

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

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

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

« » лютий 2023 р.

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

« » лютий 2023 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності 162 «Біотехнології та
біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Фармацевтична
біотехнологія»
на тему: «Біотехнологія сидерофорів з антимікробною
активністю»

Виконав: здобувач 2 курсу, групи ФБ-2-2М

Підгерська Тетяна Олегівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник Карлаш Юрій Васильович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(прізвище та ініціали) (підпис)

Рецензент Вікторія СТОЙКО
(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)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“ 01 ” листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Підгерської Тетяни Олегівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Біотехнологія сидерофорів з антимікробною активністю
керівник роботи Карлаш Юрій Васильович, к.т.н., доцент

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

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

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2023

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Streptomyces pilosus* ATCC 19797
цільовий продукт: дефероксамін

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Розділ 1. Характеристика сидерофорів як зазілоспецифічних хелаторів.
Розділ 2. Біотехнологічні особливості отримання сидерофорів. Розділ 3.
Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу. Розділ 4.
Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу. Розділ 5.
Обґрунтування вибору біологічного агента. Розділ 6. Підбір технологічного
обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних
потоків по стадіях. Розділ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми
одержання лікарського засобу. Розділ 8. Специфікація обладнання. Розділ 9.
Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення
десфералу. Розділ 10. Опис лікарського засобу згідно АНД.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема – 1 аркуш формату А2. Апаратурна схема – 1 аркуш
формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№1	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика сидерофорів як залізоспецифічних хелаторів.	01.11.2022-04.11.2022	
2	Біотехнологічні особливості отримання сидерофорів.	07.11.2022-11.11.2022	
3	Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	14.11.2022-.18.11.2022	
4	Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу.	21.11.2022-25.11.2022	
5	Обґрунтування вибору біологічного агента.	28.11.2022-02.12.2022	
6	Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях.	05.12.2022-09.12.2022	
7	Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу	12.12.2022-16.12.2022	
8	Специфікація обладнання.	19.12.2022-23.12.2022	
9	Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення десфералу.	26.12.2022-06.01.2023	
10	Опис лікарського засобу згідно АНД.	09.01.2023-13.01.2023	
11	Оформлення пояснювальної записки	16.01.2023-20.01.2023	
12	Виконання графічної частини проекту	23.01.2023-31.01.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Тетяна ПІДГЕРСЬКА _____
(ім'я та прізвище)

Юрій КАРЛАШ _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технології, технологічної та апаратурної схем отримання препарату Десферал на основі сидерофору дефероксаміну В, що синтезований *Streptomyces pilosus* АТСС 19797 в кількості 5 г/л, на поживному середовищі з соєвим борошном та манітом при постійній аерації середовища.

Дефероксамін В – це природний сидерофор, що володіє протимікробними властивостями і входить до складу препарату Десферал як діюча речовина у вигляді метансульфонату дефероксаміну В. Десферал використовується для лікування анемій, що потребують переливання крові. Потужність виробництва Десфералу на рік становить 730 кг.

Технологія одержання препарату Десферал включає наступні стадії: допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, підготовка води, а також підготовка первинної упаковки), технологічний процес (отримання неочищеного хлориду дефероксаміну В (відділення біомаси, іонообмін, концентрування, осадження та кристалізація, фільтрування), отримання очищеного хлориду дефероксаміну В (приготування 5% розчину дефероксаміну та його освітлення, фільтрування домішок, кристалізація, фільтрування кристалів, висушування кристалів), отримання метансульфонату дефероксаміну В (приготування 5% розчину дефероксаміну, іонообмін, стерильна фільтрація, розлив розчину по флаконах, закупорювання, ліофільне висушування, обкатка алюмінієвими ковпачками)) та стадії пакування, які наведені в технологічній та апаратурній схемі.

Кваліфікаційна робота складається з вступу, десяти розділів, списку використаних джерел, графічної частини (1 креслення формату А1 та 1 креслення формату А2) та додатків. Загальний обсяг роботи – 161 сторінка, 9 рисунків, 22 таблиці.

Ключові слова: сидерофор, дефероксамін В, *Streptomyces pilosus* АТСС 19797, Десферал, анемія, порошок, флакони.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИДЕРОФОРІВ ЯК ЗАЛІЗОСПЕЦИФІЧНИХ ХЕЛАТОРІВ.....	7
1.1. Роль сидерофорів в життєдіяльності мікроорганізмів	7
1.2. Антимікробні властивості сидерофорів та їх роль у створенні нового класу терапевтичних засобів.....	10
РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ СИДЕРОФОРІВ.....	21
2.1. Особливості біосинтезу сидерофорів мікроорганізмами.....	21
2.1.1 Особливості біосинтезу сидерофорів бактеріями.....	22
2.1.2 Особливості біосинтезу сидерофорів грибами та дріжджами.....	30
2.2. Біотехнологія отримання сидерофорів з різних культур мікроорганізмів.....	34
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ	35
3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу, галузей використання, потреби у лікарському засобі.....	35
3.1.1 Аналіз фармакологічних властивостей Десфералу.....	36
3.1.2 Галузі використання.....	38
3.1.3 Визначення кількості хворих серед населення.....	41
3.2. Розрахунок потреби субстанції для випуску Десфералу ...	43
3.2.1 Розрахунок потреби в Десфералі.....	43
3.2.2 Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів).....	43
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ФОРМИ ВИПУСКУ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....	46
4.1 Обґрунтування форми випуску лікарського засобу.....	46

4.2 Обґрунтування вибору первинної та вторинної упаковки...	49
РОЗДІЛ 5. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.	54
РОЗДІЛ 6. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ З УРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....	59
РОЗДІЛ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ.....	71
7.1 Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу та кількості серій на рік.....	71
7.2. Підбір технологічного обладнання.....	75
7.3. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовка персоналу, дезінфікуючих засобів, повітря).....	78
7.3.1 Вибір класів чистоти виробничих приміщень.....	78
7.3.2 Вибір дезінфікуючих та мийних засобів.....	79
7.3.3 Підготовка вентиляційного повітря	84
7.3.4 Підготовка персоналу.....	86
7.4. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки...	88
7.5. Обґрунтування вибору підготовки води.....	91
7.6. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	95
РОЗДІЛ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	108
РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ДЕСФЕРАЛУ.....	114
РОЗДІЛ 10. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД.....	126
ВИСНОВКИ.....	143
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	145
ДОДАТКИ.....	162

ВСТУП

Сьогодні досить актуальним є пошуки нових антимікробних речовин або відкриття нових властивостей уже відомих сполук. Одними з таких речовин є сидерофори. Ці сполуки ще не набули широкого використання, однак завдяки їх здатності пригнічувати ріст певної кількості мікроорганізмів, вони є досить перспективними для розробки нових медичних засобів у майбутньому.

Сидерофори – це низькомолекулярні вторинні метаболіти, що виробляються бактеріями, грибами та рослинами. Вони мають сильну спорідненість із залізом і виробляються в основному, коли організм стикається з його дефіцитом[1].

Одним із антимікробних сидерофорів є дефероксамін В. Цей сидерофор входить до складу препарату Десферал в якості АФІ, у вигляді метансульфонату дефероксаміну В. Десферал використовується при лікуванні анемій, що потребують переливання крові. Дефероксамін В відомий завдяки здатності виводити надлишок заліза з організму при хелатній терапії. Однак протягом останніх років вчені виявили, що дефероксамін не лише виводить залізо з організму, але й пригнічує коагулазонегативні стафілококи, що є основними патогенами в пацієнтів при переливанні крові[2]. Крім того дефероксамін пригнічує *Mycobacterium tuberculosis*, що є патогеном людини[3]. А також проявляє противірусні властивості за рахунок зниження біодоступності іонів заліза та володіє протипухлинною активністю[4].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Вступ</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Підгєрська Т.О.</i>					<i>6</i>	<i>161</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Кафєдра БТМ 7</i>		
<i>Кєрївник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИДЕРОФОРІВ ЯК ЗАЛІЗОСПЕЦИФІЧНИХ ХЕЛАТОРІВ

Сидерофори –це структурно різноманітні, складні природні продукти, які пов'язують метали з надзвичайною специфічністю. Це сполуки низької молекулярної маси (зазвичай 400–1200 Да) з високим рівнем спорідненості до іонів заліза [5]. Вони являються одними з найбільш ефективних розчинних агентів зв'язуючих Fe^{3+} .

Раніше сидерофори були відомі як сидерохроми (носії кольору) або сидераміни (носії аміну), оскільки здатність до зв'язування заліза була ідентифікована не одразу [6].

1.1. Роль сидерофорів в життєдіяльності мікроорганізмів

Залізо є одним з найбільш важливих мікроелементів, необхідних для розвитку всіх організмів. Це важливий кофактор, який необхідний в мікромольних концентраціях для росту мікроорганізмів і їх основних видів метаболічної діяльності та біосинтетичних процесів. Специфічне надходження елементарного заліза в клітину є критичним для виживання мікробів, оскільки залізо міститься в цитохромах, фередоксинах та інших залізосіркопротеїдах. Воно необхідне для відновлення кисню для синтезу АТФ, відновлення ДНК-прекурсорів [7].

У звичайних умовах іони заліза в навколишньому середовищі мають низьку концентрацію біодоступності [8]. Залізо, незважаючи на те, що є четвертим за поширеністю елементом у природі, не є легкодоступним у розчиненій залізистій формі Fe^{3+} . Це пов'язано з крайньою нерозчинністю гідроксиду феруму ($K_{sp} = 10^{-38}$), який зменшує кількість вільного заліза за рН 7, якого не вистачає для оптимального росту[6].

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 1. Характеристика сидерофорів як залізоспецифічних хелаторів</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Підгерська Т.О.</i>					7	161
<i>Консульт.</i>								
<i>Керівник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		

Як наслідок, бактерії і гриби виробили різноманітні стратегії імпорту і утилізації заліза в умовах його дефіциту. Вони синтезують залізоспецифічні хелатори – сидерофори

Сидерофори – це специфічний клас молекул, які здатні зв'язуватись із залізом і утворювати розчинні Fe^{3+} комплекси. Вони ефективно зв'язують Fe^{3+} і транспортують його до клітин мікроорганізмів, де залізо зв'язується з рецепторами і потрапляє всередину клітини. Там воно звільняється і може бути використане мікроорганізмом [8].

Основна функція сидерофора полягає в тому, щоб з'єднатися із залізом, зробити його розчинним і забезпечити поглинання клітинами [9].

Сидерофори певною мірою впливають на стан мікроорганізмів. Наприклад, у грибових клітинах вони необхідні для вірулентності, стійкості до окислювального стресу, безстатевого та статевого розмноження, зберігання заліза, захисту проти токсичності викликаного залізом і взаємодії гриба з господарем [10].

Наявність сидерофорів дають переваги в пристосованості тим видам мікроорганізмів, які їх використовують, покращуючи поглинання заліза і, більш того, позбавляючи заліза конкурентів, які не можуть використовувати комплекс сидерофори-залізо[11].

Мікроорганізми виробляють велику кількість сидерофорів:

- аеробактин, ентеробактин – *Escherichia coli*;
- десферіюксамін – *Streptomyces spp.*;
- десферрігіоцин – *S. antibioticus*;
- мікобактин – *Mycobacterium tuberculosis*;
- піочелін – *Pseudomonas aeruginosa*;
- єрсиніябактин – *Yersinia pestis* [12].

Загалом всі вони поділяються на основі функціональних лігандів, які зв'язуються з важкими металами[6]. Основні групи сидерофорів включають:

- катехолатний тип (*ентеробактин, бацілбактин, петробактин*);
- гідроксаматний тип (*дефероксамін, екзохелін*);

- карбоксилатний тип (*стафілоферин А, ахробактин*);
- змішаний тип (*аеробактин, ернініябактин, піовердин, піочелін*) [12, 13].

Сидерофори катехолатного типу мають найвищу спорідненість із тривалентним залізом завдяки утворенню п'ятичленних хелатних кілець. До їх складу входить катехолатна частина (*рис. 1.1*).

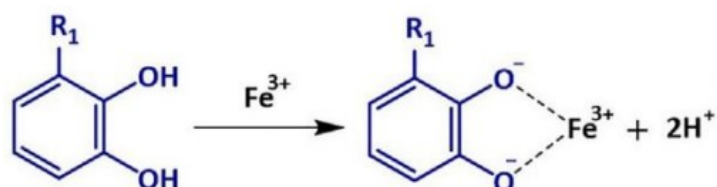


Рис 1.1 Залізовв'язувальна молекула катехолат[12]

Сидерофори гідроксаматного типу це майже всі грибні сидерофори. Вони також утворюють п'ятичленні хелатні кільця, але з меншою спорідненістю до заліза. Складаються з гідроксаматної частини (*рис. 1.2*).

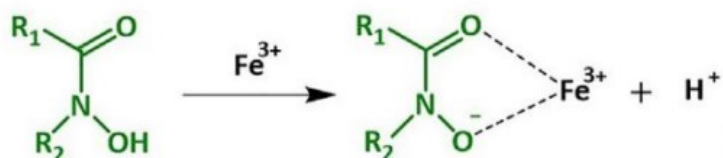


Рис 1.2. Залізовв'язувальна молекула гідроксамат[12]

Сидерофори карбоксилатного типу мають карбоксилатну та гідроксильну донорні групи. При нейтральному рН карбоксилати, як правило, є менш ефективними сидерофорами у поглинанні заліза. Однак сидерофори карбоксилатного типу мають перевагу при більш кислому рН, де вони ефективніші, ніж катехолати та гідроксамати, які залишаються протонованими. Тому цей тип сидерофорів корисний для мікробів, що живуть у кислому середовищі (*рис. 1.3*).

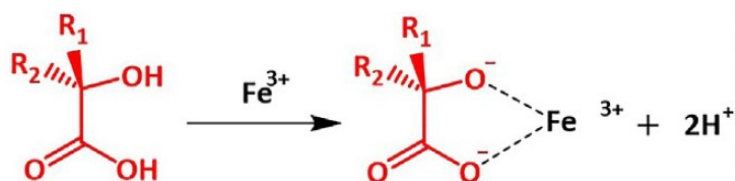


Рис 1.3. Залізовз'язувальна молекула карбоксилат [12]

Змішаний тип сидерофорів містить в своєму складі обидва фрагмента цих частин [12].

1.2. Антимікробні властивості сидерофорів та їх роль у створенні нового класу терапевтичних засобів

Багато бактерій, особливо патогенних здатні виробляти сидерофори. Мікроорганізми, особливо ті, які живуть на організмах-господарях або всередині них, конкурують за обмежені ресурси заліза. Сидерофори, які вони продукують виявляють антибактеріальні властивості, тим самим пригнічуючи ріст мікроорганізмів-конкурентів. Виграє той мікроорганізм, який продукує сидерофор з найвищою константою зв'язування заліза, тобто той, що має найвищу спорідненість до заліза. Залізне голодування є ключовим сигналом для вироблення сидерофорів [14].

За останні кілька років все більше до себе привертають увагу сидерофори з антимікробними властивостями, які можуть бути використані в медицині.

Наприклад, сидерофори, що синтезуються ціанобактеріями *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Synechococcus elongatus*, *Microcystis aeruginosa* демонструють протимікробну активність проти кількох патогенних бактерій (*Salmonella typhimurium* та *Bacillus subtilis*)[15]. Хлоркатехелін, що синтезується *Streptomyces* sp. – це мікробний сидерофор, що також проявляє антимікробну активність [16-17]. Оксихелін проявляє антимікробні властивості проти *Streptomyces* sp. GW9/1258[18]. Як повідомляє джерело [19] ніочелін пригнічує ріст деяких представників роду *Xanthomonas* та *Staphylococcus aureus*. Також ніочелін синтезований *Pseudomonas aeruginosa*

пригнічує ріст *Trypanosoma cruzi*[20]. Сидерофори, вироблені *P. fluorescens* ВВс6R8, інгібують зростання актиноміцету *S. ambofaciens* ATCC23877 [21-22].

Бактерії роду *Pseudomonas*, продукують сидерофори *піовердини*. Піовердини, виявляють виражені антибактеріальні властивості проти збудників різноманітних хвороб рослин. Дані сидерофори можуть бути розглянуті для застосування в медицині.

В таблиці 1.1 наведено певні види мікроорганізмів, які чутливі до піовердину[23].

Таблиця 1.1

Вплив піовердину на мікроорганізми

Назва мікроорганізму, ріст якого пригнічує піовердин	Зона затримки росту, мм	
	Безклітинний супернатант	Очищений сидерофор
<i>Staphylococcus aureus</i> NCIM 2079	9	12
<i>Aeromonas hydrophila</i> MTCC 646	13	16
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> MTCC 451	11	15
<i>Vibrio harveyi</i> MTCC 3438	10	14
<i>Asperillus niger</i> NCIM 586	15	11
<i>Microsporium gypseum</i> MTCC 2830	13	12
<i>Aspergillus flavus</i> MTCC 7133	18	14
<i>Penicilium oxalicum</i> MTCC 4931	13	9
<i>Fusarium oxysporum</i> MTCC 4894	14	10

Як можна побачити з табл. 1.1 піовердин проявляє антимікробні властивості до значної кількості мікроорганізмів, серед яких наявні як гриби так і бактерії. Особливо слід відмітити, що піовердин пригнічує *S. aureus*, *A. niger*, *M. gypseum*, *A. flavus*, які є збудниками хвороб людини, тому можна зробити висновок, про потенціал даного сидерофора для розробки нових медичних препаратів для боротьби з патогенами.

Загалом представники роду *Pseudomonas* синтезують широкий спектр антибіотичних речовин, серед яких сидерофори займають особливе місце. За рахунок того, що сидерофори псевдомонад швидше зв'язують залізо, воно стає недоступним для інших мікроорганізмів, які продукують сидерофори.

Таким чином псевдомонади виграють в конкурентній боротьбі за цей життєво необхідний елемент і тим самим пригнічують ріст інших мікроорганізмів [24-25].

Надмолекулярний комплекс рамноліпідів-альгінату-піовердину JRV-L-2, що синтезує *Pseudomonas aeruginosa* JRV-L, можна використовувати як противірусний засіб для лікування хвороб спричинених фітопатогенами рослин, викликані бактеріями, грибами та вірусами [26].

Сидерофор *шизокенін* має потенціал в якості діагностичного агента, зокрема, для візуалізації грампозитивних організмів в клінічній діагностиці[27].

В роботі [28] вчені досліджували бактерію *Bacillus velezensis* MBTDLP1 MTCC 13048, яка була виділена з макроводорості південно-східного прибережного регіону Індії. Було встановлено, що даний мікроорганізм продукує сидерофори і здатний пригнічувати ріст *S. aureus* (зона затримки інгібування близько 35 мм).

В статті [29] повідомляється про сидерофор ферритин, що продукує бактерія *Brevibacillus brevis* GZDF3 та його антимікробну активність проти *Candida albicans*, яка здатна спричиняти опортуністичні інфекції людини. Зони інгібування росту *C. albicans* після обробки культуральною рідиною становлять 41 ± 3 мм та 45 ± 3 мм з вихідним та оптимізованим середовищем відповідно.

Вчені, які займались розробкою аналогів *феррихрому*, встановили, що вони пригнічують *E.coli* та *P. putida* і проявляють активність широкого спектру (так само як феррихром в нативному стані) [30]. Сидерофори отримані з патогенних грибів такі як *феррикроцин* (*Aspergillus fumigatus*) викликають особливий інтерес в протигрибковій терапії[31].

Було встановлено, що гриб *Clonostachys compactiuscula* FKR-0021, синтезує сидерофори *копрогени*, які впливають на збудників малярії *Plasmodium falciparum* FCR3 та K1 *in vitro* [32].

Вплив копрогенів на штами *Plasmodium falciparum*

Тип сидерофору	Концентрація напівмаксимального інгібування IC ₅₀ , мкМ	
	Штам <i>Plasmodium falciparum</i> K1	Штам <i>Plasmodium falciparum</i> FCR3
Копроген А	9,9	5,5
Копроген В	5,4	3,5
Копроген С	5,2	3,0
N ¹⁴ -пальмітоил-копроген	2,6	1,7

Аналізуючи дані таблиці можна зробити висновок, що найбільш ефективним є копроген А. Однак, всі види копрогенів представлені в табл. 1. 2 можуть бути використані для розробки протималярійних засобів

Дріжджі *Aureobasidium pullulans* HN6.2 здатні виробляти сидерофор, що проявляє антимікробну активність проти *B. subtilis*, *Vibrio anguillarum* та *V. parahaemolyticus* [33]. Відомо, що *V. parahaemolyticus* викликає шлунково-кишкові захворювання людини, а *V. anguillarum* є збудником хвороб риби. Однак, як повідомляє джерело [34], були зареєстровані випадки смертності людей після ураження *V. anguillarum*.

Одним із сидерофорів, що вже використовується в медицині, є *дефероксамін* (сидерофор гідроксаматного типу), який синтезується культурою *Streptomyces pilosus*. Він відомий тим, що його використовують для лікування перевантаженням крові залізом. Однак даний сидерофор також проявляє і антимікробні властивості. Він перешкоджає росту коагулазонегативних стафілококів, які являються основними патогенами у пацієнтів [2]. Також даний сидерофор відіграє певну роль під час перебігу атеросклерозу. Справа в тому, що це захворювання супроводжується запальним процесом, який викликають різноманітні збудники, а *дефероксамін* пригнічує їх ріст і тим самим зменшує запальний процес і пошкодження тканин [35]. В джерелі [3] повідомляється про те, що *дефероксамін* впливає на збудників туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis*.

Зокрема, сидерофор бере участь у підтримці функції інфікованих імунних клітин, а саме посилює гліколітичний метаболізм в макрофагах. Дефероксамін підтримує функцію вродженого імунітету індуюючи виробництво білка IL1 β в макрофагах людини під час раннього зараження *M. tuberculosis*. Відомо також, що дефероксамін підвищує протиракову активність трихостатину А [36].

А в джерелі [37] повідомляється про те, що й сам дефероксамін проявляє протипухлинну активність, оскільки залізо сприяє зростанню та розмноженню злоякісних клітин, тому хелатори заліза можуть пригнічувати ріст пухлинних клітин, виснажуючи внутрішньоклітинний вміст заліза.

Дефероксамін також має певний інгібуючий ефект проти *Porphyromonas gingivalis in vitro*, що є збудником парадонтиту людини. Також в присутності дефероксаміну підвищується згубна дія H₂O₂ на бактерії [38].

VL-2397 – препарат, що знаходиться на стадії клінічної розробки, він схожий за своєю будовою на сидерофор *феррихром* і проявляє протигрибкові властивості [39]. Також в джерелах [40-42] повідомляється про те, що *феррихром* володіє протипухлинною активністю.

Новим напрямком етіологічного лікування інфекційних захворювань, викликаних антибіотикорезистентними бактеріальними штамами, є застосування сидероміцинів. *Сидероміцини* – це сидерофори (катехолати і гідроксамати), які кон'юговані з антибіотиками [43]. Власне сидерофор являє собою ніби транспортну систему, яка легко проникає в клітину, доставляючи всередину захоплене залізо і тим самим переносить і протимікробну сполуку, яка до цього ніяк не могла проникнути в клітину. Таким чином за допомогою сидерофорів створюють так званий «троянський кінь». Цей метод дає змогу розробити нові препарати, які зможуть вражати бактерії та гриби, які були раніше стійкими до лікування. Нещодавно виявлені переваги цієї стратегії призвели до синтезу серії антибіотиків на основі сидерофорів [44-45]. Одним із них є цефалоспориновий антибіотик цефідерокол [46-47].

Прикладами натуральних сидероміцинів є альбоміцини, ферримицини, даноміцини, сальміцини і мікроцини.

Перші сидероміцини, які були розроблені в 1960 році – це *ферримицини*, сидерофори, що продукуються бактеріями *Streptomyces griseoflavus*. Ферримицини (A1, A2 і B) представляють собою кон'югат *ферріоксаміна B* і антибіотиків. Ферримицини проявляють виражену антибактеріальну активність тільки проти грампозитивних бактерій, зокрема проти бактерій *S. aureus*.

Мікроцини – це невеликі, рибосомально синтезовані антимікробні пептиди, які продукуються грамнегативними бактеріями і володіють вузьким спектром антимікробної дії [43]. *Мікроцини* класу Пб, E492, H47 і M, називаються *сидерофорними мікроцинами*, оскільки дані мікроцини щільно з'єднанні з катехолатним сидерофором. Ці мікроцини використовують рецептори сидерофорів для проникнення в конкуруючі бактеріальні клітини, тим самим проявляють антимікробні властивості. Вони мають вузький спектр пригнічення, діючи на близькі види (пригнічує ріст 31 штаму *E.coli*). Ці сполуки пригнічують також ріст *Salmonella* і *Klebsiella*, які належать до родини *Enterobacteriaceae* [48].

Даноміцини і *сальміцини* складаються з тригідроксаматного даноксаміна (сидерофор) і аміноглікозидного антибіотика. Ці сполуки інгібують синтез білка стафілококів і стрептококів. *Сальміцини* були виділені з штаму бактерій *Streptomyces violaceus* і містять *ферріоксамін*, кон'югований з амінодисахаридом. Припускають, що *сальміцин* пригнічує синтез протеїнів подібно до антибіотиків аміноглікозидної групи [43].

Альбоміцини інгібують ріст як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій [43]. Було виявлено, що *Enterobacteriaceae* були чутливі до *альбоміцину*, за винятком видів, які не мають ферріко-гідроксаматної транспортної системи. Більше того, грампозитивні *S. aureus* і *Streptococcus pneumoniae* були також високочутливі до *альбоміцину* [12].

Сальміцин демонструє той самий спектр активності з грампозитивними бактеріями, що і *альбоміцин*, однак на відміну від *альбоміцину* *сальміцин*

активний проти *S. agalactiae*. Сальміцин неактивний щодо більшості грамнегативних бактерій. Виняток становлять *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* та деякі штами *Yersinia enterocolitica*, які чутливі до 10 нг/мл сальміцину, концентрації, що пригнічує грампозитивні бактерії [49].

Ще один сидерофор, який використовується на сьогодні вченими як «троянський кінь» для доставки лікарських засобів безпосередньо в патогенні бактеріальні клітини – це бацілобактин, що синтезує *Bacillus subtilis*. Бацілобактин спрямований переважно проти грампозитивних бактерій, проте він також охоплює грамнегативні бактерії, віруси, гриби [50-51].

Застосування галій-місних сидерофорів - це ще один підхід до терапії інфекцій, викликаних антибіотикорезистентними бактеріями. Було встановлено, що Ga-DFO (галій-десферріоксамін) володіє великою терапевтичною активністю при лікуванні інфекцій, викликаних *Pseudomonas aeruginosa* [43, 52].

Також комплекс дефероксаміну і кадмію (Cd-DFO) призводить до пригнічення таких мікроорганізмів як *E. coli*, *P. aeruginosa* і *C. albicans* [53].

Відомо, що *Pseudomonas* виробляють сидерофори, що захоплюють галій так само активно, як і залізо. Було проведено ряд дослідів при яких в поживне середовище додавали галій і показано, що сидерофори, які захоплюють і несуть галій повертаються в колонії мікроорганізмів. За наявності галію досліджувані колонії гинуть за рахунок того, що сидерофори зв'язані галієм не можуть захоплювати залізо, яке життєво необхідне клітинам. Також при потрапленні галію в клітини мікроорганізми гинуть оскільки це важкий метал, що є токсичним у великих кількостях. Можна припустити, що сидерофори псевдомонад можна ефективно використовувати в медицині для розробки антимікробних препаратів [54].

Нижче наведено узагальнюючу таблицю (табл. 1.3) стосовно антимікробної активності сидерофорів.

Таблиця 1.3

Антимікробні властивості сидерофорів

Назва сидерофора	Продуценти	Антимікробні властивості	Лігература
1	2	3	4
Альбоміцин	<i>Streptomyces griseus</i> СКАКЗ	Пригнічує ріст грампозитивних (<i>Staphylococcus aureus</i> і <i>Streptococcus pneumoniae</i>) та деяких грамнегативних бактерій <i>Enterobacteriaceae</i>	[12]
—	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Synechococcus elongatus</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>	Ефективні проти <i>Salmonella typhimurium</i> та <i>Bacillus subtilis</i>	[15]
Піочелін	Представники роду <i>Pseudomonas</i>	Пригнічує ріст представників роду <i>Xanthomonas</i> та <i>Staphylococcus aureus</i> . А також знижує активність <i>Trypanosoma cruzi</i>	[19] [20]
Піювердин	Представники роду <i>Pseudomonas</i> (різні штами <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i>)	Піювердин володіє вираженими протимікробними властивостями проти: <i>Staphylococcus aureus</i> NCIM 2079, <i>Aeromonas hydrophila</i> MTCC 646, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> MTCC 451, <i>Vibrio harveyi</i> MTCC 3438, <i>Asperillus niger</i> NCIM 586, <i>Microsporium gypseum</i> MTCC 2830, <i>Aspergillus flavus</i> MTCC 7133, <i>Penicilium oxalicum</i> MTCC 4931, <i>Fusarium oxysporum</i> MTCC 4894. Комплекс рамноліпідів-альгілату-піювердину застосовують як противірусний засоб.	[23] <i>Продовження табл. 1.3</i>
Шизокінен	<i>Bacillu smegaterium</i>	Має потенціал в якості діагностичного агента, зокрема, для	[27]

		візуалізації грампозитивних організмів в клінічній діагностиці.	
Ферритин	<i>Brevibacillus brevis</i> GZDF3	Пригнічує ріст <i>Candida albicans</i> , що здатна спричиняти опортуністичні інфекції людини	[29]
Феррихром	<i>Penicillium commune</i> JJHO	Виявляє активність проти <i>E. coli</i> та <i>P. putida</i> Проявляє протигрибкові властивості Володіє протипухлинною активністю	[30] [39] [40-42]
Ферикроцин	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	Активний проти стафілококів та в протигрибковій терапії	[31]
Копроген	<i>Clonostachys compactiuscula</i> FKR-0021 <i>Penicillium nalgiovense</i> NCAIM F-001333 <i>Penicillium nalgiovense</i> S1	Пригнічує життєдіяльність збудників малярії <i>Plasmodium falciparum</i> FCR3 та K1 <i>in vitro</i> . Можуть бути використані для розробки протималярійних засобів	[32]
Сидерофор гідроксаматного типу <i>Aureobasidium pullulans</i> HN6.2	<i>Aureobasidium pullulans</i> HN6.2	Проявляє антимікробну активність проти <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> та <i>V. parahaemolyticus</i> .	[33]
Дефероксамін	<i>Streptomyces parvulus</i> CBS548.68 <i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Пригнічує ріст коагулазонегативних стафілококів. Зменшує запальний процес під час перебігу атеросклерозу, пригнічуючи ріст мікроорганізмів, що його викликають. Пригнічує збудників туберкульозу <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	[2] [35] [3]

Закінчення табл.1.3

		Проявляє протипухлинну та протиракову активність	[36-37]
		Пригнічує <i>Porphyromonas gingivalis in vitro</i> , що є збудником парадонтиту людини.	[38]
Сальміцин	<i>Streptomyces violaceus</i>	Пригнічує ріст стафілококів та стрептококів	[43]
		Активний проти <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Citrobacter freundii</i> та деяких штамів <i>Yersinia enterocolitica</i>	[49]
Мікроцини	<i>Escherichia coli</i>	Пригнічує ріст <i>Salmonella</i> і <i>Klebsiella</i> , які належать до родини <i>Enterobacteriaceae</i>	[48]
Бацилбактин	<i>Bacillus subtilis</i>	Пригнічує ріст грамнегативних бактерій	[50]

Враховуючи вище сказане, можна зробити висновок, що сидерофори можуть бути використані в боротьбі зі збудниками багатьох захворювань, оскільки завдяки їх тісному взаємозв'язку з вірулентністю, стратегія заліозалежної боротьби з патогенами є перспективним напрямком для майбутніх досліджень і пропонує широкий спектр можливих терапевтичних застосувань як альтернатива поширеним типам антибіотиків [55].

