мкл розчину порівняння (с).</p> <p>Хроматографують по 10 мкл розчин порівняння (а) шість разів. Хроматографічна система вважається придатною, якщо відносне стандартне відхилення для площі піка цефотаксиму становить не більше 1.0 %. Поперемінно хроматографують 10 мкл випробовуваного розчину і 10 мкл розчину порівняння (а).</p>
Стерильність	Якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури стерилізації, вона має витримувати випробування на стерильність.
Бактеріальні ендотоксини	Бактеріальні ендотоксини. Менше 0.05 МО/мг, якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування без подальшої процедури видалення бактеріальних ендотоксинів.
Пакування	Первина упаковка. У скляні флакони із брунатного скла по 25 мл, із резиноюю пробкою та обтиснуті сталевую кришкою. Вторинна упаковка. Картонна пачки із 1 скляним флаконом.

Винахід належить до галузі фармацевтичної біотехнології, зокрема до розробки технології підвищення виходу антибіотиків, спрямованих на покращення і охорону здоров'я населення. Запропонована корисна модель стосується створення штаму *A. chrysogenum* RNCM F-4081D, що володіє високою цефалоспорин-синтезувальною здатністю і культивується на оптимізованому поживному середовищі.

Винахід передбачає використання інструментів генетичної інженерії з метою конструювання штаму *A. chrysogenum* RNCM F-4081D, який в оптимізованих умовах культивування здатний до стабільного синтезу високих концентрацій цефалоспору С і є сировиною для отримання цефотаксиму.

Цефотаксим призначений для лікування ракових захворювань на різних стадіях розвитку захворювання у дорослих і дітей.

ВИСНОВКИ

В даній кваліфікаційній роботі підкреслюється потенціал бета-лактамних антибіотиків, а саме цефотаксиму, як специфічного та селективного протипухлинного препарату для лікування карциноми носоглотки. Механістично показано, що індукція ферроптозу через індукцію *HMOX1* опосередковує протипухлинну активність цефотаксиму. Результати забезпечують альтернативне лікування карциноми носоглотки, показуючи, що існуючі цефалоспоринові антибіотики є специфічними та селективними протипухлинними препаратами.

Продуцентом для Цефотаксиму було обрано нитчасті гриби *Acremonium chrysogenum* *BKMF-4081D*. Гриби цього роду є мезофілами, температурний оптимум 25-28 °С. По відношенню до кисню – аероби. При культивуванні рівень рН середовища повинен складати 5,4-5,7. Продуцент сприяє збільшенню рівня антибіотикоутворення в 2 рази, скорочення часу ферментації і, відповідно, підвищенню конкурентоспроможності виробника.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Урекешов Б.С.. Мікробіологічні основи антимікробної терапії та антибіотикорезистентності бактерій. – Навчальний посібник. – Актобе. – 2009. – 102 с
2. Біотехнологія антибіотиків: Лабораторний практикум : навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія», освітня програма «Біотехнології» / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: Л. Б. Орябінська, Л. П. Дзигун, В. Ю. Поліщук. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. – 40 с.
<https://ela.kpi.ua/server/api/core/bitstreams/7b927867-07f3-4bbb-975e-df6fa26fb182/content>
3. Szafraniec E., Majzner K., Farhane Z., Byrne H. J., Lukawska M., Oszczapowicz I., et al. Spectroscopic studies of anthracyclines: structural characterization and in vitro tracking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016, 169: 152-160. doi: 10.1016/j.saa.2016.06.035
4. Pollap A., Kochana J. Electrochemical immunosensors for antibiotic detection. *Biosensors*. 2019, 9(2): 61. doi: 10.3390/bios9020061
5. Brown K. V., Wandt B. N., Metsa-Ketela M., Nybo S. E. Pathway engineering of anthracyclines: Blazing trails in natural product glycodiversification. *The Journal of Organic Chemistry*. 2020, 85(19): 12012-12023. doi: 10.1021/acs.joc.0c01863.
6. Han A. R., Park J. W., Lee M. K., Ban Y. H., Yoo Y. J., Kim E. J., Yoon Y. J. Development of a *Streptomyces venezuelae*-based combinatorial biosynthetic system for the production of glycosylated derivatives of doxorubicin and its biosynthetic intermediates. *Applied and environmental microbiology*. 2011, 77(14): 4912-4923. doi: 10.1128/AEM.02527-10.
7. Hashimoto M., Katsura H., Kato R., Kawaide H., Natsume M. Effect of pamamycin-607 on secondary metabolite production by *Streptomyces* spp.

- Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2011, 75(9): 1722-1726. doi: 10.1271/bbb.110251.
8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>
 9. Li W., Yang X., Yang Y., Zhao L., Xu L., Ding Z. A new anthracycline from endophytic *Streptomyces* sp. YIM66403. *The Journal of antibiotics*. 2015, 68(3): 216-219. doi:10.1038/ja.2014.128.
 10. Буценко Л. М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посіб. / Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. – К. : НУХТ, 2010. – 323 с
 11. Пухлини. Етіологія, патогенез. Доброякісні і злоякісні пухлини. Гістогенетична, морфологічна, клінічна і міжнародна (TNM) класифікації. Клінічні групи онкологічних хворих. Клінічні прояви. Методи діагностики. Принципи лікування : метод. вказ. до практ. занять та самост. роботи студентів 3-го курсу II та IV мед. фак-тів з дисципліни "Загальна хірургія" / упоряд. В. О. Сипливий, А. Г. Гузь, Д. В. Євтушенко та ін. – Харків : ХНМУ, 2020. – 20 с.
 12. Bignell D.R.D., Seipke R.F., Huguet-Tapia J.C., Chambers A.H., Parry R.J., Loria R. (2010) *Streptomyces scabies* 87-22 contains a coronafacic acid-like biosynthetic cluster that contributes to plant–microbe interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(2), 161–175. DOI:10.1094/MPMI-23- 2-0161
 13. Valcovici M., Andrica F., Serban C. et al. Cardiotoxicity of anthracycline therapy: current perspectives // *Archives of Medical Science*. – 2016. – Vol. 12. – P. 428 – 435
 14. Szafraniec E., Majzner K., Farhane Z., Byrne H. J., Lukawska M., Oszczapowicz I., et al. Spectroscopic studies of anthracyclines: structural characterization and in vitro tracking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016, 169: 152-160. doi: 10.1016/j.saa.2016.06.035
 15. Li H., Krueger C. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives // *Pharm. Ther.* 2014. Vol. 51. P. 239–255.

16. Williams L., Colgrave M., Searle M. Drug recognition of a DNA single strand break // *Eur. J. Biochem.* 2012. Vol. 269. P. 1726–1733.
17. Guilfoile P. G., Hutchinson C. R. A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. Vol. 63. P. 6703–6709.
18. Патент України на винахід № 118567. Спосіб отримання штамів *Streptomyces nogalater* – надпродуцентів ногаламіцину / Федоренко В.О., Фоменко І.С., Бондарчук Т.І. Опубл. 10.08.2017.
19. Li H., Krueger C. The biochemical pharmacology of nogalamycin and its derivatives // *Pharm. Ther.* 2014. Vol. 51. P. 239–255.
20. Громико О., Федоренко В. Вплив мутагенів на антибіотичну активність *Streptomyces nogalater* IMET43360 – продуцента протипухлинного антибіотика ногаламіцину // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* 2015. Вип. 40. С. 16–22.
21. X Wang, X Tian, Y Wu, X Shen, S Yang, S Chen / Enhanced doxorubicin production by *Streptomyces peucetius* using a combination of classical strain mutation and medium optimization // *Preparative Biochemistry and Biotechnology.* – 2018. – P. 1–8.
22. Wei J., He L., Niu G. Regulation of antibiotic biosynthesis in actinomycetes: perspectives and challenges. *Synthetic and systems biotechnology.* 2018, 3(4): 229-235. doi: 10.1016/j.synbio.2018.10.005.
23. Xia H., Zhan X., Mao X. M., Li Y. Q. The regulatory cascades of antibiotic production in *Streptomyces*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2020, 36(1): 1-9. doi: 10.1007/s11274-019-2789-4.
24. Atroshenko D.L., Shelomov M.D., Zarubina S.A., Negru N.Y., Golubev I.V., Savin S.S. Multipoint TvDAAO Mutants for Cephalosporin C Bioconversion. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(18): 4412. Doi: 10.3390/ijms20184412