Оскільки залізо має вирішальне значення для життєздатності мікробів, то його зв'язування, тобто недоступність для патогенів, є одним із засобів, що може бути використаний в медицині в якості розробки нових антимікробних засобів [56]. На основі сидерофорів створюються ряд синтетичних комплексних сполук, зокрема, це кон'югати сидерофорів з антибіотиками. За рахунок того, що сидерофори легко потрапляють всередину клітини, оминаючи цитоплазматичну мембрану, кон'югати сидерофорів так само легко доставляють антибіотик в клітину, в результаті чого вона гине [57].

Також сидерофори можуть бути використані не лише в якості переносника заліза, а й інших металів в токсичних для клітин концентраціях [54].

РОЗДІЛ 2. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ СИДЕРОФОРІВ

2.1. Особливості біосинтезу сидерофорів мікроорганізмами

Активне вивчення сидерофорів почалось в ХХ ст. і з того часу виділено та охарактеризовано їх велику кількість. Біосинтез сидерофорів протікає двома шляхами:

- нерибосомальний пептидний синтез NRPS-шлях (NRPS – від англ. *non ribosomal peptide synthesis*);
- NRPS-незалежний шлях (NIS-шлях).

NRPS-шлях веде до складання пептидних сидерофорів, до складу яких входять непротеїногенні амінокислоти та їх похідні, складання таких сидерофорів відбувається без використання РНК як матриці. Пептиди, що утворюються в результаті, зазвичай являють собою короткі олігомери від 2 до 48 залишків амінокислот. По NRPS-шляху відбувається синтез багатьох сидерофорів: *ієрсиніобактин*; *ентеробактин*; *вібріобактин*. Антибіотики пеніцилін та ванкоміцин теж є метаболітами NRPS-шляху.

Синтез і модифікація сидерофорів по NRPS-шляху здійснюється поетапно на NRP-синтезасі: 1) Спочатку відбувається активація амінокислот для пептидного синтезу через утворення тіоєфірів; 2) Далі утворення пептидного зв'язку в РСР-домени (*від англ. peptidyl carrier protein* – білок-носії пептиду); 3) Потім модифікація амінокислот, наприклад, епімеризація; 4) Наступним етапом є переетерифікація пептидного ланцюга з подальшим звільненням кінцевих метаболітів шляхом гідролізу або макроциклізації.

NIS-шлях синтезу сидерофорів здійснюється в результаті конденсації різних елементів, як правило, дикарбонових кислот (сукцинат, цитрат, α -кетоглутарат) з діамінами, аміноспиртами, спиртами..

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 2. Біотехнологічні особливості отримання сидерофорів</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архивів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Підгєрська Т.О.</i>					21	161
<i>Консульт.</i>						<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Кєрівник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>						
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

По NIS-шляху відбувається синтез таких сидерофорів як: *аеробактин*; *ахромобактин*; *ризобактин*; *вібріоферин* та ін

Для використання сидерофорів мікроорганізми мають регуляторні системи, що включають в себе ферменти та транспортні системи, які узгоджують процеси їх біосинтезу, секреції, зв'язування та звільнення заліза. Після зв'язування сидерофору з Fe^{3+} здійснюється транспорт захопленого іона заліза до цитоплазми клітини мікроорганізму. Транспорт може бути здійснений двома шляхами, або комплекс сидерофор- Fe^{3+} дисоціює на поверхні клітини і тоді іон Fe^{3+} проникає поодиноким, або комплекс не дисоціює і іон Fe^{3+} транспортується до цитоплазми закомплексованим [58].

2.1.1 Особливості біосинтезу сидерофорів бактеріями.

Сидерофори синтезує велика кількість мікроорганізмів.

Сидерофори стрептоміцетів. Серед представників роду *Streptomyces* досить поширеними антимікробними сидерофорами є *дефероксамін*, а також зустрічаються *сальміцин* та *альбоміцин* (табл 2.1).

Таблиця 2.1

Сидерофори представників роду *Streptomyces*

Штам	Джерело вуглецю та азоту, г/л	Сидерофор	Концентрація, г/л	Літ.
<i>Streptomyces parvulus</i> CBS548.68.	Глюкоза – 25 Глутамат натрію – 13 ; MOPS – 21	Дефероксамін Е	2,09	[59]
<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Кукурудзяний екстракт – 200	Дефероксамін В	1,82	[60]
<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Соеве борошно – 20 Маніт – 20 Треонін – 0,1	Дефероксамін В	5	[61]
<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Соеве борошно – 20 Манітол – 20	Дефероксамін В	1,2	[62]
<i>Streptomyces griseus</i> SCAK3	Гліцерин – 20 KH_2PO_4 – 1,8 Na_2HPO_4 – 10,2 $(NH_4)_2SO_4$ – 2	Альбоміцин	0,1	[63]

В роботі [59] описано продукцію сидерофору *дефероксаміну E* (десферіюксаміну) *S. parvulus* CBS548.68. Дослідники проводили підбір оптимального поживного середовища для найвищого синтезу сидерофору. В результаті було встановлено, що при наявності глюкози, глютамату натрію та MOPS (3-морфолінопропан-1-сульфонова кислота) концентрація сидерофору становить 2 г/л (біомаса 8,9 г/л), в порівнянні з іншими джерелами вуглецю та азоту: крохмаль і аспарагін – 96 мг/л (біомаса 2,8 г/л); крохмаль, аспарагін, MOPS– 882 мг/л (біомаса 7,9 г/л).

В роботах [60] та [61] дослідники підбирали поживне середовище для синтезу *дефероксаміну* з використанням культури *S. pilosus* ATCC 19797. Після вирощування в кількох поживних середовищах (MYB, NB, LB, соєве середовище) було встановлено, що соєве середовище є найкращим серед інших, тому його обрали для подальших досліджень.

Далі в роботі [60] в соєве середовище вводили кукурудзяний екстракт (CSL). В результаті встановлено, що повна заміна соєвого середовища (концентрація сидерофору 0,63 г/л) кукурудзяним екстрактом характеризується найвищою продуктивністю мікроорганізму (концентрація сидерофору 1,82 г/л).

В роботі [61] до базового соєвого середовища додавали різні солі. В результаті комбінації KH_2PO_4 ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; було досягнуто найвищий вихід сидерофору (5 г/л) і це свідчить про значний вплив даних солей на синтез *дефероксаміну*.

В роботі [62] вчені вивчали вплив мінералів на синтез *дефероксаміну B* *S. pilosus* ATCC 19797. Вихідне середовище містило лише маніт та соєве борошно. В процесі культивування додавали мінерали (CaCl_2 ; ZnSO_4 ; MgSO_4 ; MnCl_2 ; FeSO_4 , Na_2HPO_4) і всі вони (окрім феруму) позитивно впливають на синтез сидерофору. Загалом концентрація *дефероксаміну* становила 1,2 г/л.

В статті [63] описують оптимізацію синтезу *альбоміцину* з використанням генно-інженерного штаму *S. griseus* SCAK3, який було

отримано шляхом маніпуляцій з ДНК вихідного дикого штаму *S.griseus* ATCC 700974. В статті описане оптимальне поживне середовище, де компоненти вихідного середовища крохмаль та орнітин були замінені на гліцерин, оскільки вони ускладнюють виділення альбомуцину. В результаті було отримано 100 мг/л альбомуцину.

Сидерофори псевдомонад. Бактерії роду *Pseudomonas*, продукують сидерофори *піовердини* (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Сидерофори піовердини представників роду *Pseudomonas*

Штам	Джерело вуглецю та азоту, г/л	Концентрація сидерофорів	Літ.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090	Сукцинат– 4	24 ммоль/л	[64]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RZS9.	Сукцинат – 4,9	69,41% SU	[65]
<i>Pseudomonas putida</i> CMMB2	Сукцинат – 4 Казаїноокислоти – 4,6	81 % SU	[23]

В роботі [64] дослідники вивчали зміну синтезу *піовердина* шляхом маніпуляцій зі складом поживного середовища, на якому здійснювали культивування штаму *P.fluorescens* DSM 50090. Бактерії вирощували на двох видах поживних середовищ – середовищі Кінга В, що містить багато поживних речовин і мінімальному середовищі MMS. Враховуючи продукцію піовердину в ммоль /г сухої біомаси - виробництво сидерофорів було більш високим саме в середовищі MMS (~ 25 ммоль/г) в порівнянні з середовищем Кінга В (~ 11 ммоль/г), саме тому це середовище було обрано для подальших досліджень.

Наступним етапом було дослідження впливу джерела вуглецю на синтез сидерофорів. Найкращі результати синтезу спостерігались саме при використанні сукцинату (~ 24 ммоль/л), в порівнянні з декстрозою (~ 11 ммоль/л) та гліцерином (~ 11,5 ммоль/л). Додавання амінокислот та зміна концентрації фосфату не підвищувало синтез піовердину.

В роботі [65] проводилась оптимізація сукцинатного середовища (вихід сидерофору 63 % SU) *P. aeruginosa* RZS9. Параметри, що підлягали оптимізації: концентрація $K_2HPO_4, KH_2PO_4, (NH_4)SO_4, MgSO_4 \times 7H_2O$, бурштинова кислота, рН (6-8) та температура (22-34°C). В результаті оптимізації вихід сидерофорів становив 69,41% SU.

В роботі [23] вирощували *P. putida* CMMB2 на мінімальному середовищі MM9. Визначали вплив заліза, рН, джерела вуглецю та азоту на синтез сидерофору. Найкращим виявився сукцинат (73 % SU), казамінокислоти (71 % SU), NH_4Cl (71 % SU). Загалом додавання заліза негативно вплинуло на синтез, при його додаванні в кількості 2 мкМ (70 % SU), максимальне зростання та синтез сидерофорів спостерігався при рН 8 (71 % SU). При доповненні середовища MM9 сукцинатом (4 г/л), казамінокислотами (4,6 г/л) та NH_4Cl (10 г/л) вихід сидерофору становив 81 % SU.

В роботі [66] було проведено визначення впливу двох концентрацій Fe^{3+} (30 мкг/мл, що відповідає вмісту заліза у чорноземі, та 1000 мкг/мл – гранично допустима концентрація сполук даного елемента) на ріст досліджуваних культур псевдомонад та синтез ними сидерофорів (див табл. 2.3).

Проаналізувавши дані таблиці можна зробити висновок, що найвищий синтез сидерофорів було досягнуто саме при культивуванні *P. fluorescens* ONU 303 без додавання феруму ($16,5 \pm 0,3$ мкМ / 10^9 кл). При цьому, за присутності 30 мкг/мл іонів заліза (III) концентрація сидерофорів зменшилась у 2–7 разів. Найбільшу різницю (у більш ніж 10 разів, порівнюючи з вихідним рівнем продукції сидерофорів) було зафіксовано для штаму *P. fluorescens* ONU 303.

При збільшенні вмісту заліза (III) у середовищі, де відбувалось культивування псевдомонад, до 1000 мкг/мл встановлено повне припинення синтезу сидерофорів. Для штамів *P. aeruginosa* ONU 300 та ONU 301 взагалі не було виявлено досліджуваних сполук. Найвища кількість сидерофорів за

цієї концентрації Fe^{3+} , продукувалася штамми *P. aureofaciens*, дещо менша – культурою *P. fluorescens*.

Таблиця 2.3

Синтез сидерофорів різними штамами роду *Pseudomonas*

Продуцент	Поживне середовище	Умови культивування	Без Fe (III)		За присутності 30 мкгFe (III)/мл		За присутності 1000 мкгFe (III)/мл	
			Концентрація клітин, Хкл•10 ⁹ /мл	Концентрація сидерофорів мкМ / 10 ⁹ кл	Концентрація клітин, Хкл•10 ⁹ /мл	Концентрація сидерофорів мкМ / 10 ⁹ кл	Концентраціякл ітин, Хкл•10 ⁹ /мл	Концентрація сидерофорів мкМ / 10 ⁹ кл
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O NU 300	Середовище Кінга	37 ° C; 48 год.	4,5±0,2	13,2±0,4	5,9±0,2	8,2±0,3	12,6±0,4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O NU 301			4,3±0,3	13,0±0,4	7,7±0,3	4,3±0,2	12,0±0,4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O NU 302			4,8±0,2	12,1±0,2	10,0±0,3	4,2±0,1	12,2±0,3	0,1±0,02
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ONU 303		22 ° C; 48 год.	2,6±0,2	16,5±0,3	9,0±0,3	1,2±0,1	12,2±0,4	0,1±0,01
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ONU 304			1,5±0,1	9,9±0,1	4,2±0,1	2,0±0,2	7,3±0,1	0,3±0,1
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ONU 305			1,8±0,1	7,6±0,2	5,1±0,2	1,7±0,1	8,0±0,2	0,2±0,01
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ONU 306			1,5±0,1	7,4±0,2	5,0±0,1	2,1±0,2	7,7±0,3	0,2±0,01

Таким чином, порівнюючи ріст бактерій та накопичення ними піовердинових сидерофорів, було визначено, що на тлі підвищення біомаси здатність продукувати сидерофори суттєво пригнічується під час зростання концентрації заліза у навколишньому середовищі.

В роботі [67] вчені з національного університету імені Мечникова досліджували вплив іонів феруму на синтез сидерофорів різних штамів *P.aeruginosa*, які вирощували при температурі 37° С (табл 2.4).

Таблиця 2.4

Вплив іонів феруму на синтез сидерофорів

Штам	Концентрація сидерофорів, мкМ/10 ⁹			
	Середовище без FeCl ₃ ×6H ₂ O	Середовище з 3 мк MFeCl ₃ ×6H ₂ O	Середовище з 30 мк MFeCl ₃ ×6H ₂ O	Середовище з 300 мк MFeCl ₃ ×6H ₂ O
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	13,2	13,0	7,5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,0	12,6	4,8	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	12,1	11,4	4,6	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	13,2	12,9	5,6	0

Аналізуючи дані табл 2.3 можна побачити, що додавання 3 мк MFeCl₃×6H₂O практично не мало впливу. Концентрація 30 мкМ призвела до 1,5-2,5-кратне пригнічення синтезу сидерофорів. Концентрація 300 мкМ – повністю зупиняли синтез.

В роботі [68] вчені також вивчали вплив іонів феруму на синтез сидерофорів. Використовували такі представники роду *Pseudomonas*: *P.chlororaphis* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) та *P. fluorescens* ONU 303. Розвиток культур відбувався у рідкому поживному середовищі Кінга.

Культури *P. fluorescens* та *P. chlororaphis* продукували залізохелатуючі сполуки, що належать до сидерофорів піовердинового типу.

Якщо при культивуванні мікроорганізмів без додавання феруму показники синтезу сидерофорів були досить великі (найбільш активна продукція сидерофорів спостерігалась у штаму *P. fluorescens*), то при додаванні 30 мкг/мл Fe^{3+} утворення цих сполук зменшувалось. Наявність 1000 мкг/мл Fe^{3+} у поживному середовищі спричинила практично повну зупинку вироблення даних сполук.

В роботі [26] вчені вивчали здатність штаму *P. aeruginosa* JRV-L синтезувати різноманітні поверхнево-активні комплекси. Було встановлено, що даний штам продукує від 50 до 700 мг/л піовердину на поживному середовищі, що містить цитрат натрію, гліцерин, дріжджовий екстракт. Було встановлено, що даний штам може продукувати від 50 до 100 г/л надмолекулярного комплексу рамноліпідів-альгінату-піовердину JRV-L-2.

Сидерофори інших бактерій. В статті [29] дослідники вивчають сидерофори, що продукує бактерія *Brevibacillus brevis* GZDF3 та їх антимікробну активність проти *Candida albicans*. В даній роботі проводили оптимізацію поживного середовища та досліджували вплив на синтез сидерофорів різноманітних факторів: рН, температура, джерело вуглецю та азоту, вплив іонів металів та їх концентрацій.

В результаті виявили, що сахароза та аспарагін дають найвищий вихід сидерофорів, що становить 31,59 %SU та 31,64 % SU відповідно. Поєднання оптимізованої концентрації сахарози, аспарагіну та температури 32 °C сприяли утворенню 54,99% SU. Оптимальним для синтезу сидерофорів є рН 7,0. В результаті проведення досліджень з додаванням металів було виявлено, що збільшення концентрації Fe, Cu, Mn, Zn негативно впливали на виробництво сидерофорів.

В статті [69] описано оптимізацію середовища для культури *Bacillus megaterium*. Максимальна концентрація сидерофору у вихідному середовищі становить 1300 мкмоль/л. Після підбору кількох джерел вуглецю

максимальна концентрація сидерофору ($1,182 \pm 115$ мкмоль/ г сухої біомаси) була досягнута при використанні гліцерину. Зміна концентрації джерела азоту (аргініну) не мала впливу. Також було доведено, що сидерофори продукуються в значно більшій кількості при перемішуванні 150 об/хв ($1\ 103 \pm 69$ мкмоль/л через 48 год), ніж при відсутності аерації (223 ± 3 мкмоль/л через 20 днів).

В статті [70] авторами наведено дані про культивування *Gordonia rubripertincta* CWB2. Середовище оптимізували, додаючи різні джерела вуглецю (сахароза, глюкоза, фруктоза, сукцинат). Сукцинат виявився найкращим. В результаті використання підживлення вихід сидерофору *дефероксаміну* становив до 178 мг/л.

В наступній таблиці 2.5, показано бактерії, що продукують антимікробні сидерофори.

Таблиця 2.5

Бактеріальні сидерофори

Сидерофор	Продуцент	Джерело вуглецю та азоту, г/л	Концентрація	Літ.
Ферритин	<i>Brevibacillus brevis</i> GZDF3	Сахароза – 15 L-аспарагін – 2	54,99% SU	[29]
Шизокінен	<i>Bacillus megaterium</i>	Глюкоза – 20 г/л; CH ₃ COONH ₄ – 3 Гідрохлорид аргініну – 1,5 Гліцерин – 20	$1,182 \pm 115$ мкмоль/ г сухої біомаси	[69]
Дефероксамін Е	<i>Gordonia rubripertincta</i> CWB2	Сукцинат – 4 NH ₄ Cl – 1	178 мг/л	[70]

В роботі [71] для культивування *E.coli* O103F, що синтезує сидерофорні мікроцини використовували різні види поживних середовищ, однак найкращим виявилось середовище ЕС, що містить пептон, лактозу, жовч як джерела вуглецю та азоту. Саме це середовище давало найбільший вихід антимікробної сполуки. Це підтверджує вплив джерела вуглецю на синтез сидерофорного мікроцину.

2.1.2 Особливості біосинтезу сидерофорів грибами та дріжджами.

В таблиці 2.6 представлено сидерофори, що продукуються грибами та дріжджами.

В роботі [72] дослідники перевіряють на продукцію сидерофорів 23 грибкових штами, використовуючи бульон Чапека-Докса. Після цього досліджують вплив іонів цинку різних концентрацій (50-250 мкг/мл) на синтез сидерофорів. В результаті виявилось, що найкращим продуцентом є *Penicillium commune* ЛНО. Цей штам продукував найбільшу кількість сидерофору феррихрому (72,65% SU) при додаванні 150 мкг/мл іонів цинку в порівнянні з вихідним середовищем без цинку (67,37% SU).

В літературному джерелі [73] описують культивування *Aspergillus fumigatus* AF293. Вихідне середовище мінімальний бульйон нітрату Барртата інтерпретують шляхом зміни концентрації глюкози (10-100 г/л) та додавання амінокислот: аргінін, аспарагін, гліцин, глютамін, метіонін, орнітин або серин в концентрації 0,1-1 г/л. Підбирають оптимальне значення рН (4-9). Вміст сидерофору визначали у мг/г сухого міцелію. В результаті досліджень було встановлено, що максимальний вихід сидерофору (19,6 мг/г) було досягнуто при початковій концентрації глюкози 102 г/л та глютаміну 5,2 г/л, рН 7,4.

Вчені [74] проводили порівняння синтезу копрогену у двох штамів *P. nalgiovense* S1 та *P. nalgiovense* NCAIM F-001333. При культивуванні штамів на однакових вихідних середовищах, синтез копрогену був майже однаковий (169 мг/л та 182 мг/л відповідно). Додавання заліза негативно вплинуло на синтез сидерофорів (0,8 мг/л та 0,9 мг/л відповідно). Після цього подальші дослідження проводили з *P. nalgiovense* NCAIM F-001333. Почали змінювати концентрацію глюкози, глютамату натрію та рН. В результаті найбільший вихід сидерофору становив 238 мг/л при концентрації глюкози 47 г/л, глютамату натрію 5 г/л, рН 8.

Як повідомляє джерело [33] дріжджі *Aureobasidium pullulans* HN6.2 здатні виробляти сидерофор, що проявляє антимікробну активність проти *B.*

subtilis, *Vibrio anguillarum* та *V. parahaemolyticus*. Відомо, що *V. parahaemolyticus* викликає шлунково-кишкові захворювання людини, а *V. anguillarum* є збудником хвороб риби. Однак як повідомляє джерело [34] були зареєстровані випадки смертності людей після ураження *V. anguillarum*.

Таблиця 2.6

Сидерофори грибного та дріжджового походження

Назва сидерофору	Продуцент	Джерело вуглецю та азоту, г/л	Концентрація	Література
Феррихром	<i>Penicillium commune</i> JHO	Сахароза – 30 Нітрат натрія – 3 г/л	72,65% SU	[72]
Феррихроцин	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	NaNO ₃ – 6 Глюкоза – 102 Глутамін – 5,2	19,6 мг/г сухого міцелію	[73]
Копроген	<i>Clonostachys compactiuscula</i> FKR-0021	<i>Середовище I:</i> Глюкоза – 20 Поліпептон – 5 Дріжджовий екстракт – 2 <i>Середовище II:</i> Рис змочений водою – 500 г.	Із 4,5 кг культури: Копроген А – 26,8 мг; Копроген В – 8,4 мг; Копроген С – 77,2 мг; N ¹⁴ -пальмітоил-копроген – 41,1 мг.	[75]
Копроген	<i>Penicillium nalgiovense</i> NCAIM F-001333	Глюкоза – 47 Глутамат натрію – 5 NaNO ₃ – 3 K ₂ HPO ₄ – 1 KCl – 1 MgSO ₄ – 1	238 мг/л	[74]
Копроген	<i>Penicillium nalgiovense</i> S1	Глутамат натрію – 4,9 Глюкоза – 49,1	169 мг/л	[75]
Сидерофор гідроксаматного типу	<i>Aureobasidium pullulans</i> HN6.2	Сахароза – 3 Аміачна селітра – 3 Лимонна кислота – 1 Орнітин – 10 мМ.	1100 мг/л	[33]

В результаті було проведено оптимізацію вихідного середовища, змінили концентрацію сахарози, K_2HPO_4 , додали орнітин, була підібрана оптимальна температура (28°C) та кількість обертів (170 об/хв). Концентрація сидерофору становила 1,1 мг/мл.

Отже, можна зробити висновок, що сидерофори синтезує велика кількість мікроорганізмів. Бактерії синтезують такі сидерофори як: дефероксамін (*S. pilosus* ATCC 19797– 1,2-5 г/л, *S. parvulus* CBS548.68 – 2 г/л), альбоміцин (*S. griseus* SCAK3 – 0,1 г/л), піовердин (*P. aeruginosa* RZS9 – 69,41% SU, *P. putida* CMMB2– 81% SU, *P. fluorescens* ONU 303–16,5±0,3 мкМ /10⁹кл, *P. aeruginosa* ONU 300–13,2±0,4 мкМ/10⁹кл, *P. aeruginosa* ATCC 15692–13,2 мкМ/10⁹кл, *P. aeruginosa* ATCC 9027 – 13,2 мкМ /10⁹кл), ферритин (*B. brevis* GZDF3 – 54,99% SU), шизокенін (*B. megaterium* –1,1 мкмоль/г). Гриби синтезують: феррихром (*P. commune* JHO– 72,65% SU), феррихроїн (*A. Fumigatus* AF293– 19,6 мг/г сухого міцелію), копроген (*C. compactiuscula* FKR-0021 – 26-77 мг/л, *P. nalgiovense* S1– 169 мг/л, *P. nalgiovense* NCAIM F-001333– 238 мг/л).

В результаті аналізу літератури було встановлено, що синтез сидерофорів залежить від типу мікроорганізму, складу поживного середовища. Для різних продуцентів характерні певні особливості, що впливають на синтез, зокрема це природа джерела вуглецю та азоту, наявність певних специфічних компонентів чи аерації, які було враховано під час підбору оптимального середовища. Наприклад, для культури *S. parvulus* CBS548.68. важливим є наявність 3-морфолінопропан-1-сульфонової кислоти, яка підвищує синтез дефероксаміну в декілька разів (з 96 мг/л до 2 г/л), а для культури *B. megaterium* синтез сидерофору підвищувався в 5 разів за наявності аерації (з 223 ммоль/л до 1 103 ммоль/л). Однак спільним для всіх було те, що наявність феруму в середовищі негативно впливає на синтез, або зупиняє його повністю. Наприклад, присутність 1000 мкг/мл Fe^{3+} у поживному середовищі зупиняє синтез піовердину в штамів *P. aeruginosa* ONU 301 та *P. aeruginosa* ONU 302.

2.2. Біотехнологія отримання сидерофорів з різних культур мікроорганізмів

Очищення та виділення сидерофорів є дуже складним процесом, оскільки кінцевий вихід сполук досить незначний. У [76] вчені спробували розробити новий метод очищення сидерофорів зі складних сумішей, використовуючи високу специфічність і спорідненість SBP до лігандів сидерофорів. Вони розробили нову стратегію афінної хроматографії для очищення сидерофорів шляхом іммобілізації His-міченого SBP на смолі Ni-NTA. В якості SBP використовували FhuD2 із патогенного *S. aureus* завдяки його здатності зв'язувати сидерофори. Цей метод використовувався для виділення *сальміцину* синтезованого *Streptomyces violaceus* DSM 8286. Загальний об'єм культуральної рідини становив 10 л, з якої в результаті отримали розчин чистого *сальміцину* загальним об'ємом 500 мкл і концентрацією 81 мкм (42 мкг). Використання афінної хроматографії значно спрощує очистку *сальміцину*. Даний метод можна інтерпретувати для виділення та очистки інших сидерофорів.

В статті [77] наведено новий метод очистки *дефероксамінів* з використанням трифазної екстракції наночастинок діоксиду титану, що дає можливість послідовно концентрувати та очищати сидерофори зі складних матриць. Діоксид титану є досить високоселективним і вилучає до 77% *дефероксаміну* зі складної суміші культуральної рідини.

В роботі [78] представлено ще один новий оптимізований та недорогий метод очищення. В даній статті проводять виділення та очищення сидерофору *ніовердину*, який синтезує продуцент *P. putida* GB1. Автори використовуючи підхід з подвійною флеш-хроматографією. Кількість очищеного *ніовердину* становила 100 мг.

Отже, можна зробити висновок про те, що вчені займаються розробкою та пошуком нових недорогих методів виділення сидерофорів, щоб досягнути вищого кінцевого виходу сполук, при менших втратах та полегшення процесу виділення сидерофорів.

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

3.1. Аналіз фармакологічних властивостей цільового лікарського засобу, галузей використання, потреби у лікарському засобі

Дефероксамін – це природний сидерофор, що виробляється ґрунтовими бактеріями *Streptomyces pilosus*, а також кількома видами як наземних, так і морських актиноміцетів[4].

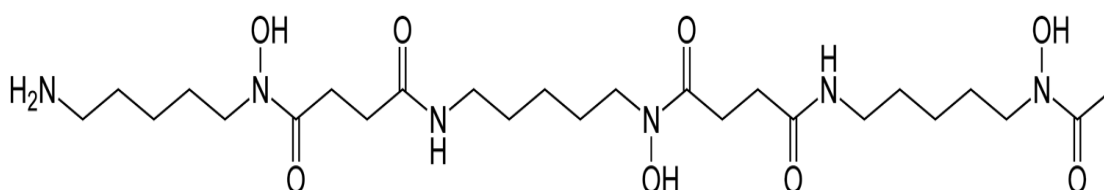


Рис.3.1 Структурна формула дефероксаміну

Не зважаючи на те, що ця сполука уже відома на фармацевтичному ринку і випускається за кордоном під такою назвою як Десферал, вчені і досі займаються активним вивченням дефероксаміну і відкривають його нові властивості та потенціал застосування.

До складу препарату Десферал як діюча речовина входить сіль дефероксаміну – дефероксаміну метансульфонат[79].

Нижче наведено фізико-хімічні властивості цієї сполуки[80].

<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>				
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробив</i>		<i>Підгерьська Т.О.</i>		
<i>Консульт.</i>				
<i>Керівник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>		
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>		
<i>Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу</i>				
		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
			35	161
<i>Кафедра БТМ</i>				

Фізико-хімічні властивості

1	Молекулярна формула дефероксаміну	$C_{25}H_{48}N_6O_8$
2.	Молекулярна формула дефероксаміну метансульфонату	$C_{25}H_{48}N_6O_8 \times CH_4O_3S$
3.	Молекулярна маса дефероксаміну	560,684
4.	Молекулярна маса дефероксаміну метансульфонату	656,8
5.	Зовнішній вигляд дефероксаміну метансульфонату	порошок білого кольору
6.	Температура плавлення дефероксаміну метансульфонату	142-146 °C
7.	Температура кипіння дефероксаміну метансульфонату	105 °C
8.	Густина	1,34 кг/дм ³ при 20 °C
9.	Відношення маси матеріалу до всього займаного ним обсягу дефероксаміну метансульфонату	~ 400 кг/м ³
10.	Розчинність у воді дефероксаміну метансульфонату	> 200 г/л (при T=20°C)
11.	Розчинність в інших речовинах дефероксаміну метансульфонату	Етанол: малорозчинний 0,1% Ацетон: практично нерозчинний 0,006% Хлороформ: практично нерозчинний 0,007% Метанол: розчинний 2,1% (20°C)

3.1.1 Аналіз фармакологічних властивостей Десфералу.

Фармакодинаміка.

Десферал утворює комплекси переважно з іонами заліза і з тривалентними іонами алюмінію. Хелатування відбувається у молярному співвідношенні 1:1, тобто 1 г Десфералу може теоретично зв'язати 85 мг тривалентного заліза або 41 мг Al^{3+} .

Десферал завдяки своїм хелатуючим властивостям здатний захоплювати вільне залізо в плазмі чи в клітинах, і тому утворювати феріоксаміновий комплекс (ФО). Слід зазначити, що Десферал не видаляє залізо з трансферину, гемоглобіну або інших речовин, в яких міститься гемін.

Десферал може також мобілізувати та хелатувати алюміній з утворенням алюмініноксамінового (АЮ) комплексу.

Оскільки обидва комплекси – ФО та АЮ – повністю виводяться з організму, Десферал сприяє екскреції заліза та алюмінію із сечею та калом, і тому зменшує надто великі запаси цих елементів в органах.

Фармакокінетика.

Абсорбція. Десферал швидко всмоктується після внутрішньом'язової болісної ін'єкції або повільного підшкірного введення і погано всмоктується з шлунково-кишкового тракту при наявності інтактною слизової оболонки. Абсолютна біологічна доступність перорально введеного 1 г Десфералу становить менше 2 %.

Розподіл. У здорових людей максимальна концентрація в плазмі 15,5 мкмоль/л (8,7 мкг/мл) реєструвалась через 30 хвилин після внутрішньом'язової ін'єкції 10 мг/кг Десфералу. Через годину після ін'єкції максимальна концентрація ФО становила 3,7 мкмоль/л (2,3 мкг/мл). Після внутрішньо венної інфузії 2 г (близько 29 мг/кг) Десфералу здоровим людям через 2 години його концентрація досягає постійного рівня 30,5 мкмоль/л; розподіл Десфералу відбувався дуже швидко із середнім на півперіодом розподілу 0,4 години.

Біотрансформація. Із сечі пацієнтів з перевантаженням залізом виділено та ідентифіковано чотири метаболіти Десфералу. Показано, що з Десфералом відбуваються такі реакції біотрансформації:

- трансамінування та окислення з утворенням кислого метаболіту;
- бета-окислення також з утворенням кислого метаболіту;
- декарбоксілювання та N-гідроксилювання з утворенням нейтральних метаболітів.

Виведення. У здорових людей як Десферал, так і ФО після внутрішньом'язової ін'єкції має двофазне виведення; на півперіод явного розподілу для Десфералу становить 1 годину, а для ФО – 2,4 години. На півперіод явного кінцевого виведення для обох речовин становить 6 годин.

Протягом 6-годинного введення у сечі з'являється 22 % від дози у вигляді Десфералу і 1 % – у вигляді ФО[79].

3.1.2 Галузі використання.

Здатність дефероксаміну зв'язувати Fe(III) та багато інших катіонів металів, велика доступність даних про його біологічну активність, довготривалий вплив на організм людини (через тривале використання в якості хелатного препарату), його прийнятна розчинність у воді, не надмірна молекулярна маса та відносно низька вартість відкрили шлях для використання дефероксаміну у різних галузях, таких як:

- лікування захворювань, пов'язаних з дизгомеостазом іонів металів;
- діагностична візуалізація на основі радіоактивних металів;
- пригнічення процесів, що залежать від металів, наприклад, так званого «харчового імунітету», за допомогою якого організм хазяїна захоплює мікроелементи, необхідні для розвитку мікроорганізмів-вторгнення, з метою запобігання їх росту;
- перенесення ліків до клітин-мішеней шляхом використання природних шляхів доступу. Розробка цих препаратів стала можливою завдяки наявності кінцевої аміногрупи, яка не бере участь у координації металів і дозволяє дефероксаміну зв'язуватися з невеликими молекулами, антибіотиками, антитілами або іншими сполуками, що представляють біологічний інтерес, використовуючи просту хімію для отримання похідних з новими властивостями.

Дефероксамін і, в цілому, хелатні препарати можуть бути використані як основна, альтернативна або допоміжна терапія для боротьби з низкою захворювань людини. Хелатна терапія в першу чергу знаходить застосування в детоксикації металів, але також може демонструвати перспективні антиоксидантні, протиракові та антимікробні ефекти[4].

Особливий інтерес до дефероксаміну виникає через його важливу фармакологічну роль для пацієнтів із захворюваннями крові, які залежать від

переливань (таких як велика β -таласемія та гемохроматозом). Ці пацієнти повинні регулярно приймати дефероксамін, окремо або в комбінації з іншими препаратами, для видалення надлишку заліза шляхом гемолізу клітин крові. Організм людини не має механізму для виведення надлишку заліза, і метал накопичується в органах, особливо в серці та печінці, і має справді руйнівну токсичну дію. Тривалість життя цих пацієнтів була значно подовжена після впровадження хелатної терапії[4].

Крім того, неодноразово повідомляється, що дефероксамін є досить ефективним проти деяких патогенних мікроорганізмів. Зокрема пригнічує ріст коагулазонегативних стафілококів, які є основними патогенами в пацієнтів після переливання крові[2].

Хоча найважливішою властивістю дефероксаміну є його здатність знижувати концентрацію надлишку заліза в організмі, існує додатковий ефект, пов'язаний з інгібуванням каталізованого залізом, виробництва радикалів кисню. Тому даний сидерофор може знайти застосування при кількох захворюваннях, де окислювальний стрес сприяє патофізіології; приклади включають захворювання нирок і печінки, нейродегенеративні захворювання і навіть запобігання апоптозу стовбурових клітин, спричиненого окисним стресом. Крім того, оскільки феномен окисного стресу значною мірою сприяє токсичності, опосередкованій свинцем (Pb), нещодавнє дослідження показує багатообіцяючі попередні результати щодо антиоксидантної активності дефероксаміну для захисту від індукованої Pb кардіотоксичності у щурів.

Дефероксамін також проявляє протипухлинну активність, вилучаючи іони заліза з ракових клітин. Насправді залізо сприяє зростанню та проліферації ракових клітин, і було показано, що клітинне накопичення цього іона металу сприяє виникненню найагресивніших форм раку. Як наслідок, хелатори заліза були вивчені як хіміопротективні та хіміотерапевтичні засоби раку. Дефероксамін, завдяки його клінічній безпечності та задокументованій ефективності в хелатній терапії, був

першою дослідженою молекулою в цьому контексті, і його застосування в якості підтримуючої протипухлинної терапії було випробувано. Виявилось, що він перешкоджає синтезу ДНК і пригнічує прогресування раку шкіри, аденокарциноми молочної залози, гепатоцелюлярної карциноми та раку яєчників. Однак багатообіцяюча протиракова активність дефероксаміну все ще обмежена, і необхідні подальші дослідження, щоб з'ясувати його потенційну користь як допоміжної терапії при лікуванні злоякісних пухлин.

Нещодавно кілька вчених у своїх дослідженнях висвітлювали критичну роль заліза в реплікації РНК-вірусів, таких як HCV, ВІЛ та вірус Західного Нілу. Відомо також, що накопичення заліза в легенях сприяє прогресуванню респіраторних захворювань, таких як фіброз легенів і гострий респіраторний дистрес-синдром. Таким чином, дефероксамін може проявляти противірусні властивості за рахунок зниження біодоступності іонів заліза. Крім того, виявляється, що дефероксамін має імуномодулюючу дію *in vitro* та *in vivo*. Деякі звіти також показали високі рівні феритину в сироватці крові у пацієнтів з COVID-19 і підвищену кількість у померлих пацієнтів порівняно з тими, хто пережив COVID-19. Високі концентрації сироваткового феритину часто асоціюються з дисбалансом клітинного заліза, окислювальним стресом і запальною відповіддю, що свідчить про те, що хелатна терапія заліза може принести користь пацієнтам з COVID-19[4].

Дефероксамін також меншує запальний процес під час перебігу атеросклерозу, пригнічуючи ріст мікроорганізмів, що його викликають[35].

Пригнічує збудників туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis*[3].

Здатність DFOB координувати Fe(III) та інші іони металів робить його придатним для виявлення та зондування металів із застосуванням як у біологічній, так і в екологічній сферах[4].

Дефероксамін також можна використовувати для виявлення патогенів і методів стерилізації за допомогою технології платформи для захоплення бактерій. Механізм виявлення заснований на біологічній функції сидерофора – перенесення заліза, яку можна використовувати для розпізнавання та

зв'язування специфічних бактеріальних рецепторів заліза (наприклад, FerA та FhuA). Ця зовсім недавня та інноваційна стратегія виявлення бактерій відкриває шлях до нових аналітичних застосувань для дефероксаміна та інших сидерофорів, які можна використовувати як високоселективні ліганди для швидкого виявлення та ідентифікації патогенів[4].

3.1.3 Визначення кількості хворих серед населення.

Десферал – це запатентована торгова назва лікарського засобу до складу якого входить дефероксамін (десферіоксамін). Препарат випускається фармацевтичною компанією Novartis Pharma Stein AG (Швейцарія).

Склад: 1 флакон містить 500 мг десферіоксаміну метансульфонату.

Форма випуску: Ліофілізат для розчину для ін'єкцій по 500 мг у флаконах № 10.

Десферал використовується для монотерапії хелатним комплексом заліза при хронічному перевантаженні залізом, наприклад:

- трансфузійний гемосидероз, який спостерігається при великій таласемії, сидеробластичній анемії, аутоімунній гемолітичній анемії та інших хронічних анеміях;
- ідіопатичний (первинний) гемохроматоз у хворих, у яких супутні захворювання не дозволяють проводити флеботомію;
- перевантаження залізом, пов'язане з пізньою порфірією (порушення пігментації) шкіри у хворих, які не переносять флеботомії. Лікування гострого отруєння залізом[79].

Способи введення: підшкірне введення, внутрішньом'язове введення, внутрішньовенне вливання під час переливання крові, тривале внутрішньовенне вливання[81];

Дози:

Середня добова доза переважно становить – 20-60 мг/кг. Не бажано перевищувати дозу 50 мг/кг на добу, окрім окремих важких випадків.

Препарат слід вводити 5-7 разів на тиждень.

Оскільки більшості пацієнтів потрібно вводити цей препарат не кожного дня протягом тижня, то дійсна доза в одному вливанні зазвичай відрізняється від середньої добової дози. Наприклад, якщо середня добова доза 40 мг/кг (вводиться 7 разів на тиждень по 40 мг/кг), а вливання проводять 5 разів на тиждень, то у кожній інфузії повинно бути 56 мг/кг.

Тривалість лікування, дозування та спосіб введення визначається індивідуально і залежить від низки медичних факторів, які встановлює, перевіряє і контролює лікар [79].

Тривалість терапії у дорослих приблизно становить від 18,5 до 50,0 років. Середня загальна тривалість хелатної терапії становила 35,2 року. Найдовше приймався препарат дефероксамін у максимальній дозі $36,1 \pm 7,5$ мг/кг/добу[82].

Згідно інформацією поданою в Центрі медичної статистики МОЗ в Україні поширеність анемій серед породиль за 2020 р. становить 66 534 осіб. Тоді як загальна кількість породиль в цьому році становить 272 755 осіб [83].

Як відомо в Україні аліментарні (залізодефіцитні) анемії становлять найбільшу частку анемій (80 %) [84].

Враховуючи рекомендації до використання наведені в інструкції до препарату припускаємо, що Десферал може застосовуватись для лікування 10 % анемій. Решту 10 % виділяємо для інших видів анемій.

Таблиця 3.2

Кількість хворих жінок-породиль на анемію у 2020 році та дози дефероксаміну

	Аліментарні анемії (залізодефіцитна)	Таласемія, сидеробластична анемія, аутоімунний гемолітичний анемія, гемохроматоз	Інші види анемій
Відсоток, який становить хвороба	80%	10%	10 %
Кількість жінок-породиль хворих на анемії	53 228	6 653	6 653
Можливість лікування дефероксаміном	–	+	–

Середньодобова доза препарату дефероксамін, мг/кг	–	20-60	–
Частота використання на тиждень, раз	–	5-7	–

3.2. Розрахунок потреби для випуску Десфералу

3.2.1 Розрахунок потреби в Десфералі

Для розрахунків потреби Десфералу приймаємо:

- D – середня добова доза Десфералу 40 мг/кг (40 мг/кг 7 разів на тиждень);
- W – середня маса тіла – 75 кг згідно Державною службою статистики за 2020 рік[85].

Відповідно середня добова норма середньостатистичної особи (кількість препарату на 1 добу ($K_{\text{доба}}$)) становить:

$$K_{\text{доба}} = W \times D, \text{ г.}$$

Кількість препарату, що необхідна хворому на рік ($K_{\text{рік}}$) становить:

$$K_{\text{рік}} = K_{\text{доба}} \times 365/1000, \text{ кг.}$$

Кількість препарату, що необхідно для загальної кількості хворих на рік ($3K_{\text{рік}}$):

$$3K_{\text{рік}} = K_{\text{рік}} \times \text{Заг. кількість хворих} = 75 \times 40 \times 365/1000 \times 6\ 653 = 7\ 285 \text{ кг}$$

Отож, для забезпечення жінок породиль хворих на інші види анемії в Україні, на рік необхідно отримувати 7 300 кг Десфералу.

Для визначення потужності виробництва Десфералу приймаємо 10% від загальної потреби у Десфералі.

$$G_{\text{гп}} = 7300 \times 0,1 = 730 \text{ кг Десфералу на рік.}$$

3.2.2 Розрахунок кількості партій продукту (виробничих циклів).

При отриманні Десфералу (метансульфонат дефероксаміну В) згідно технології, описаної у [86] Десферал отримують з очищеного гідрохлориду дефероксаміну В шляхом його взаємодії з метансульфонатом на іонообмінній колонці.

Молекулярна маса дефероксаміну В – 561, а дефероксаміну метансульфонату (Десфералу) – 657, отже в 1 кг Десфералу міститься $(561/657= 0,85$ або 85% дефероксаміну В із ступінню чистоти 99,6 %.

Втрати дефероксаміну В при отриманні сухого Десфералу згідно прикладів [86] складають 59%. Враховуючи втрати при подрібненні, просіюванні та фасуванні 2%. Загальні втрати при отриманні упакованої субстанції Десфералу складуть $E_{вт} = 61$ %. Втрати КР від можливих нестерильних операцій - $K_1= 1,1$.

Відповідно до вищенаведених розрахунків приймаємо необхідну потужність виробництва по Десфералу $G_{нд} = 730$ кг. За умовами замовника цю кількість необхідно виробити за $T_{рд} = 300$ днів. Максимальний синтез дефероксаміну ($P_{кр} = 5$ г/л) досягається за $T_{ф} = 144$ години культивування за концентрації біомаси в культуральній рідині $X_{кр} = 0,35$ г/л [61].

Відповідно до нормативно-технічної документації вміст сухих речовин в готовому продукті $CP_{гп}$ має складати не менше 95% із ступенем очищення – 99,6 %.

Для подальших розрахунків приймаємо наступні початкові дані:

Час циклу роботи ферментера:

$$T_{цф} = T_{ф} + T_{по} = 144 + 8 = 152 \text{ год,}$$

де $T_{по}$ – час підготовчих операцій: миття та огляд апарату – 1,0 год; перевірка на герметичність – 1,0 год; підігрів апарату – 1,0 год; стерилізація апарату – 1,0 год; охолодження апарату – 1,0 год; завантаження середовища – 1,0 год; стерилізація середовища – 1,0 год; охолодження середовища та засів – 1,0 год.

Коефіцієнт запасу (втрати культуральної рідини або посівного матеріалу від нестерильних операцій 1,1-1,5) $K_1 = 1,1$.

Коефіцієнт заповнення ферментера, частка, (0,5– 0,65); приймаємо $K_{ф} = 0,6$;

Кількість ферментацій (циклів) на рік:

$$N_{цк} = 24 \times T_{рд} / T_{цф} = 24 \times 300 / 152 = 47,3$$

З врахуванням можливих втрат від нестерильних операцій (кількість циклів (ферментацій) на рік складе (при нестерильних операціях не отримують продукт)

$$N_{\text{цл}} = N_{\text{ц}} \times K_1 = 47,3 \cdot 1,1 = 52,03$$

Приймаємо $N_{\text{цк}} = 52$

Кількість продукту за цикл, кг /цикл:

$$G_{\text{цк}} = G_{\text{нт}} / N_{\text{цк}} = 730 / 52 = 14$$

Кількість абсолютно сухого Десфералу за цикл при залишковій волозі $W_B = 1 - CP_{\text{гп}} = 5 \%$, кг

$$G_{\text{цад}} = G_{\text{цк}} \times (1 - W_B) = 14 \times 0,95 = 13,3$$

Відповідно до перерахунку на абсолютно сухий дефероксамін В його кількість за цикл складе:

$$G_{\text{цв}} = G_{\text{цад}} \times 0,85 \times 0,996 = 13,3 \times 0,85 \times 0,996 = 11,3 \text{ кг/цикл,}$$

де 0,85 – частка дефероксаміну В у Десфералі;

0,996 – ступінь чистоти дефероксаміну В.

Об'єм КР, що зливається за одну ферментацію (цикл) з урахуванням втрат при виділенні $E_{\text{св}} = 0,61$, м³

$$V_{\text{кр}} = K_1 \cdot G_{\text{цк}} \cdot CP_{\text{гп}} / P_{\text{кр}} \cdot (1 - E_{\text{св}}) = 11,3 / (5 \cdot (1 - 0,61)) = 5,8 \text{ м}^3$$

Об'єм КР за рік, м³

$$V_{\text{кр, рік}} = V_{\text{кр}} \times N_{\text{цк}} = 5,8 \times 52 = 301,6$$

Визначаємо робочий об'єм ферментера $V_{\text{ф}}$, з врахуванням втрат КР при біосинтезі $E_{\text{ф}} = 0,1$

$$V_{\text{ф}} = V_{\text{кр}} / (1 - E_{\text{ф}}) = 5,8 / (1 - 0,1) = 6,4 \text{ м}^3$$

Приблизний геометричний об'єм ферментера при заданому коефіцієнті заповнення $K_3 = 0,6$, частка, м³

$$V_{\text{пф}} = V_{\text{ф}} / K_3 = 6,4 / 0,6 = 10,7$$

Вибираємо найближчий за об'ємом ферментер, м³: $V_{\text{гф}} = 10$

Уточнюємо коефіцієнт заповнення $K_{\text{уз}}$, частка

$$K_{\text{уз}} = V_{\text{ф}} / V_{\text{гф}} = 6,4 / 10 = 0,64$$

Перевірене значення $K_{\text{уф}}$ відповідає вибраному діапазону- 0,5 - 0,65.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ФОРМИ ВИПУСКУ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

4.1. Обґрунтування форми випуску лікарського засобу

У повсякденній медичній практиці використовуються найрізноманітніші лікарські форми з урахуванням стану хворого, його віку та інших чинників. Лікарська форма розглядається як зручне вмістилище, що забезпечує збереження та доставку субстанції до місця всмоктування, і є досить зручною для хворого. Експериментально-клінічні дослідження довели, що вид лікарської форми може суттєво впливати на ступінь абсорбції лікарської речовини та її концентрацію в біологічних рідинах.

Розглядаючи лікарські форми з біофармацевтичних позицій, необхідно переглянути їх види та класифікації. Найбільш доцільно при класифікації лікарських форм враховувати їх вплив на ефективність і безпеку при застосуванні ліків.

В основу наявних класифікацій лікарських форм наведених у навчальній літературі, покладено різні шляхи введення, способи призначення, агрегатний стан, властивості дисперсійного середовища та ін. За класифікацією з урахуванням шляхів введення ліків лікарські форми поділяються на такі види:

- ентеральні, що вводяться через ШКТ, а саме: пероральні (таблетки, капсули, драже, гранули, порошки, мікрокапсули, розчини, суспензії, емульсії, настої, відвари, настойки, сиропи, желе та ін.) та сублінгвальні (таблетки, капсули, драже, порошки, таблетки для жування, розчини тощо);
- ректальні (супозиторії, капсули, мазі, піно- та плівкотвірні аерозолі, розчини, суспензії, емульсії у вигляді мікроклізм і зрошення);

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Підгерська Т.О.</i>			<i>Розділ 4. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>							46	161
<i>Керівник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>				<i>Кафедра БТМ 48</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

- парентеральні, що вводяться не через ШКТ, у вигляді ін'єкцій (розчини і порошки для отримання розчинів для ін'єкцій, таблетки і капсули для імплантацій);
- для нанесення на слизові оболонки: вагінальні (кульки, песарії, мазі, таблетки, розчини, емульсії тощо) та очні (краплі, мазі, плівки, розчини для зрошування та ін.);
- уретральні (палички);
- для нанесення на шкіру (мазі, креми, гелі, пасти, порошки, пінні та плівкотворні аерозолі тощо)[87].

Вище перераховані лікарські форми мають ряд своїх переваг та недоліків, які впливають на їх вибір виробником. Однак, що стосується препарату Десферал, то більш детально розглянемо саме парентеральні форми випуску, оскільки даний препарат погано всмоктується в шлунково-кишковому тракті. Абсолютна біологічна доступність перорально введеного 1 г Десфералу становить менше 2 %. Також слід врахувати те препарат використовується для лікування хвороб крові, тому такі лікарські форми, які дозволяють наносити препарат на слизові оболонки та шкіру, також не підходять[79].

Використання ін'єкційних лікарських форм має ряд переваг:

- ✓ Повнота всмоктування і швидкість дії ліків, що вводяться;
- ✓ Ліки вводяться, минаючи шлунково-кишковий тракт і печінку, де під впливом ферментів вони можуть змінюватися або руйнуватися;
- ✓ Повністю виключаються незручності, пов'язані з неприємним запахом і смаком ліків;
- ✓ З'являється можливість точно дозувати ліки;
- ✓ Можливість локалізації дії лікарських речовин.

Серед відомих лікарських форм, що використовуються для введення препарату пацієнтам парентерально, найбільш поширеними є порошки та розчини для ін'єкцій.

Порошки для ін'єкцій мають певні переваги перед ін'єкційними розчинами. Зокрема, порошки мають значно довший термін придатності, а також порошки виготовляти легше та дешевше.

Порошок — тверда лікарська форма для внутрішнього, зовнішнього і ін'єкційного застосування, що володіє властивістю сипучості. Порошок може бути використаний для ін'єкційного застосування тільки після попереднього розчинення у відповідному розчиннику і з дотриманням стерильності. У порошках не випускаються гігроскопічні речовини, речовини, які при взаємному змішуванні утворюють вологі або легкокоруйнівні маси[88].

Переведення порошку в розчин проводиться досить легко. Для парентерального введення Десфералу використовують 10% розчин препарату у воді для ін'єкцій. Для цього потрібно 5 мл води для ін'єкцій ввести шприцем у флакон, який містить 500 мг порошку Десфералу та добре струсити. Використовувати можна тільки прозорий та безбарвний чи жовтуватий розчин[79].

Десферал у вигляді розчину слід використовувати протягом 3 год після приготування. Якщо розчин був приготований у стерильних умовах, то максимальний час його зберігання становить 24 год при кімнатній температурі[89].

Десферал можна вводити кількома способами: внутрішньом'язовий; внутрішньовенний; підшкірний.

Спосіб введення визначається лікарем індивідуально. Для амбулаторних хворих ефективним і найзручнішим пристроєм для повільного підшкірного вливання вважається портативний легкий інфузійний насос, який застосовують протягом 8 - 12 годин, а іноді й протягом доби. За допомогою насоса Десферал слід вводити 5 - 7 разів на тиждень. Наявність такого насоса відкидає можливість використання імплантаційних засобів, оскільки ін'єкція є більш ефективною[79].

Враховуючи вище сказане, в якості лікарської форми препарату Десферал обираємо порошок для ін'єкцій.

4.2 Обґрунтування вибору первинної та вторинної упаковки.

Розвиток виробництва парентеральних лікарських засобів зазнав нового впливу у фармацевтичній промисловості світу. Так, гарантія якості та безпеки продукції є одним із основних завдань при тривалому зберіганні. При вирішенні даної задачі важливим є вибір пакування, що застосовується при цьому. Від якості пакування залежить доставка продукції без втрат від виробника до споживача, спрощення складських і транспортних операцій, забезпечення необхідних строків зберігання. Вид пакування та матеріали, що застосовуються при цьому, багато в чому визначають не тільки якість продукції, але й умови зберігання, способи складування та ін[90].

В нашій країні набули подальшого розвитку різні види упаковки. Для збереження якості готових лікарських засобів застосовується первинна та вторинна упаковка. Головний вплив на готові лікарські засоби має первинна упаковка, так як вона безпосередньо контактує з лікарським засобом. В залежності від виду лікарської форми використовують різні види пакувальної тари та дизайн її маркування. Основними функціями маркування первинної упаковки є інформаційна, ідентифікаційна, мотиваційна та емоційна. Маркування готових лікарських засобів повинно відповідати вимогам міжнародних та вітчизняних стандартів, бути чітким, наочним, однозначним і достовірним. Маркування дозволяє споживачеві мати повну інформацію про виробника та сам лікарський засіб[91].

У виробництві готових лікарських засобів бувають такі види упаковки:

Первинна упаковка — індивідуальна або споживча упаковка, в якій є безпосередній контакт лікарського засобу з матеріалом упаковки. Вона призначена для створення необхідних умов, що забезпечують тривалу цілісність поміщеної в неї лікарської форми.

Вторинна упаковка — упаковка, яка призначена для захисту первинних упаковок (їхньої цілісності) і для більш повних інформативних відомостей. Наприклад, останнім часом на вторинних упаковках друкується

текст про застосування ліків. Вторинна упаковка забезпечує найбільш простий та зручний облік і контроль продукції. Як вторинну упаковку використовують картонні пачки і коробки, куди поміщають в первинній упаковці таблетки, драже, капсули, флакони й ампули з рідкими і порошкоподібними лікарськими засобами, металеві й скляні трубки з таблетками, туби з мазями, пакетики з порошкоподібними лікарськими засобами.

У ряді випадків вторинна упаковка створює додаткову герметизацію і захист первинних упаковок від впливу зовнішніх чинників. Вторинні упаковки також належать до споживчих.

Групова упаковка (або блочна) — це група первинних або вторинних упаковок, формується в машинах або автоматах при пакуванні продукції в термоусадкову плівку, папір, картонні коробки[92].

Ін'єкційні препарати найчастіше пакують в скляні ампули, флакони або спеціальні полімерні (поліетиленові) контейнери[91].

Скляна тара буває різної ємності та призначення:

- флакони з дроту для інсуліну і загального призначення місткістю 5, 10, 15, 20, 30 мл;
- пляшки скляні для крові, трансфузійних і інфузійних препаратів з гвинтовою шийкою місткістю 50, 100, 250, 450, 500, 1000, 2000 мл і гладкою — 50, 100, 250, 500 мл;
- ампули скляні шести типів місткістю 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50 мл;
- тьюбик-ампули місткістю 0,5, 1, 2 мл[92].

Для рідких ЛЗ використовують скляні ампули. В останні роки знаходять застосування ампули, виготовлені з полімерних матеріалів (використання технології BFS)[93].

Однак така технологія мало поширена в Україні, оскільки є досить дорогою. Також тут виникають проблеми, пов'язані із сумісністю полімерного

матеріалу з розчином лікарської речовини і термінами придатності лікарського засобу[93].

Для пакування порошків для ін'єкцій найчастіше використовують скляні флакони. В якості закупорювальних засобів використовують гумові корки з каучуку, а також для їх фіксації – алюмінієві ковпачки. Такий вид первинної упаковки є досить поширеним через низьку вартість та можливість багаторазового використання тари[92].

Скляні ємкості для ін'єкційних розчинів виготовляють з медичного скла, яке являє собою розчин (сплав) силікатів оксидів металів і деяких солей. Змінюючи склад компонентів та їх співвідношення, можна отримати скло із заданими властивостями. Виробництво ампул та флаконів здійснюється на склозаводах зі скляних трубок (склодроту).

До скла висуваються наступні вимоги:

- прозорість - для візуального й оптичного контролю на відсутність механічних включень;
- безбарвність - дозволяє виявляти, окрім механічних включень, зміну кольору розчину
- легкоплавкість - необхідна для якісного запаювання ампул при порівняно невисокій температурі, щоб уникнути нагрівання розчину;
- термічна стійкість - здатність скляних виробів не руйнуватись при різких коливаннях температури;
- хімічна стійкість, що гарантує збереження лікарських речовин та інших компонентів препарату, показує здатність скла до вилужування;
- механічна міцність - для витримування навантажень при обробці ампул у процесі виробництва, транспортування і зберігання[94].

Оскільки лікарська форма Десферал – це порошок для ін'єкцій, то доцільніше обрати саме скляні флакони, а не ампули, такий вид первинної упаковки дає можливість легко приготувати ін'єкційний розчин з порошку, завдяки внесенню розчинника за допомогою шприца через кришку, що значно зменшує ризик контамінації препарату.

Десферал випускається по 500 мг, оскільки саме таку кількість препарату потрібно для проведення десфералової проби. Вона ґрунтується на тому, що відповідно до інструкції по застосуванню пацієнту вводять внутрішньом'язово саме 500 мг Десфералу і після цього в сечі визначають рівень заліза. Згідно такого аналізу роблять висновок про перевантаження організму залізом, оскільки в здорових людей Десферал не підвищує виведення заліза з організму вище певної межі[79].

Враховуючи невеликий об'єм препарату, в якості первинної упаковки будемо використовувати скляні флакони з дроту загального призначення об'ємом 10 мл. Флакони меншого об'єму 5 мл не підходять, оскільки після додавання 5 мл води для ін'єкцій для приготування розчину, загальний обсяг препарату буде становити 5,3 мл. А наступний номінальний об'єм флаконів, що випускаються 15 мл зavelикий[89,92].

Для вторинного пакування флаконів використовують картонні коробки з кришкою, пачки. Для фіксації флаконів в картонній тарі передбачені спеціальні вкладиші[91].

В якості вторинної упаковки обираємо картонні упаковки (пачки), що містять спеціальні вкладиші для фіксування флаконів. Кількість флаконів в одній упаковці становить 10 штук[89].

Відповідно до ст. 12 Закону України «Про лікарські засоби» маркування, що наноситься на етикетку первинної та вторинної упаковки лікарського засобу, повинно містити такі відомості: назву лікарського засобу; назву та адресу його виробника; реєстраційний номер; номер серії; способи застосування; дозу діючої речовини в кожній одиниці та їх кількість в упаковці; термін придатності; умови зберігання; запобіжні заходи[95].

Крім того, частина друга ст. 12 Закону України «Про лікарські засоби» встановлює, що на зовнішній упаковці лікарських засобів також шрифтом Брайля зазначаються назва лікарського засобу, доза діючої речовини, лікарська форма[95].

Відповідно частини п'ятої ст. 12 Закону України «Про лікарські засоби» до кожного лікарського засобу, що реалізується, додається інструкція про застосування лікарського засобу, яка повинна містити назву лікарського засобу, загальну характеристику (хімічну назву, основні фізико-хімічні властивості, склад), відомості про фармакологічні властивості, показання для застосування, протипоказання, взаємодію з іншими лікарськими засобами, способи застосування та дози, побічну дію, запобіжні заходи, форми випуску, умови та строки зберігання, умови відпуску[95].

Згідно з АНД, Десферал – це препарат, форма випуску якого – порошок ліофілізований для приготування розчину для ін'єкцій по 500 мг у флаконах № 10. Склад препарату наступний: 1 флакон містить 500 мг десферіоксаміну метансульфонату.

Отже, враховуючи всі переваги та недоліки стосовно різних типів первинних упаковок, а також інформацію взяту з АНД на препарат, то первинна упаковка для випуску Десфералу – скляні флакони на 10 мл загального призначення. Кількість препарату в одному флаконі 500 мг. Кількість флаконів у вторинній упаковці становить 10 штук. В якості вторинної упаковки виступає картонна пачка з вкладишами для флаконів. На первинній та вторинній упаковці міститься вся необхідна інформація про лікарський засіб. Також при пакуванні до флаконів в середину вторинної упаковки додається інструкція з використання препарату.

РОЗДІЛ 5. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

Розглянемо загальну характеристику технологічних особливостей одержання сидерофорів, які синтезуються різними продуцентами і які представлено в таблиці 5.1.

Проаналізувавши наведені дані таблиці 5.1, можна зробити висновок, що продуцент №2 *Streptomyces pilosus* ATCC 19797 синтезує найбільшу кількість сидерофору дефероксаміну (5 г/л), однак тривалість культивування є найдовшою – 144 год (див. додаток 2), тоді як № 1 *Streptomyces parvulus* CBS548.68 синтезує 2 г/л за 120 год (див. додаток 1). Найнижча концентрація дефероксаміну спостерігається у продуцента №3 *S. pilosus* ATCC 19797, який синтезує 1,2 г/л сидерофора за 128 год (див. додаток 3) [60-62].

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Підгерьська Т.О.			Розділ 5. Обґрунтування вибору біологічного агента	Лім.	Арк.	Аркушів
Консульт.							54	161
Керівник		Карлаш Ю.В.				Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд		Стабніков В.П.						

Таблиця 5.1

Особливості отримання сидерофорів

№	Біологічний агент	Назва сидерофору	Склад поживного середовища, г/л	Умови культивування	Концентрація сидерофорів, г/л	Література
1.	<i>Streptomyces parvulus</i> CBS548.68.	Дефероксамін	Глюкоза– 25. Глутамат натрію – 13; L-лізин моногідрохлорид – 14; K ₂ HPO ₄ – 2 ; K ₂ SO ₄ – 2 ; NaCl – 1 ; Безводний CaCl ₂ – 0,1 ; Безводний MgSO ₄ – 0,2 ; ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,1 ; MOPS – 21.	28 °С; рН 7,5; 120 год;	2	[60]
2.	<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Дефероксамін	Соеве борошно – 20 ; Маніт– 20; KH ₂ PO ₄ – 32 ; Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O – 4; CaCl ₂ ×2H ₂ O – 2 ; ZnSO ₄ ×7H ₂ O – 0,004; Треонін – 0,1 .	29 °С; 144 год; рН 7,5; 150 об/хв	5	[61]
3.	<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Дефероксамін	Соеве борошно – 20 ; Манітол – 20 ; CaCl ₂ – 0,22; ZnSO ₄ – 0,32 ; MgSO ₄ – 0,24; MnCl ₂ – 0,25; Na ₂ HPO ₄ – 0,28.	29 °С; 128 год; рН 7,5; 150 об/хв	1,2	[62]

Для вибору найефективнішого продуцента, треба порівняти вартість 1 л поживного середовища. Дані наведені в *табл. 5.2*

Таблиця 5.2

Вартість компонентів поживного середовища для культивування *S. parvulus* CBS548.68, *S. pilosus* ATCC 19797

№	Штам	Компоненти	Конц., компоненту поживного середовища, г/л	Ціна компонент у, грн/кг	Вартість компонентів середовища для 1 л, грн/л	Джерело інформації (1,2,3...)*
1.	<i>Streptomyces parvulus</i> CBS548.68	Глюкоза	25	39	0,98	1
		Глутамат натрію	13	60	0,78	2
		L-лізин моно- гідрохлорид	14	120	1,68	3
		K ₂ HPO ₄	2	150	0,24	4
		K ₂ SO ₄	2	29,4	0,058	5
		NaCl	1	4,5	0,0045	6
		CaCl ₂	0,1	50	0,005	7
		MgSO ₄	0,2	93	0,018	8
		ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,1	80	0,08	9
		MOPS	21	10 403	218,5	10
Вартість 1 л середовища – 222,3 грн						
2.	<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Соєве борошно	20	70	1,4	11
		Маніт	20	160	3,2	12
		KH ₂ PO ₄	32	94,6	2,3	13
		Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	4	56,2	0,22	14
		CaCl ₂ ×2H ₂ O	2	18	0,036	15
		ZnSO ₄ ×7H ₂ O	0,004	80	0,0003	9
		Треонін	0,1	75	0,0075	16
Вартість 1 л середовища – 7,1 грн						
3.	<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Соєве борошно	20	70	1,4	11
		Манітол	20	160	3,2	12
		CaCl ₂	0,22	50	0,011	7
		ZnSO ₄	0,32	80	0,026	9
		MgSO ₄	0,24	93	0,02	8
		MnCl ₂	0,25	186	0,046	17
		Na ₂ HPO ₄	0,28	70	0,02	18
Вартість 1 л середовища – 4,7 грн						

Примітка. - * ціни наведено станом на листопад 2021 року.