25. Nie Z., Luo H., Li J., Sun H., Xiao Y., Jia R., Liu T., Chang Y., Yu H., Shen Z. HighThroughput Screening of T7 Promoter Mutants for Soluble Expression of Cephalosporin C Acylase in E. Coli. Appl. Biochem. Biotechnol. 2020, 190(1):293304.
26. Dumina M., Zhgun A., Novak M., Domratcheva A., Petukhov D., Dzhavakhiya V., Eldarov M., Bartoshevitch E. Comparative gene expression profiling reveals key changes in expression levels of cephalosporin C biosynthesis and transport genes between low and highproducing strains of Acremonium chrysogenum. World J. Microbiol. Biotechnol. 2014; 30:2933–2941.
27. Цефтобипрол (Ceftobiprolum) – описание вещества, инструкция, применение, противопоказание и формула [Электронный ресурс] // Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_3810.htm
28. Healthy Food by Zegin, DOO Zegin, Skorje Republic of Macedonia
29. Федір Юрочко. Журнал : «Медицина світу». Київ. 2018
30. Бурбелло А.Т., Шабров А.В., Денисенко П.П. Сучасні лікувальні засоби. — СПб, 2013
31. Принципи лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями [Електронний ресурс] Режим доступу : <https://compendium.com.ua/uk/tutorials-uk/onkologiya/rozdil-nbsp-5-printsipi-likuvannya-patsiyentiv-zi-zloyakisnimi-novoutvorenniyami/>
32. Цефалоспоринові антибіотики спеціально та вибірково націлені на карциному носоглотки. 2021. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33831425/>
33. Цефотаксим – БХФЗ. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <http://bcpp.com.ua/product/tsefotaksim-bhfz>
34. Description of Acremonium [Електронний ресурс] – Режим доступу: http://www.eol.org/data_objects/16890823

35. Український ринок лікарських засобів [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://pharma.net.ua/analytic/analysis/22637-ukrainskij-roznychnij-rynok-lekarstvennyh-sredstv-po-itogam-2019-goda>.
36. Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації до викон. курс. проекту для студ. напряму підготовки 6.051401 «Біотехнологія» ден. форми навч. / уклад. Т.П. Пирог, Ю.В. Карлаш, В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2015. – 92 с.
37. Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. Industrial enzymatic production of cephalosporin-based beta-lactams. *Adv. Biochem Eng. Biotech.* 2008, 88: 179–215. doi: 10.1007/b99261.
38. Atroshenko D.L., Shelomov M.D., Zarubina S.A., Negru N.Y., Golubev I.V., Savin S.S. Multipoint TvDAAO Mutants for Cephalosporin C Bioconversion. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(18): 4412. Doi: 10.3390/ijms20184412
39. Nie Z., Luo H., Li J., Sun H., Xiao Y., Jia R., Liu T., Chang Y., Yu H., Shen Z. HighThroughput Screening of T7 Promoter Mutants for Soluble Expression of Cephalosporin C Acylase in E. Coli. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2020, 190(1):293304. Doi: 10.1007/s1201001903113y.
40. Dumina M., Zhgun A., Novak M., Domratcheva A., Petukhov D., Dzhavakhiya V., Eldarov M., Bartoshevitch E. Comparative gene expression profiling reveals key changes in expression levels of cephalosporin C biosynthesis and transport genes between low and highproducing strains of *Acremonium chrysogenum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 30:2933–2941. Doi: 10.1007/s1127401417211
41. Ja H.L., Hah Y.Y., Xiaoguang Y., Dong S.K., Ju H.L., Soo K.L., Sung O.H., Seung W.K. Utilization of Algal Sugars and Glycerol for Enhanced Cephalosporin C Production by *Acremonium chrysogenum* M35. *Lett. Appl. Microbiol.* 2017;64(1):6672. Doi: 10.1111/lam.12684

42. Hongzhen L., Jingshu Z., Guoqiang Y., Yanli Z., Han L., Zhenni H., Zhongping S. Performance improvement of cephalosporin C fermentation by *Acremonium chrysogenum* with DOStat based strategy of co-feeding soybean oil and glucose. J. Proc. Biochem. 2013; 48(12): 1822-1830 doi: org/10.1016/ j.procbio.2013.09.021
43. Карцинома. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656823000232>
44. Карцинома. [Електронний ресурс] – Режим доступу: Yu-Pei Chen, Anthony T C Chan, Quynh-Thu Le, Pierre Blanchard, Ying Sun, Jun Ma, Nasopharyngeal carcinoma, The Lancet, Volume 394, Issue 10192, 2019. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140673619309560>
45. Чисельність населення (за оцінкою) у 2021 році \\
https://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2017/ds/kn/kn_u/kn1217_u.html
46. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://life.pravda.com.ua/health/2020/02/4/239804/>
47. Прогноз ООН \\
<https://suspilne.media/790237-prognoz-oon-u-2100-roci-naseledda-ukraini-skorotitsa-do-153-mln/>
48. Спосіб біосинтезу Цефалоспорину С з використанням нового штаму *Acremonium chrysogenum* ВКМ F-4081D. [Електронний ресурс] – Режим доступу: <https://patents.google.com/patent/RU2426793C2/ru>
49. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв Електронний ресурс : Навч. посібник. – К.: НУХТ, 2022. – 373 с.
50. Виробництво антибіотиків. Способи одержання [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://allreferat.com.ua/uk/organizaciya_vurobnuctva/kurovovaya/4970/page/8.