1. <https://prom.ua/p658494863-glyukoza-25kg.html?&primelead=MC41>

2. <https://prom.ua/p195267271-glutamat-natriya-e621.html?>

3. <https://prom.ua/p11214217-aminokislota-lizin-monogidhlorid.html>

4. <https://prom.ua/p260995616-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?>
5. <https://prom.ua/p1129789425-kalij-sirchanokislij-k2so4.html?&primelead=MS4wNw>
6. <https://prom.ua/p272723101-sol-hlorid-natriya.html?&primelead=MS41Mg>
7. <https://odessa.prom.ua/ua/p1523798573-hlorid-kaltsiyu-kaltsij.html?>
8. <https://ukrchemgroup.com/p783600334-sulfat-magniyamagnij-sernokislyj.html>
9. <https://prom.ua/p1375340336-sulfat-tsinka-1kg.html?&primelead=MS42NA>
10. <https://www.laboratorii.com/reaktivy/applchem/6290/>
11. <https://prom.ua/p1423912863-muka-soevaya.html?>
12. <https://prom.ua/p880146989-mannit.html?&primelead=MC41>
13. <https://prom.ua/p1365947345-kalij-monofosfat-monokalij.html?&primelead=MS4wNA>
14. <https://odessa.prom.ua/p1133576827-natrij-fosfornokislyj-zameschennyj.html?&primelead=MS4wOA>
15. <https://prom.ua/p1296599018-hlorid-kaltsiya-meshok.html?&primelead=M4zNg>
16. <https://odessa.prom.ua/p247287267-treonin.html?>
17. <https://odessa.prom.ua/p384762482-marganets-hloristyj-hlorid.html>
18. <https://odessa.prom.ua/p262712020-natrij-fosfornokislyj-dvuzameschyonnyj.html>

Проаналізувавши дані *табл.5 2*, можна зробити висновок, що продуцент № 3 *S.pilosus* ATCC 19797 росте на найдешевшому поживному середовищі (4,7 грн) порівняно з іншими мікроорганізмами. Продуцент № 1 *S. parvulus* CBS548.68 росте на найдорожчому середовищі, вартість якого становить 222,3 грн за 1 л. Це пов'язано з тим, що до складу поживного середовища входить дуже дорогий компонент MOPS (3-морфолінопропан-1-сульфонова кислота). Продуцент № 2 культивують на поживному середовищі ціна якого 7,1 грн.

Для подальшого вибору продуцента необхідно розрахувати умовну вартість 1 г дефероксаміну у грн. Для цього складемо *табл 5.3*

Таблиця 5.3

Умовна вартість дефероксаміну при культивуванні різних штамів

№	Біологічний агент	Концентрація дефероксаміну, г/л	Тривалість культивування, год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г дефероксаміну, грн/г
1.	<i>Streptomyces parvulus</i> CBS548.68	2	120	222,3	111,2
2.	<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	5	144	7,1	1,42
3.	<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	1,2	128	4,7	3,9

Отже проаналізувавши всі вище наведені розрахунки, можна зробити висновок про те, що продуцент № 2 *S. pilosus* ATCC 19797 є найефективнішим продуцентом дефероксаміну. Не зважаючи на найдовший час культивування (144 год), його продуктивність є найбільшою, а умовна вартість 1 г продукту становить 1,42 грн/г, що є значно нижчою в порівнянні з іншими продуцентами.

За основу розробки технології одержання дефероксаміну обираємо штам № 2 *S. pilosus* ATCC 19797 з таким складом поживного середовища, г/л:

Соеве борошно – 20 г/л;

Маніт – 20 г/л;

KH_2PO_4 – 32 г/л;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 4 г/л;

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2 г/л;

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,004 г/л;

Треонін – 0,1 г/л.

Оптимальний діапазон рН для культивування 7,5; температура – 29° С; час культивування – 144 год; швидкість перемішування – 150 об/хв[61].

РОЗДІЛ 6. ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ З УРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

Десферал (метансульфонат дефероксаміну В) отримують згідно технології, описаної у [86].

Молекулярна маса дефероксаміну В – 561, а дефероксаміну метансульфонату (Десфералу) – 657, отже в 1 кг Десфералу міститься $561/657 = 0,85$ або 85% дефероксаміну В із ступенем чистоти 99,6 %.

Розрахунок матеріальних потоків будемо проводити відносно активного інгредієнта дефероксаміна В (ДФОВ).

Десферал отримують поетапно шляхом виділення ДФОВ з КР, переведення його у хлоридну форму з подальшим очищенням до заданого ступеня очищення і отриманням метансульфонатної форми.

Отримання Десфералу складається з наступних етапів:

1. Отримання неочищеного хлориду ДФОВ

- 1.1. Відділення біомаси. Втрати $E_{\phi} = 0,03$
- 1.2. Іонообмін. Втрати $E_{еп} = 0,03$
- 1.3. Отримання хлориду ДФОВ.
- 1.4. Концентрування елюату. Втрати $E_{у\phi} = 0,02$
- 1.5. Кристалізація ДФОВ. Втрати $E_{кр} = 0,08$
- 1.6. Відділення кристалів ДФОВ. Втрати $E_{\phi} = 0,03$

Разом $E_{нд} = 0,19 = 19 \%$

2. Отримання очищеної форми хлориду ДФОВ

- 2.1. Приготування 5% розчину неочищеного хлориду ДФОВ
- 2.2. Знебарвлення розчину активованим вугіллям.
- 2.3. Відділення домішок. Втрати $E_{\phi 1} = 0,05$

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>			
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата				
Розробив		Підгерська Т.О.			Розділ 6. Підбір технологічного обладнання для післяферментаційних стадій з урахуванням матеріальних потоків по стадіях	Літ.	Арк.	Аркушів
Консульт.							59	161
Керівник		Карлаш Ю.В.				<i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В.П.						

2.4. Кристалізація ДФОВ. Втрати $E_{кр} = 0,23$

2.5. Відділення кристалів ДФОВ. Втрати $E_{ф2} = 0,05$

2.6. Сушіння кристалів ДФОВ. Втрати $E_{ф2} = 0,04$.

Разом $E_{нд} = 0,37 = 37\%$

3. Переведення очищеної форми ДФОВ у метансульфонатну форму

3.1. Приготування 5% розчину очищеного хлориду ДФОВ.

3.2. Іонообмін. Втрати $E_{кр} = 0,015 = 1,5\%$

3.3. Сушіння метансульфонату ДФОВ. Втрати $E_{сш} = 0,015 = 1,5\%$.

Разом- 3%.

4. Пакування, маркування, відвантаження

4.1. Подрібнення. Втрати $E_{нд} = 0,01 = 1\%$

4.2. Просіювання. Втрати $E_{пс} = 0,005 = 0,5\%$

4.3. Фасування. Втрати $E_{фд} = 0,005 = 0,5\%$.

Разом – 2 %

Загальні втрати при отриманні дефероксаміну В:

$$E_{вт} = 19 + 37 + 3 + 2 = 61\%$$

Кількість КР за цикл (без врахування втрат на нестерильність) згідно ТЕО $V_{кр} = 5,8 \text{ м}^3$. Вміст дефероксаміну В в КР $P_{кр} = 5 \text{ кг/м}^3$. Концентрація біомаси – $X_{кр} = 0,35 \text{ кг/м}^3$ [86].

I. Маса абсолютно сухої біомаси (АСБ) в культуральній рідині становить, кг:

$$G_{асб} = V_{кр} \times X_{кр} = 5,8 \times 0,35 = 2,03 \text{ кг}$$

II. Маса абсолютно сухого ДФОВ (АСР) в культуральній рідині становить, кг:

$$G_{аскр} = V_{кр} \times P_{кр} = 5,8 \times 5 = 29$$

III. На виході маємо отримати абсолютно сухого ДФОВ

$$G_{асд} = G_{аскр} \times (1 - E_{вт}) = 29 \cdot (1 - 0,61) = 11,3 \text{ кг}$$

IV. Кількість субстанції (дефероксаміну метансульфонату при вмісті В = 85% дефероксаміну та із врахуванням $W_v = 5\%$ залишкової вологи $CP_{гп} = (1 - W_v) = 1 - 0,05 = 0,95$ та ступенем чистоти дефероксаміну В – $C_{ч} = 0,996$, кг

$$G_{дсф} = G_{асд} / (B \times CP_{гп} \times C_{ч}) = 11,3 / (0,85 \times 0,95 \times 0,996) = 14 \text{ кг.}$$

Стадія 1. ОТРИМАННЯ НЕОЧИЩЕНОГО ХЛОРИДУ ДФОВ

Сумарні втрати ДФОВ по стадіям:		Втрати по об'ємам
Втрати продукту при фільтрації	$E_{\Sigma\phi 1} = 0,03$	$E_{\phi 1} = 0,03$
Втрати продукту при елюції	$E_{\Sigma\epsilon 1} = 0,06$	$E_{\epsilon 1} = 0,03$
Втрати продукту при концентруванні		
	$E_{\Sigma y\phi} = 0,08$	$E_{y\phi} = 0,02$
Втрати продукту при кристалізації	$E_{\Sigma\kappa 1} = 0,16$	$E_{\kappa 1} = 0,08$
Втрати продукту при фільтрації	$E_{\Sigma\phi 2} = 0,19$	$E_{\phi 2} = 0,03$

1. Фільтрування культуральної рідини (фільтр-прес з наливкою фільтр-перліту)

Втрати продукту при фільтрації $E_{\phi} = 0,03$

1.1. Загальна кількість вологого осаду, що видаляється з $V_{\kappa p}$ при вологості осаду $W_{oc} = (65-85\%)$. Приймаємо $W_{oc} = 0,70$, складе, кг

$$G_{ocb} = G_{acb} / (1 - W_{oc}) = 2,03 / (1 - 0,7) = 6,8$$

1.2. Маса абсолютно сухого ДФОВ, розчиненого у фільтраті, кг

$$G_{дф} = G_{аскр} \times (1 - E_{\phi}) = 29(1 - 0,03) = 28,1$$

1.3. Об'єм фільтрату після фільтрування, л

$$V_{фт1} = V_{\kappa p} \times 1000 - (G_{осд} \times 1000 / 1050) = 5,8 \cdot 1000 - (6,8 \cdot 1000 / 1050) = 5\,794$$

Густина осаду $\rho_{oc} = 1050$ (1010... 1050 кг/м³)

1.4. З врахуванням втрат $E_{\phi 1}$

$$V_{фг} = V_{фт1} \cdot (1 - E_{\phi 1}) = 5794 \cdot (1 - 0,03) = 5\,620 \text{ л}$$

2. Іонообмін з використанням аніонобмінної смоли LEWATIT CNP 80 у аміачній формі

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma\epsilon 1} = 0,06$

2.1. Об'єм смоли $V_{см}$ в іонообмінній колонці (модуль $M_{см}$: 7,7 л розчину: 1 л смоли), л

$$V_{см} = V_{фг} / M_{см} = 5\,620 / 7,7 = 730$$

2.2. Промивання колонки деіонізованою водою (модуль $V_{см} \cdot V_{дв} = 1:2$).

Кількість води, л

$$V_{дв} = V_{см} \times 2 = 730 \times 2 = 1\,460$$

2.3. Елюція ДФОВ 0,2 М соляною кислотою (НСІ)

Об'єм елюату (модуль $M_{см}$: 1 л смоли :10 елюату), л

$$V_{ел1} = V_{см} \times M_{см} = 730 \cdot 10 = 7\,300$$

2.4. Об'єм елюату з врахуванням втрат об'єму при елюції $E_{ел1} = 0,03$

$$V_{ел} = V_{ел1} \cdot (1 - E_{ел1}) = 7300 \cdot (1 - 0,03) = 7081 \text{ л}$$

2.5. Маса розчиненого ДФОВ в елюаті з врахуванням загальних втрат на стадії, кг

$$G_{де} = G_{аскр} \cdot (1 - E_{ел}) = 29 \cdot (1 - 0,06) = 27,3$$

2.5. Маса хлориду ДФОВ в елюаті, кг

$$G_{хд} = G_{де} / M_x = 27,3 / 0,94 = 29$$

де $M_x = 0,94$, вміст ДФОВ в хлориді ДФОВ

3. Концентрування елюату ультрафільтрацією

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma уф} = 0,08$, в тому числі при ультрафільтрації $E_{уф} = 0,02$.

Ступінь концентрування $K_{уф} = 60$

3.1. Маса абсолютно сухого ДФОВ в концентраті після ультрафільтрації з врахуванням втрат, кг

$$G_{ду} = G_{аскр} \cdot (1 - E_{су}) = 29 \cdot (1 - 0,08) = 26,7$$

3.2. Маса хлориду ДФОВ в концентраті, кг

$$G_{хлк} = G_{ду} / M_x = 26,7 / 0,94 = 28,4$$

3.3. Об'єм концентрату після ультрафільтрації з врахуванням втрат, л

$$V_{кн} = V_{ел} \cdot (1 - E_{уф}) / K_{уф} = 7081 \cdot (1 - 0,02) / 60 = 116$$

3.4. Об'єм пермеату, л

$$V_{пм} = V_{ел} - V_{кн} = 7081 - 116 = 6\,965$$

4. Осадження та кристалізація ДФОВ

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma кр1} = 0,16$

4.1. Співвідношення концентрату ДФОВ та метанолу 1:1

Кількість метанолу $V_{\text{MT}} = V_{\text{кон}} = 116$, л

4.2. Співвідношення концентрату та хлориду амонію (NH_4Cl) 1 л : 60 г

Кількість хлориду амонію $G_{\text{ам}} = V_{\text{кон}} \times 60 = 116 \times 60 = 6,96$ кг

Густина хлориду амонію $\rho_{\text{ам}} = 1526$ кг/м³

Об'єм хлориду амонію $V_{\text{ам}} = G_{\text{ам}} \times 1000 / \rho_{\text{ам}} = 6,96 \cdot 1000 / 1526 = 4,56$ л

4.3. Об'єм суспензії

$V_{\text{сус}} = V_{\text{кн}} + V_{\text{MT}} + V_{\text{ам}} = 116 + 116 + 4,56 = 237$ л

4.4. Маса абсолютно сухого ДФОВ після кристалізації з врахуванням втрат, кг

$G_{\text{дк}} = G_{\text{аскр}} \cdot (1 - E_{\Sigma\text{кр1}}) = 29 (1 - 0,16) = 24,4$

4.5. Маса хлориду ДФОФ в кристалах, кг

$G_{\text{хд}} = G_{\text{дк}} / M_{\text{х}} = 24,4 / 0,94 = 25,9$

5. Відділення кристалів ДФОВ фільтруванням на друк-фільтрі

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma\text{фт2}} = 0,19$

5.1. Маса абсолютно сухого ДФОВ після фільтрації з врахуванням втрат, кг

$G_{\text{дф}} = G_{\text{аскр}} \cdot (1 - E_{\Sigma\text{фт2}}) = 29 (1 - 0,19) = 23,5$

5.2. Маса хлориду ДФОВ в кристалах, кг

$G_{\text{хд}} = G_{\text{дф}} / M_{\text{х}} = 23,5 / 0,94 = 25$

5.3. Маса вологих кристалів хлориду ДФОВ після фільтрування з врахуванням міжкристалічної вологи ($W_{\text{в}} = 10-20$ % вологи) $W_{\text{в}} = 0,1$

$G_{\text{вкр}} = G_{\text{хд}} / (1 - W_{\text{в}}) = 25 / (1 - 0,1) = 27,8$

Об'єм кристалів $V_{\text{кт}} = G_{\text{вкр}} \cdot 1000 / \rho_{\text{дф}} = 27,8 \cdot 1000 / 1340 = 20,7$ л

де $\rho_{\text{дф}} = 1340$ кг/м³ – густина кристалів ДФОВ

5.4. Об'єм суспензії з врахуванням втрат при фільтрації $E_{\text{фт2}} = 0,03$

$V_{\text{сус1}} = V_{\text{сус}} \cdot (1 - E_{\text{фт2}}) = 237 \cdot (1 - 0,03) = 230$ л

5.5. Об'єм фільтрату, л

$V_{\text{фт2}} = V_{\text{сус1}} - V_{\text{кт}} = 230 - 20,7 = 209$ л

Стадія II. ОТРИМАННЯ ОЧИЩЕНОГО ХЛОРИДУ ДЕФЕРОКСАМІНУ В

Сумарні втрати при отриманні очищеного ДФОВ:

Втрати по об'ємам

Видалення домішок та вугілля

фільтруванням

$$E_{\Sigma\phi3} = 0,24 \quad E_{\phi3} = 0,05$$

Кристалізація хлориду ДФОВ

$$E_{\Sigma\kappa p2} = 0,47 \quad E_{\kappa p2} = 0,23$$

Відділення кристалів ДФОВ

фільтруванням

$$E_{\Sigma\phi4} = 0,52 \quad E_{\phi4} = 0,05$$

Сушіння кристалів ДФОВ

$$E_{\Sigma\text{сш1}} = 0,56 \quad E_{\text{сш1}} = 0,04$$

1. Розчинення неочищеного хлориду ДФОВ у розчині метанолу (модуль розчину метанолу: 1 л води : 4 л метанолу)

1.1. Об'єм розчину метанолу (модуль $M_{\text{мт}}$: 1 кг хлориду ДФОВ : 8,3 л розчину метанолу), л

$$V_{\text{рм}} = G_{\text{вкр}} \times M_{\text{мт}} = 27,8 \cdot 8,3 = 231$$

1.2. Об'єм метанолу (модуль розчину метанолу: 1 л води : 4 л метанолу), л

$$V_{\text{мт}} = V_{\text{рм}} \times 4/5 = 231 \cdot 4/5 = 184$$

1.3. Об'єм води на розчинення метанолу, л

$$V_{\text{в}} = V_{\text{рм}} \times 1/5 = 231/5 = 46$$

1.4. Приготування розчину неочищеного хлориду ДФОВ, л

$$V_{\text{рд}} = V_{\text{рм}} + (G_{\text{вкр}} \cdot 1000 / \rho_{\text{ДФОВ}}) = 231 + (27,8 \cdot 1000 / 1340) = 252$$

де $\rho_{\text{ДФОВ}} = 1340$ кг/м³, густина ДФОВ

2. Знебарвлення розчину активованим вугіллям

2.1. Кількість активованого вугілля на розчин (модуль: 1 кг вугілля : 23 кг ДФОВ), кг

$$G_{\text{ав}} = G_{\text{вкр}} / 23 = 27,8 / 23 = 1,2$$

3. Фільтрування суміші на друк-фільтрі

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma\phi\tau3} = 0,24$

3.1. Маса абсолютно сухого ДФОВ після фільтрації з врахуванням втрат, кг

$$G_{\text{ДФ}} = G_{\text{аскр}} \cdot (1 - E_{\Sigma\phi\tau3}) = 29(1 - 0,24) = 22$$

3.2. Маса хлориду ДФОВ в розчині, кг

$$G_{\text{хд}} = G_{\text{ДФ}} / M_{\text{х}} = 22 / 0,94 = 23,4$$

3.3. Об'єм активованого вугілля, л

$$V_{\text{ав}} = G_{\text{ав}} \cdot 1000 / \rho_{\text{ав}} = 1,2 \cdot 1000 / 200 = 6 \text{ л}$$

де $\rho_{ав} = 200 \text{ кг/м}^3$, густина активованого вугілля

3.4. Об'єм суспензії, л

$$V_{сус2} = V_{рд} + V_{ав} = 252 + 6 = 258$$

3.5. Об'єм фільтрату з врахуванням втрат $E_{ф3} = 0,05$, л

$$V_{фт1} = (V_{сус2} - V_{ав}) \times (1 - E_{ф3}) = (258 - 20) \cdot (1 - 0,05) = 224 \text{ л}$$

3.6. Загальна кількість вологого осаду, що видаляється з суспензії при вологості осаду $W_{ос} = (65-85\%)$, $W_{ос} = 0,70$ складе, кг

$$G_{ос2} = G_{ав} / (1 - W_{ос}) = 6 / (1 - 0,7) = 20$$

4. Кристалізація хлориду ДФОВ

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma кр} = 0,47$

4.3. Об'єм суспензії $V_{сус2} = V_{фт1} = 224 \text{ л}$

4.4. Маса абсолютно сухого ДФОВ після кристалізації з врахуванням втрат, кг

$$G_{дкр} = G_{аскр} \cdot (1 - E_{кр}) = 29 \cdot (1 - 0,47) = 15,4$$

4.5. Маса хлориду ДФОФ в кристалах, кг ($M_x = 0,94$)

$$G_{хд} = G_{дкр} / M_x = 15,4 / 0,94 = 16,4$$

5. Відділення кристалів ДФОВ фільтруванням на друк-фільтрі

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma фт4} = 0,52$

5.1. Маса абсолютно сухого ДФОВ після фільтрації з врахуванням втрат, кг

$$G_{дф} = G_{аскр} \cdot (1 - E_{\Sigma фт4}) = 29 \cdot (1 - 0,52) = 13,9$$

5.2. Маса хлориду ДФОФ в кристалах, кг ($M_x = 0,94$)

$$G_{хд} = G_{дф} / M_x = 13,9 / 0,94 = 14,8$$

5.3. Маса вологих кристалів хлориду ДФОВ після фільтрування з врахуванням міжкристалічної вологи ($W_v = 10-20 \%$ вологи) $W_v = 0,1$; кг

$$G_{кр2} = G_{хд} / (1 - W_v) = 14,8 / (1 - 0,1) = 16,5 \text{ кг}$$

$$\text{Об'єм кристалів } V_{кт} = (G_{кр2} \cdot 1000 / \rho_{дф}) = 16,5 \cdot 1000 / 1340 = 12,3 \text{ л}$$

де $\rho_{дф} = 1340 \text{ кг/м}^3$ – густина кристалів ДФОВ

5.4. Об'єм фільтрату з врахуванням втрат при фільтрації $E_{ф4} = 0,05$, л

$$V_{ф2} = (V_{сус2} - V_{кт}) \cdot (1 - E_{ф4}) = (224 - 12,3) \cdot (1 - 0,05) = 201 \text{ л}$$

6. Сушіння кристалів хлориду ДФОВ у вакуум-сушільній шафі

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma\text{сш1}} = 0,56$

6.1. Маса абсолютно сухого ДФОВ після сушіння з врахуванням втрат, кг

$$G_{\text{сд}} = G_{\text{аскр}} \cdot (1 - E_{\Sigma\text{сш1}}) = 29 \cdot (1 - 0,56) = 12,8$$

6.2. Маса сухого очищеного хлориду ДФОФ в кристалах з врахуванням кінцевої вологості $W_{\text{гп}} = 1 - \text{CP}_{\text{хд}} = 5\%$, $\text{CP}_{\text{хд}} = 0,95$; $M_{\text{х}} = 0,94$; кг

$$G_{\text{схд}} = G_{\text{сд}} / (M_{\text{х}} \cdot \text{CP}_{\text{хд}}) = 12,8 / (0,94 \cdot 0,95) = 14,3$$

6.3. Маса видаленої вологи, кг

$$W_{\text{вш}} = G_{\text{кр}} - G_{\text{схд}} = 16,5 - 14,3 = 2,2$$

Стадія III. ОТРИМАННЯ МЕТАНСУЛЬФОНАТУ ДЕФЕРОКСАМИНА В (ДЕСФЕРАЛУ)

Сумарні втрати по стадіям

Втрати по об'ємам

Іонообмін

$$E_{\Sigma\text{ел2}} = 0,575$$

$$E_{\text{ел2}} = 0,015$$

Ліофільне висушування

метансульфонату ДФОВ

$$E_{\Sigma\text{лс}} = 0,590$$

$$E_{\text{лс}} = 0,015$$

1. Розчинення чистого хлориду ДФОВ у деіонізованій воді (очищеній) воді

1.1. Об'єм води (модуль МВ: 1 кг ДФОВ : 14,7 води), л

$$V_{\text{в}} = G_{\text{схд}} \times \text{МВ} = 14,3 \times 14,7 = 210$$

1.2. Об'єм чистого хлориду ДФОВ, л

$$V_{\text{схд}} = (G_{\text{схд}} \cdot 1000 / \rho_{\text{ДФ}}) = 14,3 \cdot 1000 / 1340 = 10,7$$

де $\rho_{\text{ДФ}} = 1340 \text{ кг/м}^3$, густина ДФОВ

1.3. Об'єм розчину $V_{\text{рз}}$, л

$$V_{\text{рз}} = V_{\text{в}} + V_{\text{схд}} = 210 + 10,7 = 220$$

2. Іонообмін на колонці з аніонообмінною смолою AMBERLITE IRA 68 у метансульфонатній формі

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma\text{ел2}} = 0,575$

2.1. Об'єм смоли $V_{\text{см}}$ в іонообмінній колонці (модуль $M_{\text{см}}: 3,7$ л розчину: 1 л смоли), л

$$V_{\text{см}} = V_{\text{рз}} / M_{\text{см}} = 220 / 3,7 = 59,5$$

2.2. Промивання колонки деіонізованою водою (модуль $M_{пр} = V_{см} \cdot V_{дв} = 1:0,67$). Об'єм води, л

$$V_{дв} = V_{см} \times M_{см} = 59,5 \times 0,67 = 40$$

2.3. Об'єм розчину після іонообміну та промивання водою, л; втрати розчину $E_{ел2} = 0,015$

$$V_{ел2} = (V_{рз} + V_{дв}) \times (1 - E_{ел2}) = (220 + 44) \times (1 - 0,015) = 256$$

2.4. Маса розчиненого ДФОВ в елюаті з врахуванням втрат кг

$$G_{де} = G_{аскр} \cdot (1 - E_{ел}) = 29 \cdot (1 - 0,575) = 12,3$$

3. Ліофільне висушування розчину Десфералу

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma лс} = 0,59$

3.1. Маса сухого ДФОВ з врахуванням втрат

$$G_{сдф} = G_{аскр} \cdot (1 - E_{\Sigma лс}) = 29(1 - 0,59) = 11,89 \text{ кг}$$

3.2. Маса сухого десфералу з врахуванням кінцевої вологості $W_{гп} = 1 - CP_{дс} = 5\%$; $CP_{дс} = 0,95$ кг та масової частки ДФОВ у десфералі $M_{дф} = 0,85$

$$G_{сд} = G_{сдф} / (CP_{дс} \times M_{дф}) = 11,89 / (0,95 \cdot 0,85) = 14,7 \text{ кг}$$

3.2. Маса розчину десфералу, кг

$$G_{дс} = (V_{н} \cdot \rho_{ел} / 1000) = 256 \cdot 1020 / 1000 = 261$$

де $\rho_{ел} = 1020$ кг/м³, густина елюату

3.3. Маса видаленої вологи, кг

$$W_{в} = G_{дс} - G_{сд} = 261 - 14,7 = 246$$

IV. СТАДІЯ ПАКУВАННЯ, МАРКУВАННЯ, ВІДВАНТАЖЕННЯ

Сумарні втрати продукту по стадіям

Подрібнення	$E_{пд} = 0,01$
Просіювання	$E_{пр} = 0,005$
Фасування	$E_{фс} = 0,005$

Разом: 0,02

Маса абсолютного сухого ДФОВ у цільовому продукті після ПМВ

$$G_{асп} = G_{сдф} (1 - 0,02) = 11,6 \text{ кг}$$

Похибка розрахунку за рахунок математичного округлення

$$\Delta = |G_{цв} - G_{асп}| \times 100 / G_{асп} = |11,3 - 11,6| \times 100 / 11,6 = 2,6\%$$

1. Подрібнення сухого десфералу

1.1. Маса подрібненого сухого десфералу з врахуванням втрат, кг

$$G_{\text{пд}} = G_{\text{сд}} \cdot (1 - E_{\text{пд}}) = 14,7(1 - 0,01) = 14,5$$

1.2. Маса просіяного сухого десфералу з врахуванням втрат, кг

$$G_{\text{пр}} = G_{\text{пд}} \cdot (1 - E_{\text{пр}}) = 14,5(1 - 0,005) = 14,4$$

1.3. Маса розфасованого сухого десфералу з врахуванням втрат, кг

$$G_{\text{фс}} = G_{\text{пр}}(1 - E_{\text{фс}}) = 14,4(1 - 0,005) = 14,3$$

Похибка розрахунку за рахунок математичного округлення:

$$\Delta = |G_{\text{цк}} - G_{\text{фс}}| \times 100 / G_{\text{фс}} = |14,0 - 14,3| \times 100 / 14,3 = 2,1 \%$$

Таблиця 6.1

Розрахунок матеріального балансу по стадіям

№	Етап	Надійшло	Вийшло
<i>Стадія I. Отримання неочищеного хлориду дефероксаміну В (нДФОВ)</i>			
1.	Зберігання культуральної рідини	КР – 5 800 л	КР – 5 800 л
2.	Фільтрування осаду біомаси	КР – 5 800 л	Фільтрат – 5 620 л Заг. кількість вологого осаду, що видаляється - 6,8 кг
3.	Іонообмін	Фільтрат – 5 620 л Елюат (0,2 М HCl) 1 680 л	Елюат – 7 081 л
4.	Концентрування ультрафільтрацією	Елюат – 7 081 л, ступінь концентрування K = 60	Концентрат – 116 л Пермеат – 6 965 л
5.	Осадження та кристалізація	Концентрат – 116 л Метанол – 116 л Хлорид амонію - 6,96 кг (4,6 л)	Суспензія – 237 л
6.	Фільтрування кристалів	Суспензія – 237 л	Вологі кристали (10% вологи) – 27,8 кг Водно-спиртова суміш – 209 л

Стадія II. Отримання очищеного хлориду дефероксаміну Продовження табл. 6.1			
1.	Приготування розчину неочищеного ДФОВ та освітлення	Вологі кристали ДФОВ- 27,8 кг ($V_{ДФ} = 22$ л) Метанол - 184 л Вода - 46 л Активоване вугілля - 1,2 кг ($V_{ав} = 6$ л)	Розчин ДФОВ – 258 л
2.	Видалення активованого вугілля фільтруванням	Суспензія – 258 л	Фільтрат – 244 л Заг. кількість вологого осаду активованого вугілля, що видаляється - 20 кг
3.	Перекристалізація охолодженням	Фільтрат – 244 л	Суспензія – 244 л
4.	Фільтрування кристалів	Суспензія – 244 л	Вологі кристали (10% вологи) – 16,5 кг Водно-спиртова суміш – 201 л
5.	Сушіння	Вологі кристали – 16,5 кг	Сухі кристали ДФОВ (5% залишкової вологи) – 14,3 кг Маса видаленої вологи - 2,2 кг
Стадія III. Отримання метансульфонату дефероксаміну В (Десфералу)			
1.	Приготування розчину очищеного ДФОВ	Сухі кристали очДФОВ- 14,3 кг Деіонізована вода - 210 л	Розчин очДФОВ – 221 л
2.	Іонообмін	Розчин очДФОВ – 221 л Вода для промивки $V_{ВП} = 40$ л	Розчин метансульфонату дефероксаміну - 256л
3.	Ліофільне висушування	Розчин метансульфонату дефероксаміну- 256 л	Сухі кристали Десфералу(5% залишкової вологи) – 14,7 кг Маса видаленої вологи - 246 кг
Стадія IV. Фасування, пакування, відвантаження Десфералу			

1.	Подрібнення кристалів десфералу	Сухі кристали Десфералу(5% залишкової вологи) –14,7 кг	Маса подрібненого сухого десфералу <i>Закінчення табл.б.1</i>
2.	Просіювання подрібненого десфералу	Маса подрібненого сухого десфералу – 14,5 кг	Маса просіяного сухого десфералу з врахуванням втрат – 14,4 кг
3.	Фасування порошку десфералу	Маса просіяного сухого десфералу – 14,4 кг	Маса розфасованого сухого десфералу з врахуванням втрат – 14,3 кг

РОЗДІЛ 7. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ

7.1 Розрахунок річної потужності виробництва лікарського засобу та кількості серій на рік.

Кількість продукту Десфералу згідно розрахункам потреби за цикл складає 14 кг/цикл (розділ 6). Згідно АНД 1 флакон містить 500 мг ліофілізованого порошку для приготування розчину для ін'єкцій у флаконах № 10. Отже, необхідна кількість флаконів для упакування даної кількості Десфералу за цикл (серію) має становити

$$N_{\text{фл}} = 14000 \text{ г} / 0,5 \text{ г} = 28 \text{ 200 флаконів}$$

Технологічна схема отримання ГЛЗ Десфералу базується на стадіях технологічного процесу, які використовуються при отриманні субстанції десфероксаміну В (Стадії I, II, III), Відмінність полягає в останній стадії III, коли заміняється стадія розливу Десфералу у піддони на стерильну фільтрацію розчину десфералу після іонообміну, розлив у флакони та їх висушування у ліофільній сушарці. Порядок технологічних операцій отримання ГЛЗ Десфералу наведено нижче.

Стадія III. Отримання сухого метансульфонату дефероксаміна В (ГЛЗ Десфералу у флаконах).

Сумарні втрати по стадіям	Втрати по об'ємам	
Розчинення чистого хлориду		
ДФОВ у деіонізованій воді	$E_{\Sigma \text{роз}} = 0,560$	0
Іонообмін	$E_{\Sigma \text{ел2}} = 0,575$	$E_{\text{ел2}} = 0,015$
Стерильна фільтрація розчину		
метансульфонату ДФОВ	$E_{\Sigma \text{сф}} = 0,585$	$E_{\text{сф}} = 0,01$

<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>									
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата	Розділ 7. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання лікарського засобу	Літ.	Арк.	Аркушів	
Розробив		Підгерська Т.О.							
Консульт.								71	161
Керівник		Карлаш Ю.В.				Кафедра БТМ			
Н. Контр.									
Затверд..		Стабніков В.П.							

Розлив розчину метансульфонату

ДФОВ по флаконах $E_{\Sigma_{роз}} = 0,585$ $E_{роз} = 0,0001$

Ліофільне висушування $E_{\Sigma_{лф}} = 0,595$ $E_{лф} = 0,01$

Укупюрювання флаконів

після висушування $E_{\Sigma_{ук}} = 0,602$ $E_{ук} = 0,007$

Обкатка ковпачків $E_{\Sigma_{ук}} = 0,61$ $E_{ук} = 0,008$

1. Розчинення чистого хлориду ДФОВ у деіонізованій воді (очищеній) воді

1.1. Об'єм води (модуль МВ: 1 кг ДФОВ : 14,7 води), л

$$V_{в} = G_{схд} \times M_{в} = 14,3 \times 14,7 = 210$$

1.2. Об'єм чистого хлориду ДФОВ, л

$$V_{схд} = (G_{схд} \cdot 1000 / \rho_{ДФ}) = 14,3 \cdot 1000 / 1340 = 10,7$$

де $\rho_{ДФ} = 1340 \text{ кг/м}^3$, густина ДФОВ

1.3. Об'єм розчину $V_{рз}$, л

$$V_{рз} = V_{в} + V_{схд} = 210 + 10,7 = 221$$

2. Іонообмін на колонці з аніонообмінною смолою AMBERLITE IRA 68 у метансульфонатної форми

Сумарні втрати ДФОВ на стадії $E_{\Sigma_{ел2}} = 0,575$

2.1. Об'єм смоли $V_{см}$ в іонообмінній колонці (модуль $M_{см}: 3,7$ л розчину: 1 л смоли), л

$$V_{см} = V_{рз} / M_{см} = 221 / 3,7 = 59,7$$

2.2. Промивання колонки деіонізованою водою (модуль $M_{пр} = V_{см} \cdot V_{дв} = 1:0,67$). Об'єм води, л

$$V_{дв} = V_{см} \times M_{см} = 59,7 \times 0,67 = 40$$

2.3. Об'єм розчину після іонообміну та промивання водою, л; втрати розчину $E_{ел2} = 0,015$

$$V_{ел2} = (V_{рз} + V_{дв}) \times (1 - E_{ел2}) = (221 + 40) \times (1 - 0,015) = 257$$

2.4. Маса розчиненого ДФОВ в елюаті з врахуванням втрат кг

$$G_{де} = G_{аскр} \cdot (1 - E_{ел}) = 29 \cdot (1 - 0,575) = 12,3$$

2.5. Маса а.с. Десфералу в розчині становить

$$G_{дс} = G_{де} / M_{дф} = 12,3/0,85 = 14,5 \text{ кг}$$

3. Стерильна фільтрація розчину Десфералу

3.1. Об'єм розчину після стерильної фільтрації з врахуванням втрат $E_{сф} = 0,01$ становить

$$V_{сф} = V_{ел2} \times (1 - E_{сф}) = 257 \times (1 - 0,01) = 254 \text{ л}$$

3.2. Маса а.с. Десфералу в розчині з врахуванням втрат становить

$$G_{асд} = G_{дс} \times (1 - E_{сф}) = 14,5 (1 - 0,01) = 14,355 \text{ кг}$$

4. Розлив розчину Десфералу по флаконам № 10

4.1. Необхідна кількість флаконів N із врахуванням втрат при розливі, ліофільному сушінні, укупорюванні флаконів корками та обкатці ковпачками $E_{роз} = 0,0001$, $E_{лф} = 0,01$; $E_{ук} = 0,007$, $E_{об} = 0,008$

Кількість флаконів для розливу заданої кількості розчину при масі Десфералу в 1 флаконі згідно АНД має складати 0,5 г з врахуванням $W_{гп} = 1 - CP_{дс} = 5 \%$; $CP_{дс} = 0,95$

$$N = 14\,355 \text{ г} / (0,5 \times 0,95) = 30221 \text{ фл.}$$

Об'єм рідини у кожному флаконі становить

$$V_{1фл} = V_{сф} / N = 254\,000 / 30221 = 8,4 \text{ мл}$$

Кількість флаконів після розливу з врахуванням втрат $E_{роз} = 0,0001$

$$N_{роз} = N (1 - (E_{роз} + E_{ук})) = 30221 / (1 - 0,0001) = 30219 \text{ фл.}$$

5. Ліофільне висушування розчину Десфералу

5.1. Маса розчину десфералу,

$$G_{дс} = (V_{рд} \cdot \rho_{ел} / 1000) = 254 \cdot 1020 / 1000 = 259 \text{ кг,}$$

де $\rho_{ел} = 1020 \text{ кг/м}^3$, густина розчину Десфералу

5.2. Маса Десфералу з урахуванням втрат 1% та залишкової вологості $W_{гп} = 1 - CP_{дс} = 5 \%$; $CP_{дс} = 0,95$

$$G_{сд} = (14,355 \times 0,99) / 0,95 = 14,96 \text{ кг}$$

5.3. Маса видаленої вологи, з урахуванням втрат 1% ,кг

$$W_{в} = G_{дс} - G_{сд} = (259 - 14,96) \times 0,99 = 242$$

6. Укупорювання флаконів корками після висушування

Кількість флаконів після укупорювання корками з врахуванням втрат $E_{ук} = 0,007$

$$N_{ук} = N_{роз}(1-E_{ук}) = 30219 (1-0,007) = 30007 \text{ фл.}$$

Кількість Десфералу у флаконах з врахуванням втрат

$$G_{дсф1} = G_{сд} \times (1-E_{ук}) = 14,96 (1-0,007) = 14,86 \text{ кг}$$

7. Обкатка ковпачків

Кількість флаконів після обкатки ковпачків з врахуванням втрат $E_{об} = 0,008$

$$N_{об} = N_{ук}(1-E_{об}) = 30007 (1-0,008) = 29767 \text{ фл.}$$

Кількість Десфералу у флаконах з врахуванням втрат

$$G_{дсф2} = G_{дсф1} \times (1-E_{об}) = 14,86(1-0,008) = 14,741 \text{ кг}$$

Кількість Десфералу у 1 флаконі

$$G_{1ф} = G_{дсф2}/N_{об} = 14741/29767 = 0,495 \text{ г} = 495 \text{ мг}$$

Згідно п. 12 АНД у флаконі місткістю 500 мг повинно бути не менше 490,53 мг препарату. Отримана кількість Десфералу в 1 флаконі відповідає АНД.

Стадія ПМВ

Отримані на стадії 8 флакони упаковують у вторинну тару – картонні коробки по 10 флаконів у кожену. Приймаємо, що втрати флаконів та втрати Десфералу на даній стадії відсутні.

Кількість коробок на серію:

$$N_{к} = N_{об}/10 = 29767/10 = 2976 \text{ коробок}$$

Розрахунок матеріального балансу з врахуванням потоків по стадіям

№	Етап	Надійшло	Втрати	Вийшло
<i>Стадія III. Отримання метансульфонату дефероксаміну В (Десфералу)</i>				
1.	Приготування розчину очищеного хлориду ДФОВ	Сухі кристали очДФОВ- 14,3 кг ($V_{кт} = 10,7$ л) Деіонізована вода - 210 л	-	Розчин очДФОВ – 221 л
2.	Іонообмін	Розчин очДФОВ – 221 л Вода для промивки ВВП- 40 л	4 л	Розчин метансульфонату дефероксаміну - 257 л
3.	Стерильна фільтрація розчину Десфералу	Розчин метансульфонату дефероксаміну - 257 л	3 л	Стерильний розчин метансульфонату дефероксаміну - 254 л
4.	Розлив розчину десфералу по флаконам № 10	Розчин метансульфонату дефероксаміну - 254 л Кількість флаконів – 30221	1 л флаконів – 3 шт.	Стерильний розчин метансульфонату дефероксаміну - 253 л Кількість флаконів – 30219
5.	Ліофільне висушування	Маса розчину метансульфонату дефероксаміну- 259 кг	2,04 кг	Сухі кристали Десфералу (5% залишкової вологи) – 14,96 кг Маса видаленої вологи - 242 кг
6.	Укупування флаконів корками	Кількість флаконів – 30219	212 фл.	Кількість флаконів – 30007
7.	Обкатка ковпачків	Кількість флаконів – 30007	240 фл.	Кількість флаконів – 29767
8.	Кількість сухого Десфералу в серії			14,741 кг
9.	Кількість сухого Десфералу в 1 флаконі	$14741/29767 =$ 0,495 г		495 мг

7.2. Підбір технологічного обладнання

Підбір машини для шприцевого наповнення ін'єкційним розчином флаконів за такими даними:

Тип первинної упаковки

Флакон

Загальний об'єм серії розчину

$V_p = 254$ л

Об'єм ампули/флакона	$V_{ам} = 10$ мл
Кількість флаконів у серії	$N_{ср} = 29767$ фл.
Приблизний час наповнення флаконів	$\tau = 2,5$ години

Коефіцієнт використання продуктивності машини $K_{п}$ – не менше $\pm 10\%$.

У разі коли $K_{п}$ більше вказаних меж, вибраний тип машини не підходить для даного процесу.

Розрахунок

1. Розрахуємо продуктивність процесу наповнення флаконів мл/хв

$$G_{нап} = V_p / \tau_n \cdot 60 = (254 \cdot 1000) / (2,5 \cdot 60) = 1693 \text{ мл/хв.}$$

2. Продуктивність по ампулам (флаконам) об'ємом роздіву $V_{фл1} = 8,37$

мл

$$G_{амп} = G_{нап} / V_{ам} = 1693 / 8,4 = 201 \text{ фл/хв}$$

3. З таблиці 7.1. вибираємо машину моделі FFP-20/6 продуктивністю по ампулам об'ємом у 10 мл – $G_{маш} = 200$ фл/хв.

Втрати при наповненні (бій) при використанні даної машини складають – $E_{вт} = 0,01\%$.

3. З урахуванням втрат при наповненні продуктивність процесу наповнення флаконів складе

$$G_{нвт} = G_{амп} (1 - E_{вт}) = 201 (1 - 0,0001) = 201 \cdot 0,9999 = 200 \text{ фл/хв}$$

4. Визначаємо коефіцієнт використання продуктивності машини

$$K_{п} = |(1 - G_{нвт} / G_{маш})| \times 100\% = |(1 - 200 / 200)| \times 100\% = 0 \%$$

що вписується у задані вимоги $\pm 10\%$

5. Реальний час роботи автомата для наповнення флаконів в серії складе

$$\tau_n = N_{ср} / G_{нвт} \cdot 60 = 29767 / 200 \cdot 60 = 2,48 \text{ год}$$

Технічні характеристики машин для шприцевого наповнення флаконів

Машина для наповнення флаконів FFP КНГ				
Модель	FFP-20/6	FFP-40/12	КНГ6	КНГ12
Параметри флакона	2 мл ... 100 мл	2 мл ... 20 мл	2мл ... 100 мл	2 мл ... 20 мл
Продуктивність	300 фл./хв., (5 мл)	600 фл./хв., (5 мл)	400 фл./хв., (5 мл)	600 фл./хв., (5 мл)
	200 фл./хв., (10 мл)	400 фл./хв., (10 мл)	200 фл./хв., (10 мл)	400 фл./хв., (10 мл)
	100 фл./хв., (20 мл)	200 фл./хв., (20 мл)	100 фл./хв., (20 мл)	300 фл./хв., (20 мл)
Точність наповнення	$\pm 0,5\%$ (V2 мл)	$\pm 0,5\%$ (V2 мл)	$\pm 0,5\%$ (V2 мл)	$\pm 0,5\%$ (V2 мл)
Відсоток бою	0,01%	0,01%	0,01%	0,01%

Вибір ліофільної сушарки

Маса матеріалу, що підлягає сушінню за технологічний цикл, який триває $\tau_{\text{п}} = 35$ годин, $G_{\text{с}} = 258$ кг. За цей період одержують $G_{\text{п}} = 14,96$ кг висушеного продукту і $W_{\text{к}} = 241$ кг водяного конденсату.

Визначення основних розмірів сублимаційної камери

Довільно приймемо, що кількість циклів сублимації за повний технологічний цикл виробництва дорівнює $N_{\text{с}} = 1$.

1. Цикл сублимації триває $\tau_{\text{с}} = \tau_{\text{п}} / N_{\text{с}} = 35 / 1 = 35$ годин.

2. За один цикл потрібно переробити $G_{\text{ц}} = G_{\text{с}} / N_{\text{с}} = 258 / 1 = 258$ кг продукту, яка при густині вихідного продукту $\rho_{\text{с}} = 1020$ кг/м³ буде займати об'єм $V_{\text{с}} = G_{\text{ц}} / \rho_{\text{с}} = 258 / 1020 = 0,253$ м³ або 253 л при цьому видалиться $W_{\text{с}} = W_{\text{к}} / N_{\text{с}} = 241 / 1 = 241$ кг водяного конденсату.

3. Продукт розливають у флакони $\varnothing 22$ мм по 8,37 мл, кількість флаконів $N_{\text{фл}} = 30221$. З таблиці 9.3. Вибираємо ліофілізатора GLZY-B тип 15 - ємкість конденсатора – $W_{\text{кон}} = 320$ кг при визначеному $W_{\text{с}} = 243$ кг. Максимальна

кількість ампул \varnothing 22 мм - 33 600 фл. при визначеному 30 221.

Таблиця 7.3

Фармацевтичний ліофілізатор GLZY-B (CIP)

Параметри		Од. виміру	Тип ліофілізатора							
			10	13	15	20	25	30	40	50
Ефективна площа полки		м ²	9,72	12,96	16,1	19,67	25	31,5	42	51
Ємкість конденсатора		кг	200	260	320	400	500	600	800	1000
Кількість ампул	\varnothing 16мм	тис.од.	38,95	51,25	65,6	83,16	102,5	118,9	164,0	205,0
	\varnothing 22мм	тис.од.	19,95	26,25	33,60	42,90	52,50	60,90	84,00	105,0
Загальна ємкість усіх піддонів для рідини		л	200	260	300	400	500	600	800	1000
Максимальна висота шара рідини		мм	20,6	20,6	20,6	20,6	20,6	20,6	20,6	20,6
Розміри полки	Ширина	мм	900	1200	1200	1200	1200	1490	1490	1490
	Довжина	мм	1200	1200	1490	1490	1490	1490	1990	1990
Відстань між полками		мм	100				90			
Кількість піддонів		ярус	9	9	9	11	14	14	14	17

7.3. Обґрунтування вибору класів чистоти виробничих приміщень (підготовка персоналу, дезінфікуючих засобів, повітря)

7.3.1 Вибір класів чистоти виробничих приміщень.

Виробництво готових лікарських форм для ін'єкцій вимагає створення спеціальних асептичних умов. Поняття «асептика» включає комплекс заходів, які дозволяють звести до мінімуму можливість проникнення мікроорганізмів у лікарські препарати на всіх етапах технологічного процесу[96].

Чисті приміщення, як частина будівельних конструкцій є складовою технологічних приміщень різних виробництв. Чистим приміщенням або чистою кімнатою називають приміщення, в якому концентрація аерозольних частинок і, за необхідністю, число мікроорганізмів у повітрі підтримуються у визначених межах.

Для виробництва лікарських препаратів можна, як правило, виділити чотири типи зон:

Клас А. Локальні зони для операцій з високим ступенем ризику, наприклад, зони наповнення, закупорки, вскривання ампул, здійснення з'єднань в асептичних умовах. Як правило, такі умови забезпечуються робочою зоною з ламінарним потоком повітря. Системи ламінарного потоку повітря повинні забезпечувати однорідну швидкість повітря $0,45 \text{ м/с} \pm 20\%$.

Клас В. Для випадку асептичної підготовки і наповнення - простір, що оточує зону типу А.

Клас С та Д. Чисті зони для виконання менш відповідальних етапів виробництва стерильних продуктів та для виробництва нестерильних продуктів[97].

Враховуючи вище наведену інформацію, розділяємо стадії отримання Десфералу відповідно до класів чистоти в яких вони будуть проводитись. Всі процеси від надходження культуральної рідини до стерилізації розчину метансульфонату дефероксаміну, будуть проходити в класі чистоти D, оскільки всі ці операції є закритими і ризик контамінації мінімальний.

В зоні класу А буде відбуватись шприцеве наповнення флаконів самого автомату, їх закривають гумовими пробками. Ці флакони через шлюзи передають в зону класу В до автомату, що здійснює розлив розчину у первинну упаковку (флакони). Тут же відбувається закупорювання пробками, що будуть пропускати вологу під час ліофільного висушування. Оскільки під час розливу існує великий ризик контамінації, то всі ці операції будуть проводитись саме в класах високої чистоти.

Подальші етапи ліофільного висушування розчину метансульфонату у флаконах, закриття флаконів гумовими пробками, обкатки флаконів алюмінієвими корками та пакування у вторинну упаковку, будуть проводитись в зоні класу чистоти D, оскільки не потребують високої стерильності.

7.3.2 Вибір дезінфікуючих та мийних засобів.

Біомой. Одним із досить відомих мийних засобів, що використовується для достерилізаційного очищення є Біомой. Виробник НВ ТОВ «Фармакос»

(Україна). Діюча речовина в складі засобу – це алкілбензосульфат натрію – 5,0 – 8,0 %. Біомой це світлий порошок, що володіє гарними змочувальними, емульгувальними та мийними властивостями. Засіб належить до мало небезпечних при потраплянні на шкіру. (IV клас безпеки). Робочий розчин готують за рахунок розчинення порошку у воді питній [98].

Рекомендована концентрація робочого розчину 0,15-0,3 % для циркуляційного миття обладнання, комунікацій, тари. Температура робочого розчину має бути $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ [99].

Для того, щоб приготувати 1 л 0,3 % робочого розчину треба до 3 г препарату додати 997 мл води. Робочий розчин використовують протягом доби, якщо не відбувається зміна його кольору [98].

Кальцинована сода. Ще одним добре відомим мийним засобом є кальцинована сода. Розчин кальцинованої соди, температура якого $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$, володіють добрими мийними властивостями, видаляють жир та руйнують білки. Кальцинована сода відноситься до помірно небезпечних речовин (III клас безпеки). Може подразнювати шкіру та слизову оболонку.

Використовують 0,5 % розчин кальцинованої соди температурою $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$ для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю. Для циркуляційного миття обладнання та комунікацій застосовують розчини концентрацією 1-2 %, температура яких повинна становити $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Викликає корозію алюмінію.

Каустична сода. Розчин соди, концентрацією 1-2% володіє мийними властивостями, руйнує жири, білки та вуглеводи. Єдиною умовою має бути висока температура розчину. Каустична сода відноситься до високонебезпечних сполук (II клас безпеки). Викликає опіки, якщо потрапляє на шкіру, також подразнює слизові оболонки та верхні дихальні шляхи.

Робочі розчини (0,5% при температурі $45 \pm 5^{\circ}\text{C}$) застосовують для ручного миття технологічного обладнання та інвентарю. Розчини більшої

концентрації 1-2% при температурі $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$ використовують для циркуляційного миття обладнання. Викликає корозію алюмінію[99].

Хлорантоін. Даний засіб використовується в якості дезінфікуючого засобу, а також для достерилізаційного очищення. Виробник НВ ТОВ «Фармакос» (Україна). Діюча речовина – дихлорантин – 21,5 – 23,5 %.

Хлорантоін має добрі мийні властивості, його застосовують для миття різних поверхонь (меблі, вікна, стіни, підлога, двері, обладнання) та інвентарю. Засіб не пошкоджує об'єкти при обробці. Відноситься до малонебезпечних речовин (IV клас безпеки). Володіє такими властивостями: бактерицидна, віруліцидна, спороцидна та фунгіцидна.

Робочі розчини застосовують у концентрації 0,2 % при кімнатній температурі. Ними протирають всі поверхні і витримують 30 хв. Після цього поверхні змивають водою. Для приготування робочого розчину об'ємом 1 л розводять 2 г порошку в 998 мл води питної. Розчин, який не використали, можна зберігати 3 доби у щільно закритій тарі[100].

Мікробак форте. Засіб належить до дезінфекційних. Випускається у вигляді рідкого концентрату. Діюча речовина – бензил С12-18-алкілдиметиламоній хлорид - 18,6-21,2 %; N-(3-амінопропіл)-N-додецилпропан-1,3- діамін - 4,5-5,5 %. Виробник Німеччина, фірма «BODE Chemie GmbH». Розчин має добрі мийні властивості, видаляє жири, білки та інші органічні забруднення. Засіб використовують для дезінфекції різних поверхонь (вікна, підлога, стіни, обладнання) та інвентарю шляхом протирання. Не пошкоджує об'єкти та не викликає корозію. Володіє такими властивостями: бактерицидна, віруліцидна та фунгіцидна. Відноситься до малонебезпечних речовин (IV клас безпеки).

Робочий розчин готують концентрацією 0,25%. Для цього один дозований пакет на 20 мл розчиняють у 8 л води. Термін зберігання розчину 14 діб. Тара має бути щільно закрита [101].

Гембар. Належить до дезінфікуючих засобів тривалої дії (від 7 днів і більше). Випускається у вигляді рідкого концентрату. Діюча речовина –

полігексаметиленгуанідін гідрохлорид - 25,0%. Засіб використовують для дезінфекції різного обладнання, інвентарю, поверхонь. Відноситься до малонебезпечних речовин. (IV клас небезпеки). Володіє такими пролонгованими властивостями: бактерицидна, віруліцидна та фунгіцидна[102]. Робочі розчини готують концентрацією 0,5 %[99]. Вони можуть зберігатись до 6 місяців [102].

Отже, враховуючи характеристики всіх засобів, їх витрати та ціни можна зробити наступні висновки. В якості миючого засобу для циркуляційного миття обладнання із трьох розглянутих варіантів, найбільш доцільно буде обрати кальциновану соду. Цей засіб є досить ефективним та найдешевшим.

Для миття та дезінфекції різних поверхонь, обираємо хлорантоїн, оскільки цей засіб дешевший, ніж мікробак форте. Він підходить для миття та дезінфекції всіх поверхонь, а також крім бактерицидних, віруліцидних, фунгіцидних властивостей володіє ще й спороцидною, на відміну від мікробак форте.

Підлога – це поверхня, що підлягає постійному контакту з можливим джерелом забруднення (людиною), тому для миття та дезінфекції підлоги обираємо гембар, оскільки він проявляє пролонговану дію. Це дозволяє підтримувати чистоту протягом тривалого часу без необхідності постійної обробки поверхні.

Таблиця 7.4

Узагальнена характеристика витрат мийючих та дезінфікуючих засобів для виробництва десфералу

Назва засобу	Об'єкт миття та/або дезінфекції	Концентрація робочого розчину, %	Вартість 1 л/кг мийного або дезінфікувального засобу, грн	Вартість 1 л/кг робочого розчину мийного або дезінфікувального засобу, грн
Біомой	Обладнання, інвентар, комунікації	0,3	266 ¹	0,8
Кальцинована сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2	28 ²	0,56
Каустична сода	Обладнання, інвентар, комунікації	2	54 ³	1,08
Хлорантоїн	Поверхні, стіни, вікна, двері	0,2	340 ⁴	0,68
Мікробак форте	Поверхні, стіни, вікна, двері	0,25	523 ⁵	1,3
Гембар	Підлога	0,5	516 ⁶	2,6

Примітка:

- https://mydez.com.ua/ua/p1193047158-biomoj.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiAhKycBhAQEiwAgf19emMCmtl38vsKVUpG5Y8YCyVQ526CUmoevTazA_iXR0SSKnJA5TjQUhoCZTUQAvD_BwE
- https://snabhim.com.ua/soda-soda-kalcinirovannaya-marka-a?gclid=CjwKCAiAhKycBhAQEiwAgf19eh9wRBRs244rbsRvasA3fVhg91IeZiUYmn1WF8f-e-bfdYt0I0eXJxoCTn0QA vD_BwE
- https://klebrig.com.ua/ua/p1674876334-kaltsinirovannaya-soda-25kg.html?source=merchant_center&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Perf_Max-Turboweb&gclid=CjwKCAiAhKycBhAQEiwAgf19e130lbCTejXqa7bH0lZvGu z2oIzEBJ4r_ft3F8PrmgZOwlarbCAz_xoCth8QA vD_BwE
- <https://oazistd.all.biz/uk/hlorantoyin-g24691549>
- https://allhim.kh.ua/p334833632-mikrobak-forte.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiAhKycBhAQEiwAgf19ei4F3gFcBg7SlsfbOGkmdxkKFUREFfOt3daxVJE7_GWoe1p_6jleRoCeaYQAvD_BwE
- https://spilna-meta.com.ua/ua/p257133652-dezinfitsiruyushee-sredstvo-gembar.html?gclid=CjwKCAiAhKycBhAQEiwAgf19evlsJfDYxh1Xp8i9eQu6M24cEUqiGTeqOWqeP3rCsWfi-t7m19e6GBoCe3YQAvD_BwE

Ціни наведені станом на 03.12.2022

7.3.3 Підготовка вентиляційного повітря.

В чистих зонах необхідно підтримувати належну чистоту, що регламентується вимогами GMP, а повітря, що до них подається, повинно проходити очищення через фільтри відповідної ефективності[96].

Величезне значення для одержання вентиляційного повітря належної якості має злагоджена робота усієї системи підготовки вентиляційного повітря, яка включає систему фільтрів для ступінчатого омиття повітря, системи підігріву і охолодження повітря, системи зволоження і осушення повітря, системи контролю тиску і швидкості повітряного потоку[97].

Як правило забір повітря проводиться з атмосфери (ззовні) за допомогою трубчастих конструкцій висотою 8-10м. Труба розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю. Очистка ведеться з початку при заборі повітря. Повітря проходить крізь решітку встановлену у повітропроводі для видалення крупних механічних часток – листя гілки та ін.

Попередня очистка повітря від механічних контамінантів має своєю метою видалення аерозольних механічних часток та попередження абразивного пошкодження компресійної апаратури. Для виконання цієї операції використовують фільтри попередньої очистки. Вони встановлюються у всмоктуючій лінії перед компресором або вентилятором. Вони дозволяють видалити частки розміром більше 5мкм. Таке очищення дозволяє позбутися пилу, крапель вологи та частково мікроорганізмів. Як правило коефіцієнт проскоку складає 10% від загального вмісту твердої фази (пилу).

Вибір фільтрів попередньої очистки здійснюється з двох типів фільтрів: сухі та масляні. У підготовці технологічного вентиляційного повітря масляні фільтри небажані. В якості фільтруючого матеріалу можна використовувати пінополіуритан, скляне або хімічне волокно та інші неткані матеріали. Ці фільтри вільні від недоліків масляних фільтрів – запах, втрата масла.

Атмосферне повітря попередньо очищене від абразивних часток пилу, транспортують до споживача. Транспортування повітря супроводжується

його компримуванням (стисканням) і направленням у систему повітропостачання.

Ця стадія необхідна для того, щоб забезпечити належний об'єм подачі і відповідний до технологічних вимог тиск повітря. Нагнітання повітря здійснюється за допомогою вентиляторів[103].

Вентилятори здійснюють забір повітря та створюють необхідний тиск для проходження всієї системи підготовки повітря. Наступним етапом є кондиціонування повітря, що складається з першого підігріву, охолодження, другого підігріву та зволоження парою. Далі відбувається фільтрування повітря від часток за допомогою системи фільтрів. HEPA фільтр є ключовою ланкою системи, від якої залежить ефективність роботи всієї повітроочисної станції. Ефективне використання HEPA фільтрів можливо тільки за умови тріступінчатої (щонайменше) фільтрації повітря, що подається, де кожний із ступенів вирішує свою специфічну задачу:

Перший ступінь фільтрації захищає систему підготовки повітря від забруднень, що містяться в зовнішньому (атмосферному) повітрі, що подається в блок підготовки повітря.

Другий ступінь фільтрації забезпечує чистоту приточувань повітроводів від забруднення і розташовується як останній елемент системи підготовки повітря.

Третій ступінь – саме HEPA фільтр, що забезпечує чистоту повітря, яке поступає безпосередньо в приміщення.

Фільтрування припливного повітря має бути ступінчатим. Кількість рівнів фільтрування обумовлюється необхідною чистотою повітряного середовища приміщення. Для підтримки належного ступеня чистоти вентиляційне повітря повинне проходити очищення з використанням фільтрів відповідної ефективності. Для приміщень (зон), що відносяться до класів чистоти А, В, С, D запропонована щонайменше трьохступенева система очищення.

У чистих приміщеннях класу А/В використовується однонаправлений (ламінарний) потік повітря. Приміщення менш чисті класу С і D - це приміщення з неоднонаправленим потоком. Найбільше широко застосовуються чисті приміщення з вертикальним потоком повітря, що йде від стельових HEPA фільтрів до витяжних отворів у підлозі або стінах [97].

7.3.4 Підготовка персоналу.

Робочий персонал бере активну участь в виробничому процесі, тому необхідно проводити навчання персоналу та періодичну перевірку знань. Навчання проводяться 1 раз на 6 місяців та позапланово при введенні в роботу нового обладнання, при нововведеннях у технології [104].

У чистих зонах, де ведеться технологічний процес в асептичних умовах, діяльність персоналу повинна бути мінімальною, а його пересування - методичним і контрольованим, щоб уникнути надмірного виділення частинок та мікроорганізмів, обумовленого посиленою руховою активністю.