51. Конспект лекцій з дисципліни «Технологія антибіотиків та лікарських препаратів» освітньо-професійної програми першого (бакалаврського) рівня вищої освіти зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» усіх форм навчання / Укладач: Головей О.П. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. – 121 с.
52. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М., Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
53. Вакуум-випарний апарат [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1656/vakuum-viparnij-aparat>
54. Молоткові дробарки і млини [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://studfile.net/preview/9170821/page:3/>.
55. Допоміжне обладнання для виробництва таблеток Вібраційна просівальна машина [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://ua.pharmapackingmachine.com/news/supportingequipmentforpi>
productionvi
56. 350 L STAINLESS STEEL 316 REACTOR WITH AGITATION AND JACKET. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://comquima.com/en/equipo-industrial/reactors/used-350-l-stainless-steel-316-reactor-with-agitation-and-jacket>
57. Перистальтичний насос РТ 25. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://tapflo.ua/images/tapflo_hose_pumps_ua.pdf
58. Aquaculture Vacuum Sewage Treatment Equipment Rotary Floer Drum Filter for Water Treatment. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://glenvironment.en.made-in-china.com/product/qOkGyFXIKdhe/China-Aquaculture-Vacuum-Sewage-Treatment-Equipment-Rotary-Floer-Drum-Filter-for-Water-Treatment.html?pv_id=1i9h51u1t4c5&faw_id=1i9h528kj5dd
59. Насос відцентровий М-300С 1,1 кВт SAER (7 м³/год, 48 м). [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://geyser.com.ua/nasos-tsentrobezhnny-m-300s-1.1-kvt-saer/>

- 60.250 LITRES STAINLESS STEEL REACTOR WITH JACKET AND AGITATION. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://comquima.com/en/equipo-industrial/reactors/used-250-litres-stainless-steel-reactor-with-jacket-and-agitation>
- 61.500L/H Ultrafiltration UF Membrane Equipment Wastewater Recycling System /Mineral Water Plant Price. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.alibaba.com/product-detail/500L-H-Ultrafiltration-UF-Membrane-Equipment_1600444720354.html
- 62.ZONESUN 100L 200L 300L 500L Sanitary Stainless Steel Vertical Cosmetic Liquid Chemical Mixing Equipment Tank. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.zonesunpack.com/products/zonepack-100l-200l-300l-500l-sanitary-stainless-steel-vertical-cosmetic-liquid-chemical-mixing-equipment-tank?variant=32410352812129>
- 63.Resin Column ,ion exchange column,chromatography column. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://www.alibaba.com/product-detail/Resin-Column-ion-exchange-column-chromatography_1601007619449.html?spm=a2700.7724857.0.0.3f621356hd4eGZ
- 64.Vertical Industrial Dryer from Pasty to Free Flowing. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.ekato.com.cn/en/products-2/vacuum-dryer-solidmix/>
- 65.Ліофілізатор Сублімаційна сушарка вакуумна для фруктів, ягід, ліків дрібносерійна 12 кг/партія. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://ten24.prom.ua/ua/p1945557325-liofilizator-sublimatsionnaya-sushka.html>
- 66.Молотковий промисловий млин дробарка Vektor ХН-230.[Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://industrial-kitchen.com.ua/molotkovaya-promyshlennaya-melnitsa-drobilka-vektor-xh-230-uk?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw6oi4BhD1ARIsAL6pox1_s4StRGY2EKqUMuuG2v4hNTs59UKCAcqza7T3sTbn7uHBS_BSuxsaAvCtEALw_wcB

67. Вібросито. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://pnevmo-c.com.ua/ua/katalog-obladnannya/vibratsiyne/vibrosito1.html>
68. Європейської Комісії C(2022) 5938 final The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 4. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Annex 1. Manufacture of Sterile Medicinal Products. – European Commission, Brussels, 22.8.2022, C(2022) 5938 final. – 58 p.
69. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: <https://www.beckman.ua/air-particle-counters/met-one-3400-series>
70. [Електронний ресурс] – Режим доступу до ресурсу: https://microstop.ua/product/sterillium_pur_500/?srsltid=AfmBOoqqz715G0kLzIw8X2x6JEIP2IYVmXm5xE32wHRbo5yqVaOiVtkx