Для підготовки персоналу існують спеціальні приміщення – кімнати перевдягання. Вони служать для того, щоб персонал зміг підготуватись до входу у чисте приміщення і виходу з нього. У них надягається передбачений інструкцією одяг, проводиться миття рук та ін. Кімната перевдягання виконується як повітряний шлюз. Оснащення кімнати перевдягання залежить від класу приміщення, у яке вона веде. У той же час кімната перевдягання має загальні ознаки. Вона звичайно розділяється на три зони:

- *зона входу* в кімнату, де відповідно до регламенту персонал повинен знімати і залишати одяг та особисті речі, які не допускається вносити в чисте приміщення, тут миються і сушаться руки і т.д.;
- *перехідна зона*, у якій надягається одяг для чистого приміщення, у цій зоні звичайно встановлюється *поперечна лавка*, яка слугує фізичним і психологічним бар'єром при переодяганні;
- *зона виходу*, де проводиться остаточна перевірка перед входом у чисте приміщення, у стерильному виробництві тут надягаються стерильні рукавички[97].

Оскільки персонал є можливим джерелом забруднення, він повинен дотримуватись правил особистої гігієни згідно виробничих інструкцій, бути забезпечений чистим робочим одягом та одягати його протягом нормованого часу для того, щоб знизити ризик контамінації.

Також, для гарантування безпеки продукції повинен бути прийнятий до уваги імунологічний статус персоналу [104].

В асептичному блоці не дозволяється носити наручні годинники та ювелірні прикраси. Необхідно, щоб технологічний одяг персоналу відповідав процесу і класу робочої зони, а також захищав продукцію від контамінації. Одяг необхідного класу зазначений нижче.

Клас D: волосся повинне бути закрите, вдягають звичайний технологічний одяг і відповідне взуття чи бахіли. Необхідно вжити всіх заходів для запобігання будь-якої контамінації чистої зони ззовні.

Клас C: волосся повинне бути закрите, вдягають комбінезон або брючний костюм, який щільно прилягає до зап'ясток і має високий комірець, а також відповідне взуття чи бахіли. Одяг повинен бути виготовлений з тканини, з якої не повинні відокремлюватися волокна чи частинки.

Клас A/B: головний убір повинен повністю закривати волосся і бути прикріпленим до комірця костюму, на обличчі необхідно носити маску для запобігання поширення крапель, на руках — простерилізовані й не посипані тальком гумові чи пластикові рукавички, на ногах — простерилізовані чи продезінфіковані бахіли, при цьому нижні краї брюк повинні бути заправлені у бахіли, а рукави одягу — в рукавички. Із технологічного одягу не повинні відокремлюватися волокна чи частинки, він має затримувати частинки, що відділяються від тіла співробітника.

Повсякденний одяг забороняється вносити в кімнати для переодягання, що ведуть до приміщення асептичної асистентської. Кожен робітник у зоні асептичного блоку має бути забезпечений чистим стерильним (простерилізованим або таким, що пройшов відповідну санітарну обробку) технологічним одягом для кожної зміни або принаймні на один день, якщо це

виправдано результатами контролю. Рукавички під час роботи потрібно регулярно дезінфікувати. Маски і рукавички необхідно змінювати принаймні кожну зміну.

Одяг для чистих приміщень необхідно очищати і запобігати його додатковому забрудненню, що може стати причиною контамінації. Ці роботи необхідно виконувати відповідно до чинних інструкцій. Неправильна обробка одягу пошкоджує волокна тканини, що підвищує ризик відокремлення її частинок[105].

7.4. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Одним з основоположних елементів забезпечення якості стерильної продукції є її виробництво відповідно до правил Належної виробничої практики (GMP). Основні принципи і вимоги повинні бути реалізовані в ході технологічного процесу виробництва лікарських засобів для ін'єкцій з метою звести до мінімуму ризик контамінації мікроорганізмами, частинками і пірогенними речовинами. Саме тому необхідно ретельно підготувати первинну упаковку, оскільки через її нестерильність може відбутись контамінація готового лікарського засобу[96].

Відповідно до розділу 4, в якості первинної упаковки виступають скляні флакони, гумові корки зі спеціальної гуми, а також алюмінієві ковпачки для обкатки корків.

Підготовка флаконів. Миття флаконів є досить відповідальною стадією. Вона складається із зовнішнього і внутрішнього миття. Миття відбувається на спеціальних лініях для мийки.

Зовнішнє миття. Для зовнішнього миття флаконів застосовується напівавтомат типу АП-2М2 Маріупольського ЗТО. Напівавтомат являє собою апарат із кришкою, в який на підставку, що вільно обертається, установлюється касета з флаконами. Над касетою розташований розпилувальний пристрій, через який на флакони подається фільтрована гаряча вода. Під дією струменів води касета обертається, завдяки чому досягається рівномірне миття.

Внутрішнє миття. Внутрішнє миття флаконів здійснюють такими способами: вакуумним, термічним, ультразвуковим і віброультразвуковим, шприцевим.

Найбільш поширений у вітчизняній технології — **вакуумний спосіб миття**. Проте простий вакуумний спосіб миття, малоефективний, тому що не може забезпечити необхідної чистоти флаконів.

Термічний спосіб миття флаконів має певні недоліки. Зокрема це відносно низька швидкість видалення води з флаконів і складне апаратурне оформлення.

Технологія **шприцевого миття** ампул, що широко застосовується за кордоном, також не забезпечує високої якості їхньої очистки, хоча в нашій країні метод не втратив свого значення, зокрема, для промивання великомістких ампул.

Суть методу полягає в тому, що флакони під тиском обробляються водою, парою та повітрям за допомогою шприців. Флакони знаходяться в положенні горловиною вниз. Однак велика кількість шприців ускладнює конструкцію машин, а також вимоги до форми і розмірів ампул. Продуктивність цього способу невелика. З метою підвищення ефективності його поєднують з ультразвуковим.

Ультразвуковий спосіб миття, має певні переваги перед іншими, крім високої ефективності видалення міцно утримуваних забруднень (головним чином частинок скла), є можливість відбракування флаконів з мікротріщинами, які під дією ультразвуку руйнуються. Позитивною є також бактерицидна дія ультразвукових коливань. Миття ультразвуковим способом відбувається таким чином. Флакони в касетах заповнюють гарячою водою в апараті вакуум-мийного напівавтомата, розташували їхні капіляри над магнітострикційними перетворювачами. Відстань капілярів, занурених у воду від випромінювачів, — 10 мм. Потім подачею фільтрованого повітря гаситься вакуум, і вода у вигляді турбулентного потоку мие флакони і заповнює їх. У цей час автоматично включається генератор ультразвуку, і при озвучуванні

відбувається швидко і повне видалення води із забрудненнями з ампули. Залежно від рівня забруднення цикли повторюються декілька разів. Незважаючи на ефективність ультразвукового способу миття, проблема видалення рідини і виносу з порожнини флаконів завислих у ній частинок залишається як і раніше актуальною.

За станом розвитку техніки на сьогодні найбільше прийнятним технічним рішенням високоякісного очищення флаконів є поєднання ультразвукової обробки вібраційним способом. **Віброультразвуковий спосіб миття** флаконів відбувається у турбовакуумному апараті, на дні якого закріплюється генератор ультразвуку. Касета з флаконами поміщається на підкасетник, і в апараті виконуються всі операції ультразвукового способу разом із механічною вібрацією. Брак при цьому способі досить низький.

Отже найбільш ефективним способом миття флаконів є віброультразвуковий спосіб [106].

Після миття флакони ополіскують очищеною водою. Наступний етап підготовки – це висушування та стерилізація. Для цього використовують стерилізаційні тунелі. Принцип роботи такого тунелю полягає в тому, що після миття флакони за допомогою транспортерів надходять в тунель, де вони проходять через ламінарний потік стерильного повітря. Тунель розділений на три зони: сушки, стерилізації і охолодження. Температура в зоні стерилізації 360 °С, а на виході 23 °С. Повітряний потік проходить двоступінчасте очищення. Ступінь очищення повітря в другому ступені від частинок з розміром більше або рівним 0,3 мм складає 99,97 %. Нагрів повітря в зоні сушки і стерилізації здійснюється тенами зі спеціальною обробкою поверхні, щоб уникнути утворення окаліни[96].

В якості апаратів для стерилізації виступають камера Крупіна, тунельний стерилізатор «Пірокленз» (Нідерланди), установка сушильної стерилізації LAS (Данія) [107].

Підготовка закупорювальних засобів. В якості закупорювальних засобів виступають гумові корки зі спеціальної гуми та металеві алюмінієві

ковпачки. Їх підготовка включає миття та стерилізацію, з метою видалення механічних забруднень, гумової крихти та для досягнення стерильності.

Підготовка гумових пробок. Для підготовки пробок використовуються промислові пральні машини і казани (для кип'ятіння пробок). Процес миття складається з кількох етапів. Спочатку пробки та ковпачки обполіскують проточною водою питною. Далі їх кип'ятять в 1% розчині натрію гідрокарбонату протягом 30 хв. Промивають водопровідною водою 1 раз та обполіскування водою очищеною 2 рази. Далі проводять стерилізацію. Пробки поміщають в скляні або емальовані ємності, заливають очищеною водою, закривають і витримують в паровому стерилізаторі при температурі 120 °С протягом 60 хв., воду після цього зливають, і пробки ще раз промивають очищеною водою. Після обробки пробки стерилізують у біксах у паровому стерилізаторі при температурі 120 °С протягом 45 хв. Стерильні пробки зберігають у закритих біксах не більше 3 діб. Після розкриття біксів пробки повинні бути використані протягом 24 годин.

Підготовка алюмінієвих ковпачків. Алюмінієві ковпачки, які використовуються разом з гумовими пробками при закупорюванні флаконів і пляшок, обробляються таким чином. Алюмінієві ковпачки витримують 15 хв. в 1% або 2% розчині мийного засобу, підігрітому до температури 75 °С, потім розчин зливають і ковпачки промивають проточною водопровідною водою. Чисті ковпачки сушать у повітряному стерилізаторі в біксах при температурі 55 °С. Зберігають у закритих ємностях (біксах, банках, коробках) в умовах, які виключають їх забруднення[105].

7.5. Обґрунтування вибору підготовки води

Невід'ємною частиною виробництва будь-якого підприємства фармацевтичної промисловості є підготовка різних типів води. Це обумовлено широким спектром напрямків застосування води. В залежності від характеру конкретного виробництва (форми готової продукції) на фармацевтичному підприємстві можуть використовуватися різні типи води [97].

Під час виробництва Десфералу використовують воду очищену та воду питну.

Вода питна. Всі підприємства використовують воду питну, джерелом якої є природна вода, важливим, але не обов'язковим елементом технології є звільнення її від присутніх домішок. Природна вода містить наступні домішки: розчинені тверді компоненти (неорганічні солі, іони кальцію, магнію, натрію, хлору, іони сірчаної і вугільної кислот); гідросуспензії; мікроорганізми; колоїдні речовини; мікрочастинки (пил, іржа, пірогенні речовини). Кількість домішок природної води залежить від джерела води і може змінюватися в різні періоди року.

Вимоги до всіх видів води, що використовуються у фармацевтичному та біотехнологічному виробництві регламентовані НТД. В тому числі і вимоги до води питної.

Значна частина небажаних речовин видаляється на стадії одержання питної води, яка може постачатися з міської мережі або її джерелом може бути природна вода з артезіанських свердловин.

Для одержання води фармакопейної якості необхідно проводити обробку води питної яка поступає на підприємство. При цьому вода питна повинна бути безпечна в епідемічному відношенні, нешкідлива по хімічному складу та мати добрі органолептичні властивості. За мікробіологічними показниками вода питна повинна відповідати вимогам НТД.

Вимоги до води питної включають:

1. безпечність в епідеміологічному відношенні;
2. безпечність хімічного складу;
3. сприятливі органолептичні показники;
4. радіаційну безпечність.

Вода питна застосовується для господарсько-побутових цілей і використовується в технологічному процесі у випадках, коли процес проводиться в нестерильних умовах і використання води на даній стадії

допускається НТД. Однак вона є джерелом для отримання води всіх інших типів.

Вода очищена. Для вибору обладнання та установок для підготовки води фармакопейної якості потрібен вибір способу очистки. Сучасна практика виробництва орієнтована на застосування двох основних способів водопідготовки у відповідності з якими воду очищену отримують методом дистиляції або мембранного розділення демінералізованої води в дистиляційних апаратах різних конструкцій або в баромембранних апаратах.

Воду очищену одержують із води питної дистиляцією, іонним обміном або будь-яким іншим підходящим способом.

Під час виробництва і подальшого зберігання належним чином контролюють і відстежують загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів. У нормальних умовах підходящою межею, що вимагає вживання заходів, є вміст 100 життєздатних аеробних мікроорганізмів в 1 мл. Визначення проводять методом мембранної фільтрації, використовуючи густе поживне середовище 5. Інкубацію проводять при температурі від 30 °С до 35 °С протягом 5 діб.

Для отримання води очищеної застосовуються послідовні багатоступеневі схеми. При виборі конкретної схеми необхідно враховувати результати аналізу вхідної води і устаткування, що мається в наявності. Головне, щоб в результаті отримана вода відповідала вимогам чинних нормативних документів. Питома електропровідність води очищеної складає 0,260 $\mu\text{S}/\text{cm}$ або $(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-6} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Схема отримання будь-якого типу води, а також будь-які зміни в ній повинні пройти валідацію.

В промисловості використовують 3 типових рішення формування технологічних схем отримання води очищеної.

Варіант 1. Схема включає наступні процеси:

- груба фільтрація;
- пом'якшення води;

- фільтрація через вугільний фільтр;
- дистиляція.

При виборі схеми 1 потрібно великі капітальні витрати. Витрата енергоносіїв значно більше, ніж в інших варіантах. Він може бути доцільний у разі, якщо підприємство вже має в наявності вільний дистилятор і достатню кількість промислової пари.

Варіант 2. Схема включає наступні процеси:

- груба фільтрація;
- пом'якшення води;
- фільтрація через вугільний фільтр;
- деіонізація.

При виборі схеми 2 потрібно найменші капітальні витрати. Витрати енергоносіїв невеликі.

Варіант 3. Схема включає процеси:

- груба фільтрація;
- пом'якшення води;
- фільтрація через вугільний фільтр;
- фільтрація через фільтр з діаметром отворів 3 мкм;
- зворотний осмос
- електродеіонізація.

Схема 3 найбільш оптимальна та найбільш повна. При цьому не потрібно великі капітальні витрати. Устаткування не вимагає частої регенерації. Експлуатаційні витрати невисокі. В результаті отримують воду високої якості.

Зберігання води очищеної. Воду очищену зберігають в закритих місткостях, виготовлених з матеріалів, що забезпечують збереження властивостей води в межах вимог чинних нормативних документів і що захищають її від контамінації. Матеріалами місткості для зберігання води очищеної можуть бути поліпропілен тефлон, нержавіюча сталь AISI 316 або інші інертні матеріали.

На стадіях зберігання води очищеної і води високоочищеної також використовуються УФ-лампи, стерильні фільтру (для очищеної) і генератор озону (якщо вимагається) [103].

7.6. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

Багато сидерофорів є поліпептидами, які синтезуються нерибосомальними пептидними синтетазами (NRPS), які також відповідають за біосинтез більшості мікробних пептидних антибіотиків. З іншого боку, деякі бактеріальні сидерофори не є поліпептидами, а натомість вони збираються з дикарбонових кислот, які чергуються з діамінових або аміноспиртових будівельних блоків (які, тим не менш, є похідними амінокислот), з'єднаних амідними або ефірними зв'язками. До таких сидерофорів відноситься дефероксамін [108].

Дефероксамін – (N - [5 - { 3 - [(5 – амінопентил) оксикарбамоїл] - пропіонамідо } пентил] - 3 - { [5 - (N-оксиацетамідо) пентил] карбамоїл } - пропіонгідроксамова кислота) – це низькомолекулярний сидерофор природного походження, до складу якого входить одна аміногрупа та три гідроксамові групи [4, 81].

Сидерофори належать до вторинних метаболітів [109]. Дефероксамін виділяється клітинами в культуральну рідину [61].

До складу препаратату Десфералу у якості субстанції входить дефероксамін метансульфонат [79].

Нижче наведено етапи, які необхідно провести для виділення дефероксаміну В (ДФОВ) з культуральної рідини і отримання дефероксаміну метансульфонату.

1.1 Відділення біомаси

Оскільки дефероксамін є екзометаболітом, то першим етапом його виділення є відділення клітин *Streptomyces pilosus* від культуральної рідини. Культура *Streptomyces pilosus* – це рід ниткоподібних грампозитивних аеробних бактерій, які зустрічаються в ґрунті. Вони утворюють ниткоподібну сітку, яку називають міцелієм [110].

Для відділення міцелію, як правило, використовують фільтрування та центрифугування.

У виробництвах, де цільовим продуктом є один з метаболітів, розчинений в культуральній рідині, для відділення клітин біомаси від розчину найчастіше використовують процес фільтрування. Установки для фільтрування характеризуються більшою продуктивністю та меншою вартістю в порівнянні з іншими способами відділення біомаси.

Для інтенсифікації процесу використовують фільтри з намивним шаром допоміжного матеріалу фільтрації (ДМФ), найчастіше перліт або діатоміт, який намивають на фільтрувальну тканину перед початком фільтрації культуральної рідини. Він захищає пори фільтрувальної тканини від закупорювання, збільшуючи тим самим швидкість фільтрації. Крім того, даний спосіб фільтрування обирають, коли продуктом для подальшої переробки є фільтрат, а не біомаса. Оскільки міцелій біологічного агента відноситься до такого типу осадів, використовуємо процес фільтрування з ДМФ.

Для відділення біомаси від культуральної рідини обираємо фільтр-прес з намивкою фільтрперліту [97].

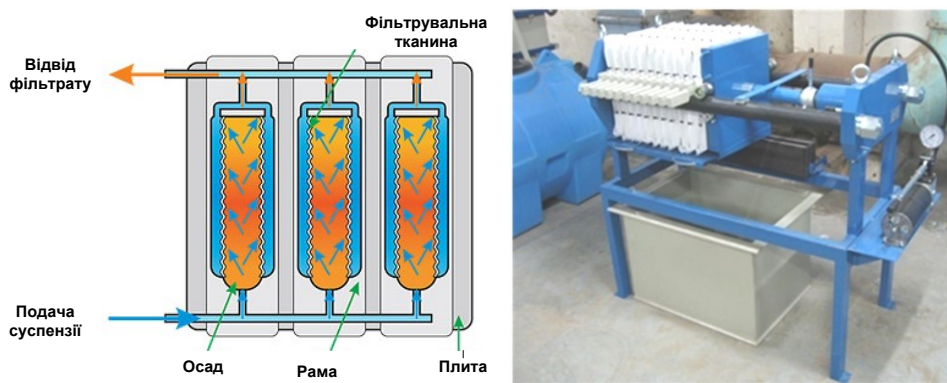


Рис.7.1. Схема роботи та конструкція фільтр-пресу

1.2 Іонообмін

Іонообмін використовують для виділення речовин, що є достатньо сильними електролітами і ті що дисоціюють у водному середовищі з утворенням багатозарядних іонів.

Незалежно від механізму розділення – адсорбції, іонообмін, технологія очищення практично однакова. На даному етапі іонообмін використовують для зв'язування частини забруднюючих домішок, білків, які є присутні у фільтраті та проводять демінералізацію. При елюванні значна частина забруднень сходять з колонки до появи фракцій, які містять діючу речовину, при тому, в порівнянні з фільтратом, розчин є більш концентрованим. Для іонообміну використовують катіонообмінну смолу LEWATIT CNP 80 у аміачній формі. Вибір катіонообмінної смоли пов'язано з тим, що у разі негативного заряду ліганда, який пов'язаний з білком, елюцію слід проводити із катіонообмінника. Елювання проводять соляною кислотою, в результаті чого дефероксамін переходить в хлоридну форму.

Перевагою цього методу є простота апаратного оформлення і відсутність потреби в органічних розчинниках, недоліки — значна тривалість процесу і необхідність регенерації сорбентів[97, 111].

1.3. Концентрування елюату

Необхідність проведення даного процесу визначається низькою концентрацією дефероксаміну в культуральній рідині і відповідно у нативному розчині після відділення біомаси, що не дозволяє в подальшому виділити та очистити дефероксамін шляхом кристалізації.

Для концентрування елюату, методи, якими найчастіше користуються це концентрування вакуум-випаровуванням та ультрафільтрацією.

Вакуум-випарні установки є досить високопродуктивними, але вони мають ряд значних недоліків (наприклад випадання осадів, значні витрати грючої пари), тому цей метод все частіше замінюється на менш енерговитратний – ультрафільтрацію[112].

Ультрафільтрація – це процес мембранного розділення високомолекулярних та низькомолекулярних сполук в розчинах, а також фракціонування і концентрування високомолекулярних сполук, шляхом пропускання розчину через мембрану з середнім розміром пор 0,1 мкм. Даний процес протікає під дією різниці тисків до і після мембрани.

Якщо домішки мають невелику молекулярну масу, ультрафільтрація може використовуватися для отримання концентрату чистого продукту. Тоді ультрафільтрація є аналогом діалізу, але менш трудомістким процесом і більш економічним за часом. Як правило, високо проникливі ультрафільтраційні мембрани дозволяють проводити очищення в 10-100 разів швидше, ніж при аналогічному процесі діалізу[113].

Ультрафільтрація має наступні переваги: відсутність температурних, механічних і хімічних дій на продукт, що переробляється; простота апаратурного оформлення, відсутність рухомих деталей, компактність установки; низька енергоємність процесу; можливість забезпечення герметичності і асептики процесу, збільшується вихід готового продукту та поліпшується його якість, скорочується число стадій технологічного процесу при виробництві[97].

Також відпадає необхідність у хімікатах, досягається висока ступінь розділення, що дозволяє повторно використовувати розділені фази, процес не залежить від стабільності вихідного розчину, а також від роду і концентрації присутніх у ній електролітів;

Елюат після іонообміну складається з водного розчину високомолекулярних речовин, що містить супутні білки та сидерофор дефероксамін В (з молекулярною масою 561 а.о.м або Да.) та низкомолекулярні речовини (це переважно залишки солей як компонентів поживного середовища).

Враховуючи вище наведені переваги, найбільш ефективним методом концентрування буде ультрафільтрація, яка дозволить позбутися низкомолекулярних речовин та певної кількості води і отримати концентрат супутніх білків разом з дефероксаміном В[113].

Визначаємо діаметр пор для молекули дефероксаміну В згідно рівняння Стокса: $D_{\text{мол}} = 0,098 \times M^{0,38} = 0,098 \times 561^{0,38} = 1,09$ нм або 0,00109 мкм. (М – молекулярна маса в Да). Тоді розмір пор мембрани при $k = D_{\text{мол}}/D_{\text{пор}} = 1$ має становити 1 нм (0,001 мкм).

Для цього використовуємо полісульфонамідні мембрани з середнім розміром пор 1 нм та продуктивністю по дистильованій воді, $V_0 = 15 \text{ дм}^3/\text{м}^2 \cdot \text{год}$ [114].

На практиці застосовують модулі мембрани пластинчастого, трубчастого, рулонного типів, а також апарати з мембранами у вигляді порожнистих волокон. Компактність фільтрувального блока (відношення поверхні фільтрування до об'єму блока) є його істотною характеристикою:

<i>Тип апарата</i>	<i>Компактність, $\text{м}^2/\text{м}^3$</i>
З плоскими елементами	200
Трубчастий	100
Рулонний	1 000
Трубчастий з порожними волокнами	30 000

Вибираємо фільтрувальний блок рулонного типу. Необхідна площа фільтрації $V_{\text{ел}} = 7081 \text{ дм}^3 \cdot 8 \text{ год} / 15 \text{ дм}^3/\text{м}^2 \cdot \text{год} = 3\,776 \text{ м}^2$. Кількість модулів – 20, об'єм 1 модуля - 200 дм^3 . Фірма – Sartorius AT.

Загальний вигляд ультрафільтраційної установки рулонного типу наведено на рис.7.2.

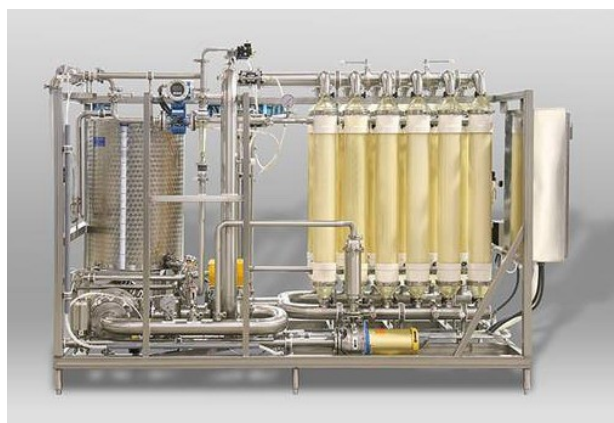


Рис.7.2. Вигляд ультрафільтраційної установки

1.4. Осадження (кристалізація) ДФОВ

Метод осадження або кристалізації з нативних розчинів застосовується для виділення речовин, здатних утворювати з деякими реагентами нерозчинні з'єднання або кристалізуватися за певних умов з водного середовища[97].

З метою подальшого виділення дефероксаміну В проводять його осадження органічним розчинником. При цьому необхідно правильно обрати розчинник для проведення даного процесу.

Органічний розчинник, що використовується для осадження, має змішуватися з водою і не зв'язуватися з сидерофором. Часто для осадження використовують саме *етиловий спирт, метанол, ацетон, ізопропіловий спирт*. При виборі розчинника, треба враховувати його токсичність та вибухонебезпечність, можливість регенерації. Найбільш ефективними розчинниками, з урахуванням цих характеристик, є метанол та етанол[111].

Однак, у зв'язку з тим, що дефероксамін В погано розчиняється в етанолі, то для подальшого використання обираємо метанол, який задовольняє вимогам для осадження[80].

Також згідно технології джерела [86] для осадження ДФОВ використовують хлоридні або сульфатні солі. Переважно це хлорид амонію, у зв'язку з його високим висолуючим (осаджувальним) ефектом, що залежить від іонної сили. Додавання хлориду амонію збільшує ефективність осадження.

При осадженні ДФОВ утворюються його кристали, що досягається проведенням процесу при низьких температурах.

Осадження проводять протягом 24 год при температурі 0 °С.

1.5. Відділення кристалів ДФОВ

В результаті осадження під дією метанолу та хлориду амонію утворюється кристалічний осад дефероксаміну, що необхідно відділити від водно-спиртового розчину. Переважно для відділення осаду використовують друк-фільтри, нутч-фільтри або фільтр–преси.

Найчастіше друк-фільтри використовують, тоді коли є необхідність фільтрувати ефірні, спиртові та інші органічні розчинники, для яких є характерною низька температура кипіння. Друк-фільтри мають досить велику фільтрувальну поверхню та продуктивність [115]. Загальний вигляд такого друк-фільтра наведено на рис.3

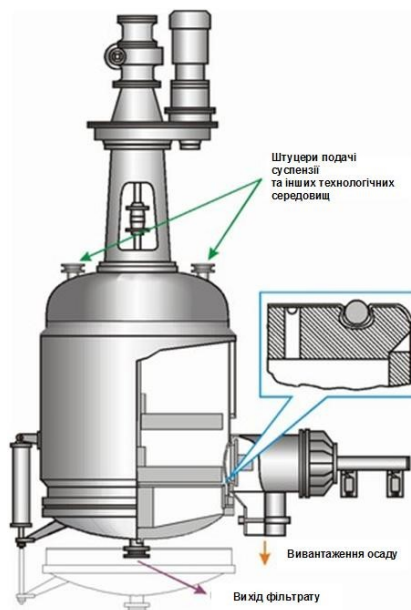


Рис. 7.3. Загальний вигляд друк-фільтра

У зв'язку з наявністю в розчині метанолу, пари якого є вибухонебезпечними, то для фільтрування обираємо друк-фільтр, що працює під надлишковми тиском ($\Delta P > P_{\text{атм}}$), і є герметичним апаратом, що дозволяє проводити захищений режим фільтрування [97].

2.1. Приготування 5% розчину неочищеного хлориду ДФОВ для його знебарвлення

Метою даної стадії є знебарвлення отриманих після фільтрації кристалів ДФОВ.

В процесі осадження (пункт 1.4) утворюються речовини, що надають забарвлення кристалам дефероксаміну В, що неприпустимо згідно з вимогами нормативно-технічної документації. Для видалення супутніх барвників та інших забруднюючих речовин, що утворюються в процесі осадження, використовують процес адсорбції барвників сорбентами. В якості сорбенту досить ефективним є використання активованого вугілля. Цей сорбент здатний видаляти різні БАР з молекулярною масою від кількох десятків до кількох тисяч дальтон (солі важких металів, опіати, алкалоїди, азотисті шлаки, нейромедіатори та інші). Ще однією перевагою вугілля є те, що відбувається оборотна фізична адсорбція, тобто речовини можуть бути

легко відокремлені від вугілля, що дозволяє проводити регенерацію і використовувати його повторно.

Для цього готують 5% розчин кристалів неочищеного хлориду ДФОВ в органічному розчиннику.

Найбільш придатними розчинниками (згідно пункту 1.4) для проведення таких процесів є метанол та етанол. Однак враховуючи погану розчинність ДФОВ в етанолі і досить високу розчинність в метанолі, то вибір розчинника для даної стадії є очевидним. Для цього готують водно-метанольний розчин з модулем 1:4.

Далі готують 5% розчин кристалів ДФОВ в герметичному реакторі з мішалкою, додають активоване вугілля до розчину (модуль: 1 кг вугілля : 23 кг ДФОВ) і проводять знебарвлення розчину[86].

2.2. Відділення активованого вугілля та інших домішок фільтруванням

В подальшому необхідно видалити активоване вугілля з домішками з розчину. Найдоцільнішим способом в даному випадку є фільтрування, оскільки установки характеризуються високою продуктивністю та нижчою ціною в порівнянні з іншими методами. Так як суспензія містить метанол, то для проведення процесу обираємо друк-фільтр, що дозволяє провести захищений режим фільтрування. Для даного процесу буде використовуватись той самий апарат, що уже застосовувався для відділення кристалів ДФОВ на стадії 1.5, тому це дає можливість скоротити кількість обладнання і відповідно зменшити грошові витрати.

2.3. Перекристалізація ДФОВ

З метою досягнення вищого ступеня чистоти проводять перекристалізацію ДФОВ.

Перекристалізація – один з найважливіших методів очищення твердих речовин як у лабораторних, так і в промислових умовах. Він ґрунтується на різній розчинності речовин залежно від температури. Отриманий насичений знебарвлений та профільтрований розчин охолоджують. При охолодженні

насиченого розчину розчинність речовини зменшується і певна частина розчиненої речовини випадає у вигляді осаду, що містить менше домішок, ніж вихідна речовина[116].

В результаті проведення перекристалізації отримують хлорид дефероксаміну В ступінь чистоти якого становить 95,6%[86].

2.4. Відділення кристалів ДФОВ

Відділення кристалів від маточного розчину після перекристалізації необхідно провести фільтрування. Для цього використовують той самий друк-фільтр, що уже згадувався вище (пункт 1.5 та 2.2), оскільки розчин містить метанол, а також з метою скорочення грошових витрат та кількості обладнання.

2.5. Сушіння кристалів ДФОВ

Для видалення залишків метанолу, що знаходяться на поверхні кристалів хлориду ДФОВ і які можуть негативно вплинути на подальший етап отримання дефероксаміну метансульфонату проводять процес висушування кристалів. Для висушування обираємо вакуум-сушильну шафу, оскільки вона дозволяє провести висушування кристалів ДФОВ при невисокій температурі до 40 °С і видалити пари метанолу, а проведення процесу є значно дешевшим та швидшим, ніж ліофільне висушування. [112].

При вакуум-висушуванні сушіння здійснюють періодично. У шафу на полиці закладають вологі кристали, створюють вакуум та починають обігрівати шафи парою через порожнини в плитах або електричним струмом[97].

Товщина шару кристалів, які висушують має бути не більше 0,5 см. Кристали висушують на листах целофану, оскільки це дає можливість краще відокремити висушений продукт [112].



Рис. 7.4. Загальний вигляд вакуум-сушильної шафи

3.1. Приготування 5% водного розчину очищеного хлориду ДФОВ

Дана стадія необхідна для приготування водного розчину кристалів хлориду ДФОВ, який буде використано в наступній стадії іонообміну.

3.2. Іонообмін

Для отримання дефероксамін метансульфонату з водного розчину кристалів хлориду ДФОВ використовують процес іонообміну.

Перехід хлориду ДФОВ в метансульфонатну форму відбувається шляхом пропускання водного розчину хлориду ДФОВ через аніонообмінну смолу AMBERLITE IRA 68 у метансульфонатній формі. Смола попередньо готують, пропускаючи через неї розчин метансульфонату, аніони якого сідають на смолу, переводячи її у метансульфонатну форму.

При пропусканні через смолу водного розчину хлориду ДФОВ йде заміна аніонів хлору на аніони метансульфонату, і таким чином отримують метансульфонатну форму дефероксаміну В, яка володіє набагато кращою розчинністю, що є важливим під час приготування розчину для внутрішньо м'язових ін'єкцій[86].

3.3. Стерильна фільтрація розчину метансульфонату ДФОВ

Після іонообміну отримують розчин метансульфонату дефероксаміну. Для подальшого отримання готового лікарського засобу необхідно простерилізувати розчин, оскільки препарат вводиться хворим парентерально і вимагає повної стерильності. Стерильна фільтрація або мікрофільтрація використовується як спосіб стерилізації термолабільних розчинів (оскільки

дефероксамін має в своєму складі аміногрупу та похідні амінокислот). Останніми роками попит на даний метод зріс значним чином. Мікрофільтрація через пористі мембрани з діаметром пор від 0,1 до 10 мкм застосовується для відділення дрібних частинок твердої фази, зокрема мікроорганізмів. Завдяки великому числу пор на одиниці поверхні мембрани (кількість пор досягає 70—80% загального об'єму мембрани) процес мікрофільтрації протікає з достатньо високою швидкістю. Процес мікрофільтрації зазвичай ведуть при різниці тиску 0,1—0,2 МПа [97]

3.4. Розлив розчину метансульфонату ДФОВ по флаконах

Наступним етапом перед висушуванням є розлив простерилізованого розчину Десфералу у первинну упаковку – флакони №10 об'ємом 10 мл. Розлив проводять одразу у попередньо простерилізовані флакони на машинах шприцьового наповнення типу FFP-20/6.

Після розливу розчину десфералу в кожний флакон вставляється стерильний корок, флакони вставляються в касету з комірками під флакони і далі завантажуються на полиці ліофільної сушарки.

Сучасні ліофільні сушарки використовують флакони з корками спеціальної конструкції, що дозволяють їх використання при ліофільному висушуванні без заміни на вологопроникні. Вони мають спеціальні повздовжні канали на корці, які дозволяють волозі вільно виходити під час сушіння при неповному закритті флакона такою коркою.

Це дає можливість отримати стерильний готовий лікарський засіб одразу у первинній упаковці.

3.5. Сушіння метансульфонату ДФОВ

Сушіння сублимацією — один з найефективніших способів зневоднення термолабільних біологічних об'єктів. При 0° С колоїдна система матеріалів, у тому числі їх волога, замерзає і надалі відбувається процес сублимації, тобто видалення вологи з твердого тіла без його розплавлення; у даному разі з твердого агрегатного стану льоду вода переходить у пароподібний, проминувши рідку фазу. За такого способу сушіння молекулярна структура

матеріалу зберігається майже без змін і висушений матеріал характеризується доброю дисперсністю і пористістю, тим часом як за звичайного сушіння відбувається значне зменшення об'єму матеріалу.

Враховуючи вище наведені переваги, а також те, що ЛФ препарату Десферал – це ліофілізований порошок для ін'єкцій, то для остаточного висушування розчину десферал метансульфонату обираємо сублимаційну сушарку. Перед висушуванням розчин розливають у флакони і після проведення висушування отримують готову лікарську форму десфералу у вигляді ліофілізованого порошку у флаконах без наступних стадій подрібнення, просіювання та пакування порошку у флакони, що значно економить час та кошти для проведення виробництва[97].

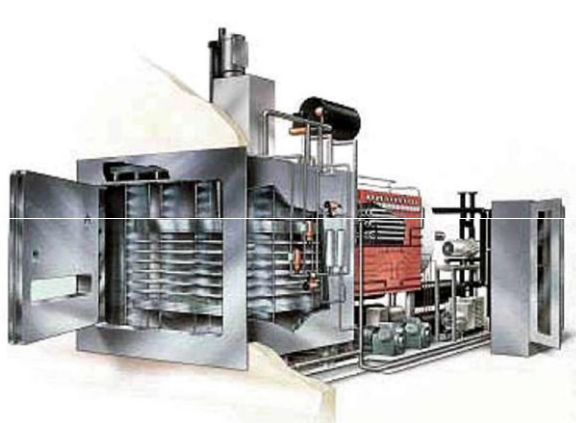


Рис. 7.5. Загальний вигляд промислової сублимаційної сушарки.

Кожен флакон з напівзакритими корками фіксуються у спеціальній касеті з комірками під кожний флакон, що забезпечує її певну нерухомість. Ці касети встановлюються безпосередньо на полицю ліофільної сушарки.

Етапи ліофільного сушіння включають в себе:

1. Завантаження полиць сушарки касетами з флаконами у кількості, що відповідає серії препарату;
2. Процес заморожування до температури $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Процес I стадії сушіння при температурі $30\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$.
4. Процес II стадія (досушування) при температурі $40\text{-}50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6. Укупорювання флаконів після висушування

Після закінчення процесу сушіння процес укупорювання корок проходить автоматично за рахунок пластини, що встановлена над корками, яка плавно опускається і дожимає корки у флаконах до кінця. Після повного закриття флаконів корками відкривають дверці сушарки і вивантажують флакони для подальшого обкочування корок ковпачками для їх фіксації на флаконі.

3.7.Обкатка ковпачків

Для запобігання випадкового відкриття флакона в процесі їх транспортування після сушіння застосовують фіксацію корок алюмінієвими ковпачками шляхом їх обкочування на відповідному автоматі. Отримані після сушіння та закриті корками флакони подають на конвеєр подачі до обкочувального автомату, де власне і проходить процес фіксації ковпачка на флаконі. Крім того, в процесі цього йде маркування кожного флакона з назвою ГЛЗ відповідно до АНД. Дана операція дозволяє зберегти стерильність вмісту флакона з ГЛЗ під час транспортування та протягом всього періоду, аж до використання пацієнтом.

РОЗДІЛ 8. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Вихідними даним для складання таблиці специфікацій обладнання, контрольно-вимірювальних приладів (КВП) та систем автоматизації з їх технічними характеристиками є продуктовий розрахунок обладнання наведений в розділі 6 та 7. Апаратурна схема наведена в графічній частині проекту.

Таблиця 8.1

Специфікація обладнання ділянки післяферментаційних робіт

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
ПЗ-1 ПЗ-9	Повітрозабірник	2	Повітрозабірник aiger deltafan maxі. Виробник компанія Deltafan, Україна. Обладнаний металевою решіткою для видалення механічних часток. Продуктивність 1100-1800 м ³ /год. Перепад тиску 25-40 Ра [1].
Ф-2 Ф-10	Фільтр грубої очистки повітря тип G	2	Панельний повітряний фільтр грубої очистки під замовлення. Компанія-виробник Alter Air, Україна. G3- G4–рекомендований кінцевий перепад тиску 250 Па. Може бути виконаний з таких матеріалів: целюлоза, голкопробивні неткані волокна, скло і мікроскловолокно. E=80% [2].
В-3 В-11	Вентилятор	2	Вентилятор промисловий осьовий з оцинкованої сталі. Виробник Systemair AW, Швеція. Максимальна витрата повітря 893 м ³ /год. Частота обертів 2085. Вага 3 кг[3].

<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>				
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>
<i>Розробив</i>		<i>Підгерська Т.О.</i>		
<i>Консульт.</i>				
<i>Керівник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>		
<i>Н. Контр.</i>				
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>		
<i>Розділ 8. Специфікація обладнання</i>				
		<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
			<i>108</i>	<i>161</i>
<i>Кафедра БТМ</i>				

К-4 К-12	Кондиціонер	2	Канальний кондиціонер. Виробник Daikin, Чехія. Площа приміщення до 60 м ² [4].
ЗВ-5 ЗВ-13	Зволожувач	2	Адіабатичний зволожувач повітря. Виробник «ECS Group», Україна. Ємність бака 11 л. Вага 4,2 кг. Для приміщень до 60 м ² . Потужність випаровування 950 г/год. Матеріал пластик[5].
Ф-6 Ф-14	Фільтр тонкої очистки тип F	2	Панельний фільтр тонкої очистки на замовлення (F7-F9). Виробник Alter Air, Україна. Рекомендований кінцевий перепад тиску 450 Па. Виготовляють з різних матеріалів: хімволокно; скловолокно металева сітка; ретикульований пінополіуретан; целюлоза; голкопробивні неткані волокна. E = 85 %[6].
Ф-7	Фільтр високої ефективності H11 (типу HEPA)	1	Промисловий бактерицидний фільтр HEPA. Виробник Eagle Filters, Фінляндія. E=95%[7].
Ф-8 Ф-15	Фільтр високої ефективності H12 (типу HEPA)	2	Промисловий бактерицидний фільтр HEPA. Виробник Eagle Filters, Фінляндія. E=99,5%[7].
Ф-16	Фільтр високої ефективності H14 (типу HEPA)	1	Промисловий бактерицидний фільтр HEPA. Виробник Eagle Filters, Фінляндія. E=99,995%[8].
A-17	Аератор	1	Аератор для води. Виробник Runxin, серія F107B, Китай. Продуктивність до 72 м ³ /добу. Робоча температура від +5 до +45 °С. Робочий тиск до 6 атм[9].
К-18	Компресор	1	Поршневий одноступінчастий компресор. Виробник Dalgakiran, Україна. Серії DKC 300. Потужність 607 л/хв [10].
Н-19 Н-24 Н-26 Н-30 Н-34	Насос відцентровий		Насос відцентровий багатоступінчастий Раско серії NMS (Бельгія). Продуктивність 15 м ³ /год Матеріал високоякісна сталь[11].

Н-37 Н-40			
Ф-20	Фільтр механічний	1	Фільтр механічний Honeywell FK06-3/4AA. Виробник Німеччина. Фільтруюча здатність 100 мкм. Максимальна температура води +40 °С. Максимальний тиск 16 Бар. Продуктивність 70 м ³ /добу[12].
КК-21	Катіонітна іонообмінна колонка	1	Система пом'якшення води. Виробник FORMULA VODY, Україна. Серія IONIX 1665. Призначена для видалення з води іонів солей жорсткості (кальцій, магній), а також амонію, нітритів та нітратів за допомогою іонообміну. Матеріал корпусу скловолокно. Тип корпусу колона. Продуктивність 5,5 м ³ /год[13].
АК-22	Аніонітна іонообмінна колонка	1	Система пом'якшення води. Виробник FORMULA VODY, Україна. Серія IONIX 1665. Призначена для видалення з води іонів солей жорсткості (кальцій, магній), а також амонію, нітритів та нітратів за допомогою іонообміну. Матеріал корпусу скловолокно. Тип корпусу колона. Продуктивність 5,5 м ³ /год[13].
Ф-23	Фільтр вугільний	1	Фільтр Organic FS-16 ECO, Україна. Метод фільтрації вугільний. Продуктивність 1,6 м ³ /год[14].
ЗМ-25	Модуль зворотнього осмосу 1 ступінь	1	Система зворотнього осмосу AMRO-2K (AMRO-2000L) з мембранами Hydranautics. Робочий тиск 7-10 атм. Продуктивність 2 м ³ /год[15].
ЗМ-27	Модуль зворотнього осмосу 2 ступінь	1	Система зворотнього осмосу AMRO-2K (AMRO-2000L) з мембранами Hydranautics. Робочий тиск 7-10 атм. Продуктивність 2 м ³ /год[15].
ЕД-28	Модуль електродеіонізації	1	Система електродеіонізації EDI XL-500-R. Виробник NEREX, Україна. Продуктивність 1,7-2,5 м ³ /год [16].
З-29	Збірник води очищеної	1	Збірник для води об'ємом 3 м ³ на замовлення. Матеріал нержавіюча сталь AISI 304 [17].

УФ-31	Ультрафіолетовий стерилізатор	1	Ультрафіолетовий знезаражувач води Ecosoft E-480. Має металевий корпус з нержавіючої сталі, всередині якого знаходиться ультрафіолетова лампа. Доза УФ-опромінення 30 мДж/см ² . Продуктивність 1,8 м ³ /год [18]
СФ-32	Стерилізуючий фільтр	1	Система мікрофільтрації UF0812-СТ. Виробник NEREX, Україна. Видаляє з води частинки розміром 0,45 мкм. Видаляє з води мікроорганізми. Продуктивність 0,8 -1,5 м ³ /год [19].
Р-33	Реактор для культуральної рідини	1	Реактор для культуральної рідини об'ємом 10 м ³ , який обладнаний сорочкою та перемішуючим пристроєм, матеріал нержавіюча сталь AISI 304 [20].
Ф-35	Фільтр-прес	1	Рамний фільтр-прес COLOMBO 25 під замовлення з намівкою фільтрперліту. Виробник ROVER POMPE, Італія. Продуктивність 3 м ³ /год. F= 16 м ² . ΔP = 0,8 МПа [21].
З-36	Збірник	1	Збірник для фільтрату об'ємом 8 м ³ із сорочкою для охолодження на замовлення. Матеріал нержавіюча сталь AISI 304 [17].
М-38	Мірник	1	Мірник об'ємом 2 м ³ . Виробник ООО «Машинобудівельний завод», Україна [22].
К-39	Іонообмінна колонка	1	Іонообмінна колона V= 900 л катіонообмінна смола LEWATIT CNP 80 у аміачній формі. Виробник Canature, Бельгія [23].
УФ-41	Ультра-фільтраційна установка	1	Установка ультрафільтрації Toqua UFS 172T-S, Італія. Продуктивність 4-6 м ³ /год. Розмір пор мембрани 1 нм [24]
Р-42	Реактор-кристалізатор	1	Реактор-кристалізатор об'ємом 400 л з сорочкою та мішалкою. Виробник Стройторгсервіс, Україна. Нержавіюча сталь AISI 304 [25].
Н-43 Н-47	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий Aquatica LEO 0.75 КВТ 50 М, Китай. Максимальна продуктивність до 2 м ³ /год [26].

М-44	Мірник	1	Мірник для спирту об'ємом 500 л. Виробник компанія Дейс. Матеріал нержавіюча сталь [27].
Ф-45	Друк-фільтр	1	Друк-фільтр об'ємом $V_p=0,3$ м ³ , поверхня фільтрації $F = 0,4$ м ² . Робочий тиск, $\Delta P=0,6$ МПа. Допустима температура стінки в корпусі від -20 до +200 °С. Виробник ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.», Україна [28].
Р-46	Реактор-кристалізатор	1	Реактор-кристалізатор об'ємом 250 л з сорочкою та перемішувальним пристроєм (лопатевою мішалкою). Нержавіюча сталь AISI 304 [29].
СВ-48	Вакуум-сушарка	1	Вакуум-сушильна шафа СП-30С. Температура нагріву до 300°С. Автоматичне регулювання та підтримка температури. Камера і полки – нержавіюча сталь AISI 304. Кількість полиць 2/3. Допустиме навантаження на полицю 14 кг [30].
К-49	Іонообмінна колонка	1	Іонообмінна колона $V=75$ л. Аніонообмінна смола AMBERLITE IRA 68 в метансульфонатній формі. Виробник Sanature, Бельгія [31].
Ф-50	Фільтр для мікрофільтрації	1	Рідинний фільтр з поліпропілена/скловолокна. Виробник New Filter Розмір пор 0,22 мкм [32].
АЗМ-51	Апарат для зовнішнього миття	1	Напівавтомат типу АП-2М2. Виробник Маріупольський ЗТО, Україна. Продуктивність 30 тис флаконів за годину (флакони об'ємом 2 мл).
АВМ-52	Апарат для внутрішнього миття	1	Турбовакуумний апарат, на дні якого закріплено генератор ультразвуку. Виробник «FortuneInternational», Індія.
СТ-53	Стерилізаційний тунель	1	Установка сушильної стерилізації. Виробник LAS, Данія.
АР-54	Автомат для розливу у флакони	1	Машина моделі FFP-20/6 продуктивністю по ампулам об'ємом у 10 мл – $G_{\text{маш}} = 200$ фл /хв. Точність наповнення $\pm 0,5\%$ (V2 мл). Відсоток бою 0,01 %.
СЛ-55	Ліофільна сушарка	1	Фармацевтичний ліофілізатор GLZY-B тип 15, ефективна площа полки 16,1 м ² , ємність конденсатора - 320 кг, максимальна кількість флаконів 33 600 шт.

			. Діапазон температур -55 – +80
АО-56	Автомат для обкатки ковпачків	1	Автоматичний обжимний апарат CV3000. Виробник Neostarpack. Машина призначена для обжима алюмінієвих кришечок для ін'єкційних флаконів. Продуктивність 40 шт/хв [33].
СП-57	Стіл пакувальний	1	Стіл для ручного фасування та пакування флаконів готового лікарського засобу у вторинну упаковку (картонні коробки)

Примітка: посилання наведені станом на листопад 2022 р.

- <https://deltafan.com.ua/product/povitrozabirnyk-airer-deltafan-maxi/>
- <https://shop.alterair.ua/product/vozdushnyye-panelnyye-filtry-gruboy-ochistki-g1-g4/#scrollDescription>
- <https://shop.alterair.ua/product/systemair-aw/>
- <https://shop.alterair.ua/product/daikin-fdxs-60f-rxs-60l/#scrollDescription>
- <https://ecsgroup.com.ua/b-125/>
- <https://shop.alterair.ua/product/panelnyye-vozdushnyye-filtry-dlya-tonkoy-ochistki-vozdukha-%28f7-f9%29/#scrollDescription>
- <https://shop.alterair.ua/product/hepa-ultra/#scrollDescription>
- <https://bioclimat.com.ua/ua/p549551467-filtr-eagle-filters.html>
- <https://vodyanoi.com.ua/komplektuyushchie-i-avtomatika/komplektuyushchie-filtrov-dlya-vody/upravlyayushchie-klapany/runxin-f107b>
- <https://dalgakiran.ua/ru/products/porshnevye-odnostupenchatye-kompressory/>
- <https://dalgakiran.ua/ru/products/centrobezhnye-nasosy-dlya-pishchevoy-i-farmaceuticheskoy-promyshlennosti/>
- <https://www.aquanova.com.ua/ua/in-line-filters/honeywell-fk06-3-4aa>
- https://formulavody.com.ua/uk/ionix-1665-water-softening-system-with-ammonium-nitrate-and-nitrite-removal?gclid=CjwKCAiAkfucBhBBEiwAFjbrk0YoA2tU3bVfYt4mKinBNDvUHdOkGjvcU7FpPxAdCYW8q8gOkjexoCsU4QAvD_BwE
- <https://www.aquanova.com.ua/ua/ugolnyy-filtr/ugolnyy-filter-orgainc-fs-16-eco>
- <https://www.aqua-room.com.ua/sistema-obratnogo-osmosa-aquarum-amro-2000-l>
- <https://nerex.ua/catalog/sistema-elektrodeionizatsii-edi-xl-500-r-1700-2500-igod>
- <https://ub.ua/market/view/18905647/all/emkosti-rezervuary-resivory-sborniki-apparaty-kupit-v-hersone/>
- <https://ecosoft.ua/ua/ultrafioletovyy-obezzarzhivatel-vody-ecosoft-e-480/>
- <https://nerex.ua/catalog/sistema-mikrofiltratsii-uf0812-ct>
- <https://emkosti.com.ua/goods/mnist-iz-sorochkoyu-ta-mishalkoyu/>
- <https://prom-nasos.com.ua/ua/filtration/filter-presses/colombo-25-ramniy-filtr-pres/>
- <https://flagma.ua/merniki-dlya-spirta-iz-nerzhavayushchey-stali-o4252803.html>
- <https://prom.ua/p848740622-korpus-filtra-pwg.html>
- <https://prom.ua/ua/p1120568016-sistema-ultrafiltratsii-toray.html?&primelead=MS4yNQ>
- <https://prom.ua/p1016491054-reaktor-400-litrov.html>
- <https://budkomfort.in.ua/nasos-vidcentrovuy-aquatica-leo-775338>
- <https://t-mg.com.ua/p873574225-mernik-etalonnyj-nerzhavayushchey.html>
- http://euromash.kiev.ua/ua/druk_filtr_ua.php
- http://euromash.kiev.ua/ua/aparati_perem_ustroystvom_ua.php
- https://medservice.net.ua/ua/p1368929637-shafa-sushilna-30s.html?source=merchant_center&gclid=CjwKCAiAkfucBhBBEiwAFjbrkxD4dnCAOiVtDVfRu8IFHbdXhyyzKA-JfA0CAzSYiH_5t0wdnOKhoCnOEQAvD_BwE
- <https://prom.ua/p1364424871-korpus-dlya-filtra.html>
- <https://newfilter.com.ua/ua/pharma/farmatsevtichni-filtri-dlya-sterilnoyi-filtratsiyi-ridin.html>
- <https://www.neostarpack.com/ru/product/NCP-300.html>

РОЗДІЛ 9. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ ДЕСФЕРАЛУ

Технологічну схему наведено в графічній частині проекту.

ДР1. Підготовка вентиляційного повітря

Очищення повітря у виробничих приміщеннях А/В та С і D класів чистоти має бути трирівнева.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір повітря здійснюють з атмосфери за допомогою трубчастої конструкції повітрозабірника ПЗ-1/ПЗ-8. З метою уникнення великої концентрації запиленості та загазованості забір здійснюють на висоті 8-10 м. Як правило, системи повітрязабору влаштовується на даху технічних приміщень. Повітря проходить крізь решітку встановлену у повітропроводі для видалення крупних механічних часток – листя, гілки.

ДР 1.2. Очищення повітря від механічних часток

З метою очистки повітря від аерозольних механічних часток та попередження абразивного пошкодження вентиляційної апаратури використовують перший рівень очищення, що включає в себе фільтри попередньої очистки тип G (фільтри грубої очистки) Ф-2/Ф-10. Вони дозволяють видалити частки розміром більше 5 мкм. Таке очищення дозволяє позбутися пилу, крапель вологи та частково мікроорганізмів. Для даного етапу підготовки використовують сухі фільтри, а в якості фільтруючого матеріалу можна використовувати пінополіуритан, скляне або хімічне волокно та інші неткані матеріали. Ступінь очищення становить E=80%.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Підг ерська Т.О.</i>			<i>Розділ 9. Опис технологічної схеми післяферментаційного виділення і очищення Десфералу</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Консульт.</i>							114	161
<i>Керівник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

ДР 1.3. Транспортування повітря

Наступним етапом, що супроводжує транспортування повітря у систему повітропостачання є його переміщення вентилятором високого тиску. Ця стадія необхідна для того, щоб забезпечити належний об'єм подачі і відповідний до технологічних вимог тиск повітря. Нагнітання повітря здійснюється за допомогою вентилятора В-3/В11. При цьому тиск повітря становить до 0,1 МПа.

ДР 1.4. Кондиціонування повітря

Надмірна вологість призводить до конденсації парів води і змочування частинок фільтрувального матеріалу. Це особливо неприпустиме при використанні волокнистих фільтрувальних матеріалів. Кондиціонування повітря має забезпечувати потрібну температуру та вологість повітря у приміщеннях. Всі ці функції можна реалізувати у кондиціонері К-4/К-12. Кондиціонування повітря складається з першого підігріву, охолодження, другого підігріву. Зволоження парою здійснюється за допомогою зволожувача ЗВ-5/ЗВ-13. Комфортну температуру в виробничих приміщеннях слід підтримувати на рівні (21 ± 2) °С взимку і (23 ± 2) °С влітку, відносну вологість повітря - у межах від $W = 30$ до 50 % з урахуванням технологічних вимог.

ДР 1.5. Очищення повітря фільтруванням

Далі відбувається другий рівень очищення повітря від часток за допомогою системи фільтрів тонкого очищення F. На даному етапі повітря проходить через фільтри тонкої фільтрації типу F.

Для класу чистоти D на даному етапі встановлюють 1 фільтр тонкої очистки типу F Ф-6 (E = 85 %) та 1 фільтр типу H11 (HEPA) Ф-7 (E= 95%). Для класу чистоти C теж 2 фільтра: перший – це фільтр тонкої очистки F Ф-6 (E = 85 %.), другий – це фільтр типу H12 (HEPA) Ф-8 (E= 99,5%).

Для класу B встановлюють 2 фільтра: перший – це фільтр тонкої очистки F Ф-14 (E = 85 %.), другий – це фільтр типу H12 (HEPA) Ф-15 (E= 95%). Для класу A встановлюють 2 фільтра: перший – це фільтр тонкої

очистки F Ф-14 (E = 85 %.), другий – це фільтр типу H14 (HEPA) Ф-16 (E= 99,995%).

HEPA фільтр є ключовою ланкою системи, від якої залежить ефективність роботи всієї повітроочисної системи. Ефективне використання HEPA фільтрів можливо тільки за умови трирівневої (щонайменше) фільтрації повітря, що подається, тобто даний фільтр встановлюють для класів чистоти A, B, C, D після фільтра грубої G та тонкої очистки F. На кожному рівні очищення слід використовувати фільтри, що по ефективності фільтрації відповідають вимогам європейських стандартів EN 779 та EN 1822.

На кожному рівні очищення повітря фільтри повинні відповідати наступним класам:

- для виробничих приміщень C класу чистоти:

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

- для виробничих приміщеннях D класу чистоти:

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

ДР2. Підготовка води очищеної

ДР2.1. Аерація

В якості вихідної сировини для приготування всіх видів води є вода питна. Вода питна подається до аератора А-17. За допомогою компресора К-18, відбувається подача повітря до аератора. Ця стадія є першим етапом попередньої очистки води. Вона дозволяє очистити воду від небажаних елементів таких як залізо, марганець, сірководень, за рахунок хімічних процесів, які відбуваються при надходженні кисню. Даний процес також дозволяє позбутись неприємних запахів та розірвати струмінь води.

ДР2.2. Груба фільтрація

Далі відбувається подача води за допомогою відцентрового насоса Н-19 до механічного фільтра Ф-20, для грубої фільтрації. Така фільтрація дозволяє видаляти з води частки розміром більше 100 мкм. В якості устаткування для грубої фільтрації використовуються фільтри з піщаним завантаженням. Вибір сорту піску залежить від результатів аналізу води з урахуванням сезонних змін. Фільтр періодично промивається. Справність фільтру контролюється різницею тиску води до і після фільтру.

ДР2.3. Пом'якшування

Цей етап дозволяє значно понизити вміст іонів Са⁺ та Mg перед подачею води для очищення на мембрани зворотного осмосу. Вода надходить до катіонітної іонообмінної колонки КК-21, а далі до аніонітної іонообмінної колонки АК-22. Це устаткування служить автоматичними пом'якшувачами, які працюють на принципі заміни іонів кальцію і магнію іонами натрію. Пом'якшувачі періодично регенеруються розчином хлориду натрію. Якість роботи пом'якшувача контролюють періодичним виміром жорсткості води на вході і на виході.

ДР2.4. Фільтрація через вугільний фільтр.

Далі відбувається фільтрація через вугільний фільтр Ф-23, що дозволяє понизити концентрацію органічних речовин і хлору. Використовуються стандартні патронні фільтри з активованим вугіллям. Якість роботи фільтру контролюється різницею тиску води до і після фільтру. На цьому етапі отримують пом'якшену воду. Для отримання води вищої якості, її передають на наступну стадію ДР 2.5 для проведення зворотного осмосу.

ДР2.5. Зворотний осмос

За допомогою відцентрового насосу Н-24, вода надходить до модуля зворотного осмосу 1 ступеня ЗМ-25. Потім вода надходить до модуля зворотного осмосу 2 ступеня ЗМ-27. За допомогою насоса Н-26. На стадії зворотного осмосу вода очищається від органічних сполук і солей. Видалення домішок відбувається за рахунок пропускання води через напівпроникну мембрану при тиску, що перевищує осмотичний.

Для зменшення явища концентраційної поляризації використовується тангенціальний рух води по поверхні мембрани при рециркуляції. Устаткування є системами мембран. Мембрани мають розміри пор 2-3 Å (Ангстрем — одиниця довжини, що дорівнює 10^{-10} м). Мембрана дозволяє відділяти речовини з м.м. від 50 до 100 Да. Контроль систем зворотного осмосу здійснюється виміром питомої електричної провідності води на виході з системи. Питома електропровідність води очищеної, згідно ДФУ, має бути $0,260 \mu\text{S}/\text{cm}$ або $(1,0 \pm 0,3) \times 10^{-6} \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

ДР2.6. Електродеіонізація

Далі вода надходить до модуля електродеіонізації ЕД-28, де відбувається очистка води від іонів – заряджених часток. Вода збирається в збірнику З-29.

ДР 2.7. Рециркуляція отриманої очищеної води

З метою запобігання заростанню контамінуючою мікрофлорою ємностей для зберігання очищеної води використовують наступні схеми рециркуляції:

- термічна схема з використанням теплообмінного обладнання;
- фотохімічна схема з використанням ламп ультрафіолетового випромінювання.

Для даного виробництва використана фотохімічна схема з постійною рециркуляцією через ультрафіолетовий стерилізатор УФ-31 та стерилізуючий фільтр СФ-32 за допомогою насоса Н-30. Фотохімічне окислення води ультрафіолетовими променями з довжинами хвиль 185 і 245 нм усуває сліди органічних сполук і вбиває мікроорганізми у воді, а також запобігає розмноженню бактерій в резервуарах для зберігання води.

ДР 3. Підготовка первинної упаковки

В якості первинної упаковки виступають скляні флакони, гумові корки та алюмінієві ковпачки.

ДР 3.1. Підготовка флаконів

Скляні флакони піддаються зовнішньому миттю за допомогою апарату для зовнішнього миття АЗМ-51. Далі слідує внутрішнє миття

віброультразвуковим способом за допомогою апарату для внутрішнього миття АВМ-52. Потім флакони ополіскують очищеною водою, що надходить від ДР2.7, висушують, стерилізують та охолоджують за допомогою стерилізаційного тунелю СТ-53. . Температура в зоні стерилізації 360 °С, а на виході 23 °С. Підготовані флакони подаються на стадію ТП 6.4.

ДР 3.2. Підготовка гумових пробок

Пробки миють обполіскують водою питною, кип'ятять 30 хв в розчині 1% натрію гідрокарбонату. Промивають водопровідною водою 1 раз та обполіскують очищеною, що надходить від ДР2.7 – 2 рази. Далі їх поміщають в емальовані ємності, заливають очищеною водою, закривають і витримують в паровому стерилізаторі при температурі 120 °С протягом 60 хв., воду після цього зливають, і пробки ще раз промивають очищеною водою. Після обробки пробки стерилізують у біксах у паровому стерилізаторі при температурі 120 °С протягом 45 хв. Стерильні пробки подають на стадію ТП 6.4

ДР 3.3. Підготовка алюмінієвих ковпачків

Алюмінієві ковпачки витримують 15 хв. в 1% або 2% розчині кальцинованої соди, підігрітому до температури 75 °С, потім розчин зливають і ковпачки промивають проточною водопровідною водою, а далі промивають очищеною водою, що надходить від ДР2.7. Чисті ковпачки сушать у повітряному стерилізаторі в біксах при температурі 55 °С. Стерильні ковпачки подають на стадію ТП 6.7

ТП 4. Отримання неочищеного хлориду дефероксаміну В

ТП 4.1. Відділення біомаси фільтруванням

З реактора Р-33 охолоджена до температури $t=5$ °С культуральна рідина в кількості 5 800 л, за допомогою насоса Н-34, надходить на стадію відділення біомаси. Для відділення біомаси використовують фільтр-прес Ф-35. В результаті фільтрування з урахуванням втрат 174 л отримують 5 620 л фільтрату та 6,8 кг волого осаду (вологість 70%). Маса абсолютно сухого дефероксаміну становить 28,1 кг. Вологий осад іде на знешкодження твердих

відходів до ЗБ 8.2, а фільтрат збирається в збірнику для фільтрату З-36. Зі збірника фільтрат надходить на наступну стадію ТП 4.2 для іонообміну.

ТП 4.2. Іонообмін з використанням катіонообмінної смоли LEWATIT CNP 80 у аміачній формі

Відфільтрований розчин від ТП 4.1. в кількості 5 620 л, надходить до іонообмінної колонки К-39, від збірника для фільтрату З-36 за допомогою насоса Н-37, де його пропускають через смолу LEWATIT CNP 80. Кількість смоли становить 730 л. Після цього смолу промивають очищеною водою, що надходить від ДР2.7. Кількість води становить 1 460 л. Промивні води надходять до ЗВ 8.3 Далі відбувається елюювання НСІ 0,2 М. Кислота в кількості 1 680 л подається до іонообмінної колонки з мірника М-38. В результаті отримують 7 081 л елюату з врахуванням втрат (219 л), що передають на стадію концентрування ТП. 4.3. Маса розчиненого дефероксаміну В в елюаті з врахуванням втрат, 27,3 кг.

ТП 4.3. Концентрування ультрафільтрацією

Елюат (7 081 л) зі стадії ТП 4.2 надходить до ультрафільтраційної установки УФ-41 за допомогою насоса Н-40 і проходить через ультрафільтраційну мембрану, розмір пор 1 нм. В результаті ультрафільтрації отримують 116 л концентрату та 6 965 л пермеату. Пермеат іде на утилізацію до ЗБ 8.3. Кількість абсолютно сухого дефероксаміну В в концентраті після ультрафільтрації з врахуванням втрат становить 26,7 кг. Концентрат передають на наступну стадію ТП 4.4 для осадження та кристалізації.

ТП 4.4. Осадження та кристалізація.

До концентрату (116 л) зі стадії ТП4.3, у реактор Р-42, з геометричним об'ємом 400 л, додають 116 л метанолу з мірника М-44 та 6,96 кг хлорид амонію. Суміш перемішують та охолоджують до 0 °С і залишають на 24 год. Для кристалізації. Отримана суспензія в кількості 237 л, надходить на стадію ТП 4.5 для відділення кристалів дефероксаміну В фільтруванням. Маса абсолютно сухого дефероксаміну В після кристалізації з врахуванням втрат 24,4 кг.

ТП 4.5. Фільтрування кристалів.

Суспензія зі стадії ТП 4.4 за допомогою насоса Н-43 надходить до друк-фільтра Ф-45. В результаті фільтрування з урахуванням втрат (7,3 л) отримують водно-спиртову суміш об'ємом 209 л, що надходить на регенерацію та вологі кристали масою 27,8 кг. Отримані кристали на фільтрувальній перегородці промивають невеликою кількістю метанолу і залишки метанолу відфільтровують. Вологість кристалів становить 10%. Маса абсолютно сухого дефероксаміну В після фільтрації з врахуванням втрат 23,5 кг. Вологі кристали далі передають на наступну стадію ТП 5.1.

ТП 5. Отримання очищеного хлориду дефероксаміну В

ТП 5.1. Приготування 5 % розчину неочищеного хлориду дефероксаміну В та його знебарвлення.

Вологі кристали в кількості 27,8 кг з друк-фільтра Ф-45, знову надходять до реактора Р-42 для знебарвлення. В реактор Р-42 з вологими кристалами з мірника М-44 додають 184 л метанолу, а також додають 46 л води очищеної. Розчин перемішують і додають 1,2 кг (6 л) активованого вугілля для знебарвлення суміші. Суспензія в кількості 258 л передають на наступний етап ТП 5.2 фільтрування.

ТП 5.2. Відділення активованого вугілля з домішками фільтруванням

Освітлену суспензію з реактора Р-42 за допомогою насоса Н-43 перекачують до друк-фільтра Ф-45 для видалення активованого вугілля з домішками. В результаті фільтрування отримують 20 кг вологого осаду та 224 л освітленого фільтрату, який збирають в реакторі Р-46.

Осад вологістю 70% іде на утилізацію до ЗБ 8.2. Маса абсолютно сухого дефероксаміну В після фільтрації з врахуванням втрат 22 кг.

ТП 5.3. Перекристалізація хлориду дефероксаміну В

В реакторі кристалізаторі Р-46 освітлений розчин дефероксаміну В охолоджують до температури +5°C протягом 24 год, в результаті утворюється суспензія з кристалами, яку передають на стадію ТП 5.4 для подальшого

фільтрування. Маса абсолютно сухого дефероксаміну В після кристалізації з врахуванням втрат 15,4 кг.

ТП 5.4. Відділення кристалів фільтруванням

За допомогою насоса Н-47 суспензія з кристалами в кількості 224 л надходить з реактора Р-46 надходить до друк-фільтра Ф-45. Після фільтрування суспензії отримують 16,5 кг кристалів з вологістю 10 %. Кристали промивають невеликою кількістю метанолу, який відфільтровують. Водно-спиртова суміш в кількості 201 л з врахуванням втрат (11 л) іде на регенерацію. Вологі кристали передають на наступну стадію ТП 5.5 для висушування. Маса абсолютно сухого дефероксаміну В після фільтрації з врахуванням втрат 13,9 кг.

ТП 5.5. Висушування кристалів у вакуум-сушильній шафі

Кристали після фільтрування з друк-фільтра Ф-45 переносять до вакуум-сушильної шафи СВ-48 для видалення міжкристалічної вологи. Температура сушіння 40°C. Кристали дефероксаміну В висушують до залишкової вологи 5 % і отримують 14,3 кг сухих кристалів. Маса видаленої вологи становить 2,2 кг. Маса абсолютно сухого ДФОВ після сушіння з врахуванням втрат 12,8 кг. Відпрацьоване повітря надходить до ЗБ 8.1. Кристали передають на наступну стадію ТП 6.1.

ТП 6. Отримання метансульфонату дефероксаміну В

ТП 6.1. Приготування 5 % розчину очищеного хлориду дефероксаміну В.

Для приготування 5 % розчину очищеного хлориду дефероксаміну В сухі кристали від вакуум-сушильної шафи СВ-48 знову переносять в реактор-кристалізатор Р-46 в кількості 14,3 кг і додають 210 л очищеної води, що надходить від ДР2.7. Розчинення кристалів проводять при температурі $t = 40^{\circ}\text{C}$ при постійному перемішуванні. Отриманий розчин в кількості 221 л надходить на наступну стадію ТП 6.2 для іонообміну.

ТП 6.2. Іонообмін на колонці з аніонообмінною смолою AMBERLITE IRA 68 у метансульфонатній формі

За допомогою насоса Н-47 розчин дефероксаміну В в кількості 221 л від реактора Р-46 пропускають через іонообмінну колонку К-49 із смолою AMBERLITE IRA 68, об'єм якої становить 59,5 л. Отриманий розчин метансульфонату дефероксаміну В збирають у реакторі Р-42. Далі колонку промивають 40 л очищеною водою, що надходить від ДР2.7. Об'єм води та розчину метансульфонату дефероксаміну В об'єднують в реакторі Р-42. Об'єм розчину після іонообміну з врахуванням втрат (5 л) становить 257 л. Маса розчиненого дефероксаміну В в елюаті з врахуванням втрат становить 12,3 кг. Розчин надходить на наступну стадію ТП 6.3 для стерильної фільтрації.

ТП 6.3. Стерильна фільтрація розчину

Оскільки готовий лікарський засіб використовується для парентерального введення, то дуже важливим є його стерильність. Тому після іонообміну розчин метансульфонату дефероксаміну, який збирали в реактор Р-42, фільтрують через мікрофільтр Ф-50, подаючи розчин за допомогою насоса Н-43. Кількість розчину становить 257 л. Мікрофільтрація через пористі мембрани з діаметром пор від 0,1 до 10 мкм застосовується для відділення дрібних частинок твердої фази, зокрема мікроорганізмів. Згідно рівняння Стокса діаметр пор для молекули метансульфонату дефероксаміну становить:

$$D_{\text{мол}} = 0,098 \times M^{0,38} = 0,098 \times 656,8^{0,38} = 1,15 \text{ нм або } 0,00115 \text{ мкм.}$$

М – молекулярна маса в Да

Використовують діаметр пор фільтра 0,22 мкм для того, щоб фільтр зміг затримати найменші мікроорганізми (мікоплазми), розмір молекули яких 0,3 мкм, і тим самим це дозволить молекулам дефероксаміну моносульфату пройти через мембрану.

Після мікрофільтрації, розчин в кількості 254 л одразу подається у ємність автомата для розливу у флакони АР-51 на стадію ТП 8.4, оскільки це значно зменшує ризик контамінації профільтрованого лікарського засобу.

ТП 6.4 Розлив розчину метансульфонату дефероксаміну В по флаконах

Після стерильної фільтрації, розчин метансульфонату дефероксаміну в кількості 254 л розливають по флаконах №10 в кількості 8,4 мл в кожен, за допомогою автомату для розливу AP-54 . Кількість флаконів, що надходить на стадію розливу становить 30 221 шт.

Шприцеве наповнення флаконів самого автомату буде проходити в зоні класу чистоти А. Після наповнення, закриті флакони через шлюзи передають в зону класу В до автомату і тут же відбувається наповнення стерильним розчином первинної упаковки (флаконів) лікарського засобу. Після розливу розчину, у флакони вставляють стерильні корки. Флакони поміщають у касету з комірками і направляють до ліофільної сушарки СЛ-55. Після розливу кількість флаконів з урахуванням втрат становить 30 219 шт. Пошкоджені або розбиті флакони відправляють на стадію ЗВ8.2.

ТП 6.5. Ліофільне висушування метансульфонату дефероксаміну В.

Кожен флакон з напівзакритими корками фіксуються у спеціальній касеті з комірками під флакон, що забезпечує її певну нерухомість. Ці касети встановлюються безпосередньо на полицю ліофільної сушарки СЛ-52. Далі слідує етап заморожування до температури - 60 °С. Потім І стадія сушіння при температурі 30-35 °С, а тоді ІІ стадія (досушування) при температурі 40-50 °С.

Продукт висушують до кінцевої вологості 5 %. Загальна маса кристалів після висушування становить 14,95 кг. Маса видаленої вологи 242 кг. Далі відбувається укупорювання флаконів на стадії ТП 6.6.

ТП 6.6. Укупорювання флаконів після висушування

Укупорювання флаконів відбувається автоматично у ліофільній сушарці після закінчення процесу сушіння. Пластина, що встановлена над корками, плавно опускається і дожимає корки у флаконах до кінця. Дверцята сушарки відкриваються лише після повного закриття флаконів корками. Потім вони відвантажуються і передаються на наступну стадію обкочування корок ковпачками для їх фіксації на флаконі. Загальна кількість Десфералу після висушування становить 14,86 кг, а кількість флаконів, що передаються на

наступну стадію ТП 6.7 становить 30 007 шт. Пошкоджені або розбиті флакони відправляють на стадію ЗВ8.2.

ТП 6.7. Обкатка ковпачків

Після висушування закриті корками флакони через конвеєр подаються до автомату для обкатки ковпачків АО-56. Фіксацію корок здійснюють за допомогою алюмінієвих ковпачків. Також в процесі обкатки йде маркування кожного флакона з назвою лікарського засобу згідно АНД. В результаті отримують 29 767 флаконів. В кожному флаконі кількість Десфералу становить 495 мг. Флакони потрапляють на наступну стадію ПМВ 7.1 для пакування у вторинну упаковку. Пошкоджені або розбиті флакони відправляють на стадію ЗВ8.2.

ПМВ 7. Пакування, маркування, відвантаження метансульфонату дефероксаміну В

ПМВ 7.1. Пакування і маркування готової продукції

Флакони зі стадії ТП 6.7 вручну запаковують у картонні коробки зі спеціальними вкладишами на столі для пакування СП-57. Згідно АНД, кількість флаконів в одній упаковці становить 10 шт. Загальна кількість коробок становить 2976 шт. Вторинна упаковка обов'язково повинна містити інструкцію щодо використання ЛЗ. На вторинній упаковці шрифтом Брайля зазначають назву ЛЗ, дозу діючої речовини, лікарську форму. Запаковані коробки відправляють на склад готової продукції.

ЗВ 8. Знешкодження відходів

ЗВ 8.1. Знешкодження газоподібних відходів

Для того, щоб очистити відпрацьоване повітря, яке утворюється в процесі сушіння використовують три основних типи установок: біофільтри, біоскрубери і біореактори з омиваним шаром. [117].

ЗВ 8.2. Знешкодження твердих відходів

Для переробки та утилізації біомаси використовується метод вермикультивування [118]. Для утилізації флаконів, їх відправляють на переробку до спеціалізованих заводів.

ЗВ 8.3. Знешкодження рідких відходів

Очистку стічних вод проводять за допомогою модульних установок типу БТ, які працюють з використанням біотенка[119].

РОЗДІЛ 10. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДНО АНД

АНАЛІТИЧНИЙ НОРМАТИВНИЙ ДОКУМЕНТ

Desferal –Deferoxamine methanesulfonate salt 0,5 pro injection
Десферал – Дефероксамін метансульфонатна сіль 0,5 г для ін'єкцій

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>				
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Розділ 10. Опис лікарського засобу згідно АНД</i>	<i>Лім.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>	
<i>Розробив</i>		<i>Підгєрська Т.О.</i>						<i>126</i>	<i>161</i>
<i>Консульт.</i>						<i>Кафєдра БТМ</i>			
<i>Кєрївник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>							
<i>Н. Контр.</i>									
<i>Затверд</i>		<i>Стабніков В.П.</i>							

АНАЛІТИЧНО НОРМАТИВНА ДОКУМЕНТАЦІЯ

ДЕСФЕРАЛ

Ця аналітично нормативна документація поширюється на препарат Десферал, який являє собою ліофілізований порошок для ін'єкцій.

Анатомарно-терапевтична система класифікації (Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification system):

V Інші препарати

V03 Терапевтичні препарати інші

V03A Терапевтичні препарати інші

V03AC Залізовв'язувальні препарати

V03AC01 Дефероксамін [120].

Основні фізико-хімічні властивості: від білого до практично білого кольору ліофілізат

Склад: 1 флакон містить 500 мг десферіоксаміну метансульфонату.

Форма випуску. Порошок ліофілізований для приготування розчину для ін'єкцій по 500 мг у флаконах № 10

Фармакологічна група. Засоби, що утворюють хелатні сполуки із залізом. Код АТС V03AC01.

Фармакодинаміка. Десферіоксамін (ДФО) утворює комплекси переважно з іонами заліза і з тривалентними іонами алюмінію: константи комплексоутворення відповідно становлять 10^{31} та 10^{25} . Спорідненість ДФО з такими двовалентними іонами, як Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , значно нижча (константа комплексоутворення -10^{14} і менше). Хелатування відбувається у молярному співвідношенні 1:1, тобто 1 г ДФО може теоретично зв'язати 85 мг заліза або 41 мг Al^{3+} .

ДФО завдяки своїм хелатуючим властивостям здатний захоплювати вільне залізо в плазмі чи в клітинах і тому утворювати феріоксаміновий комплекс (ФО). Виділення заліза у вигляді ФО із сечею переважно відображає кількість заліза, яке виходить з плазми, тоді як виділення заліза з калом вказує, головним чином, на кількість хелатованого заліза у печінці.

Слід зазначити, що ДФО не видаляє залізо з трансферину, гемоглобіну або інших речовин, в яких міститься гемін.

ДФО може також мобілізувати та хелатувати алюміній з утворенням алюмініоксамінового (АІО) комплексу.

Оскільки обидва комплекси – ФО та АІО – повністю виводяться з організму, ДФО сприяє екскреції заліза та алюмінію із сечею та калом і тому зменшує надто великі запаси цих елементів в органах.

Фармакокінетика. *Абсорбція.* ДФО швидко всмоктується після внутрішньо м'язової болісної ін'єкції або повільного підшкірного введення і погано всмоктується з шлунково-кишкового тракту за наявності інтактною слизової оболонки. Абсолютна біологічна доступність перорально введеного 1 г ДФО становить менше 2 %.

Розподіл. У здорових людей максимальна концентрація в плазмі 15,5 ммол/л (8,7 мг/мл) реєструвалась через 30 хвилин після внутрішньо м'язової ін'єкції 10 мг/кг ДФО. Через годину після ін'єкції максимальна концентрація ФО становила 3,7 ммол/л (2,3 мг/мл). Після внутрішньо венної інфузії 2 г (близько 29 мг/кг) ДФО здоровим людям через 2 години концентрація ДФО досягала постійного рівня 30,5 ммоль/л; розподіл ДФО відбувався дуже швидко із середнім напівперіодом розподілу 0,4 години. *In vitro* з білками сироватки крові зв'язується менше 10 % ДФО.

Біотрансформація. Із сечі пацієнтів з перевантаженням залізом виділено та ідентифіковано чотири метаболіти ДФО. Показано, що з ДФО відбуваються такі реакції біотрансформації: транс амінування та окислення з утворенням кислого метаболіту, бета-окислення також з утворенням кислого метаболіту, декарбоксілювання та N-гідроксилювання з утворенням нейтральних метаболітів.

Виведення. У здорових людей як ДФО, так і ФО після внутрішньо м'язової ін'єкції має двофазне виведення; напівперіод явного розподілу для ДФО становить 1 годину, а для ФО – 2,4 години. Напівперіод явного кінцевого виведення для обох речовин становить 6 годин. Протягом 6-

годинного введення у сечі з'являється 22 % від дози у вигляді ДФО і 1 % - у вигляді ФО.

Показання для застосування.

Моно терапія хелатним комплексом заліза лікування хронічного перевантаження залізом, наприклад: трансфузійний гемосидероз, який спостерігається при великій таласемії, сидеробластичній анемії, автоімунній гемолітичній анемії та інших хронічних анеміях.

Ідіопатичний (первинний) гемохроматоз у хворих, у яких супутні захворювання (наприклад тяжка анемія, серцеве захворювання, гіпопротеїнемія) не дозволяють проводити флеботомію.

Перевантаження залізом, пов'язане з пізньою порфірією шкіри у хворих, які не переносять флеботомії.

Лікування гострого отруєння залізом.

Лікування хронічного перевантаження алюмінієм у хворих з останньою стадією ниркової недостатності (на підтримуючому діалізі): з алюміній залежним захворюванням кісток, з діалізною енцефалопатією або алюміній залежною анемією.

Спосіб застосування та дози.

Діти та дорослі. Рекомендується лікування Десфералом починати після перших 10 - 20 переливань крові або коли рівень феритину у сироватці сягає 1000 нг/мл. Затримка росту може виникати внаслідок перевантаження залізом або надто високого дозування Десфералу. Якщо хелатування починають проводити дітям до 3 років, це повинно відбуватись під ретельним спостереженням, і середня добова доза не повинна перевищувати 40 мг/кг.

Дозування та спосіб введення можуть визначатись індивідуально і під час лікування змінюватись залежно від вираженості навантаження організму хворого залізом. Потрібно використовувати найменшу ефективну дозу. Для оцінки відповідної реакції на хелатну терапію можна на початку лікування щоденно проводити добове спостереження екскреції заліза нирками і

визначати відповідну реакцію на збільшення дози Десфералу. Після встановлення оптимальної дози можна визначати швидкість екскреції заліза нирками через кожні декілька тижнів. Іншим способом підбору середньої добової дози може бути її коректування за кількістю феритину з утриманням терапевтичного індексу менше 0,025 (тобто середня добова доза (мг/кг) Десфералу, розділена на рівень феритину у сироватці (мг/л), повинно бути менше 0,025). Середня добова доза Десфералу здебільшого становить 20 - 60мг/кг.

В основному пацієнтам з рівнем феритину у сироватці менше 2000 нг/мл необхідно близько 25мг/кг/добу. Пацієнтам з рівнем феритину у сироватці від 2000 до 3000 нг/мл необхідно близько 35 мг/кг/добу. Пацієнтам з більш високим рівнем феритину у сироватці може знадобитись введення дози аж до 55 мг/кг/добу. Постійно перевищувати середню добову дозу 50 мг/кг/добу небажано, за винятком випадків, коли потрібно дуже інтенсивне хелатування для хворих, у яких вже припинився ріст. Наведені дози – це середні добові дози. Оскільки більшості пацієнтів потрібно вводити цей препарат кожного дня протягом тижня, то дійсна доза в одному вливанні звичайно відрізняється від середньої добової дози; наприклад, якщо потрібна середня добова доза 40 мг/кг/добу і вливання проводять 5 разів на тиждень, у кожній інфузії повинно міститись 56 мг/кг.

Було встановлено, що регулярне проведення хелатного лікування за допомогою Десфералу збільшує тривалість життя у хворих на таласемію.

Десферал слід вводити 5 - 7 разів на тиждень, Десферал не застосовують для підтримуючих підшкірних болюсних ін'єкцій.

Побічна дія. Деякі ознаки та симптоми, які розцінювались як побічні дії, насправді можуть бути проявами супутнього захворювання (перевантаження залізом та/або алюмінієм).

Місцеві реакції/пов'язані з лікуванням, системні реакції. Дуже частими реакціями є біль, припухлість, інфільтрат, еритема, свербіж у місці ін'єкції, а також струп/кірка; іноді - везикули, місцевий набряк і печіння. Місцеві

прояви можуть супроводжуватись такими системними реакціями, як біль у суглобах/м'язах, головний біль, кропив'янка, нудота, біль у животі.

Алергія. Дуже рідко.

Органи чуття. Втрата сенсорно-неврального високочастотного слуху - виникає іноді, якщо застосовують рекомендовані дози і якщо при падінні рівня феритину дозу зменшують (відношення середньої добової дози Десфералу до рівня феритину у сироватці повинно бути нижче 0,025); нечіткість зору, зниження гостроти зору, втрата зору, порушення кольоросприймання (дисхроматопсія), нічна сліпота (нікталопія), дефекти поля зору, скотома, ретинопатія (пігментна дегенерація сітківки), оптичний неврит, катаракта (помутніння кришталіків), помутніння рогівки виникають рідко, за винятком випадків, коли застосовуються високі дози.

Шкіра. Дуже рідко: генералізований висип.

М'язово-скелетна система. Затримка росту та зміни в кістках (наприклад метафізеальна дисплазія) часто виникають при проведенні хелатної терапії з введенням доз вище 60 мг/кг, особливо у пацієнтів, для яких хелатування залі започинається в перші три роки життя. При застосуванні доз 40 мг/кг і менше ризик затримки росту значно зменшується.

Бронхолегенева система. Дуже рідко: гострий респіраторний дистрес-синдром.

Центральна нервова система. Дуже рідко: неврологічні розлади, запаморочення, прискорення або посилення алюміній залежної енцефалопатії, периферична сенсорна, моторна або змішана невропатія, парестезія.

Шлунково-кишкова система. Дуже рідко: діарея.

Ниркова система. Дуже рідко: порушення функції нирок.

Серцево-судинна система. Якщо не дотримуватись рекомендацій щодо введення Десфералу, то може виникнути гіпотензія.

Система крові. Дуже рідко: дискразія крові (наприклад тромбоцитопенія).

Протипоказання. Відома підвищена чутливість до активної речовини, за винятком випадків, коли проведення вдалої десенсибілізації робить лікування можливим.

Передозування.

Ознаки та симптоми. Випадкове введення надмірної дози або випадкове внутрішньо венне болісне введення чи швидка внутрішньо венна інфузія можуть супроводжуватись гіпотензією, тахікардією та розладами з боку шлунково-кишкового тракту; гострою, але транзиторною втратою зору, афазією, збудженням, головним болем, нудотою, брадикардією, а також гострою нирковою недостатністю.

Лікування. Спеціального антидоту не існує. Необхідно припинити введення Десфералу і призначити відповідне симптоматичне лікування. Десферал діалізується.

Особливості застосування.

Попередження. Швидка внутрішньо венна інфузія може призвести до гіпотензії та шоку (наприклад до гіперемії, тахікардії, колапсу такропів'янки). Введення високих доз Десфералу, особливо хворим з низьким рівнем феритину в плазмі, може спричинити порушення зору та слуху. Пацієнти з нирковою недостатністю, які знаходяться на підтримуючому діалізі і мають низький рівень феритину в плазмі, особливо чутливі до розвитку побічних реакцій: відмічалось, що у таких випадках порушення зору виникали навіть після одноразової дози Десфералу. Ризик прояву побічних дій зменшується, якщо застосовувати цей препарат у низькій дозі. Спричинені Десфералом небажані реакції здебільшого оборотні, якщо їх своєчасно виявити. Лікування Десфералом можна поновити пізніше в зменшеному дозуванні, з ретельним контролем функції зору та слуху.

Приблизно половина комплексу металу у хворих з нормальною функцією нирок і перевантаженням організму залізом виводиться нирками. Тому лікування хворих з тяжкою нирковою недостатністю слід проводити з обережністю. Десферіюксамінові комплекси заліза та алюмінію діалізуються;

у хворих з нирковою недостатністю їх виведення з організму при діалізі буде збільшуватись.

У пацієнтів з низьким рівнем феритину у сироватці, яких лікували високими дозами Десфералу, або у дітей (до 3 років на початку лікування) застосування Десфералу супроводжувалося затримкою росту. Затримку росту, спричинену надмірними дозами Десфералу, необхідно відрізнити від затримки росту при перевантаженні залізом. Затримка росту, пов'язана із застосуванням Десфералу, виникає рідко при введенні дози менше 40 мг/кг; якщо затримка росту виникла внаслідок застосування більш високих доз цього препарату, то зменшення дозування може повернути нормальну швидкість росту, проте очікуваний зріст у дорослому віці вже не досягається.

У пацієнтів з гострою інтоксикацією залізом, а також у хворих на таласемію після лікування виключно високими в/в дозами Десфералу описували гострий респіраторний дистрес-синдром. Тому не слід перебільшувати рекомендованої добової дози.

Виділення комплексу заліза може спричинювати появу червоно-коричневого забарвлення сечі.

Застереження. Десферал не слід застосовувати в дозах, вище рекомендованих. Цей препарат при застосуванні шляхом підшкірного введення не слід використовувати в концентраціях вище 10 % через підвищений ризик появи місцевих реакцій. Якщо для даного хворого єдиним способом введення може бути внутрішньо м'язовий, може знадобитися застосування більш високих концентрацій, щоб полегшити ін'єкцію.

Відновлений розчин у рекомендованій концентрації 10% - прозорий і має жовтуватий колір. Слід застосовувати тільки прозорий розчин. Покаламутнілий розчин необхідно вилити. Ін'єкцію слід робити з належною увагою.

При проведенні підшкірної інфузії голку слід вводити якомога ближче до дерми.

Під час проведення такого комбінованого лікування бажано контролювати функцію серця.

Перед початком лікування Десфералом і після цього через певні інтервали часу (кожні 3 місяці) рекомендується робити офтальмологічну консультацію та аудіо логічне обстеження. У хворих на таласемію ризик виникнення порушень слуху можна зменшити шляхом збереження співвідношення середньої добової дози Десфералу (мг/кг) до концентрації феритину у сироватці (мг/л) на рівні нижче 0,025.

При лікуванні Десфералом дітей необхідно через кожні 3 місяці визначати масу та довжину тіла.

У хворих на алюміній залежну енцефалопатію високі дози Десфералу можуть посилити неврологічну дисфункцію (поява судом), що, мабуть, спричинюється різким збільшенням кількості циркулюючого алюмінію. Десферал може прискорити початок діалізної деменції. Було показано, що попереднє лікування клоназепамом попереджує розвиток цього неврологічного розладу. Крім цього, лікування перевантаження алюмінієм може призвести до зменшення рівня кальцію у сироватці та посилення гіперпаратиреоїдизму.

Вагітність і лактація. В експериментах на тваринах було показано, що десферіоксамін може чинити тератогенну дію. До сьогодні у дітей, народжених від жінок, яких під час вагітності лікували Десфералом, не відмічалось порушень розвитку. Застосовувати препарат під час вагітності, особливо в перші 3 місяці, можна тільки у разі крайньої потреби.

Питання, чи потрапляє десферіоксамін у молоко, залишається відкритим. У кожному випадку необхідно зважувати користь від лікування і ризик для дитини.

Взаємодія з іншими лікарськими засобами. Сполучене лікування Десфералом і прохлорперазином – похідне фенотіазину – може призводити до тимчасового порушення свідомості.

У хворих із сильним хронічним порушенням утворення запасів заліза комбіноване лікування Десфералом і високими дозами вітаміну С (більше 500 мг на добу) супроводжувалось порушенням функції серця, яке, як було доведено, після відміни вітаміну С зникає.

Результати контрастного дослідження за допомогою галію⁶⁷ можуть спотворюватися через швидку екскрецію нирками зв'язаного з Десфералом галію. Бажано за 48 годин до проведення сцинтиграфії припинити застосування Десфералу.

Несумісність. Розчин препарату не сумісний з розчином гепарину для ін'єкцій. Фізіологічний розчин (0,9%) не слід використовувати як розчинник сухої речовини, але після розчинення Десфералу у воді для ін'єкцій фізіологічний розчин можна використовувати для подальшого розведення[79].

Умови та термін зберігання. Термін придатності - 4 роки.

Флакони з сухою активною речовиною зберігати при температурі від 20 до 25°C. Допускається відхилення від 15 до 30 °C. [121].

Один флакон призначений тільки для одноразового застосування. Відновлений розчин необхідно застосовувати одразу після його приготування (вводити не пізніше, ніж через 3 години). Якщо відновлення розчину проводиться в асептичних умовах, то його перед введенням можна зберігати при кімнатній температурі максимум 24 години.

Десферал слід зберігати в місцях, недоступних для дітей [79].

СПЕЦИФІКАЦІЯ

на Десферал - Дефероксамін метансульфонатну сіль

Таблиця 10.1

Найменування показників контролю	Встановлені значення (припустимі межі)	Методи контролю
1	2	3
Опис	Порошок від білого до практично білого кольору, ліофілізат	За п. 1, візуально
Час розчинення	Тривалість розчинення препарату у воді для ін'єкції не має перевищувати 20 с з моменту введення всього об'єму розчинника.	За п. 2
Прозорість розчину	Для парентерального введення розчин вмісту флакону з дозуванням 500 мг Десфералу - дефероксамін метансульфонатної солі у 10 мл <i>води для ін'єкцій Р</i> за ступенем каламутності не має перевищувати еталон І. Для парентерального введення розчин 0,5 г вмісту флакону у 5 мл розчину води для ін'єкцій має бути прозорим.	За п.3 , ДФУ 1.4, 2.2.1 с. 37
Кольоровість розчину	Забарвлення розчину, приготованого для випробування на прозорість має бути не інтенсивніше за еталон № 6. Розчин, приготований для випробування на прозорість має бути безбарвним.	За п.4 , ДФУ 1.1, 2.2.2, метод II с. 15
Втрата в масі при висушуванні	Не більше 5,0 %.	За п.5 , ДФУ 1.4, 2.2.32 с. 39
Стерильність	Препарат має бути стерильним.	За п. 6, ДФУ 1.4, 2.6.1 с.69
Пірогени	Має бути апірогенним	За п.7 , ДФУ 1.0, 2.6.8 с.107

Аномальна токсичність	Має бути не токсичним	ДФУ 1.4, 2.6.9 с.74
Механічні включення	Середня кількість часток у випробовуваних одиницях не перевищує 25 в 1 мл для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 3 в 1 мл для часток розміром 25 мкм або більше.	За п. 9, ДФУ 1.2, 2.9.19 с.164
Однорідність маси	Препарат має витримувати випробування ДФУ.	За п. 10. ДФУ 1.1, 2.9.5 с.70
Кількісне визначення	Використовують непрямий аналітичний метод. У флаконі місткістю 500 мг повинно бути не менше 490,53 мг препарату.	За п. 11.

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

1. Опис. Порошок від білого до практично білого кольору, ліофілізат.

2. Час розчинення. Вміст флакона з дозуванням 0,5 г розчиняють в 2 мл води для ін'єкцій. Час розчинення повинен бути не більше 20 с.

3. Прозорість розчину. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.4, 2.2.1.

Для визначення прозорості і ступеня каламутності рідин використовують однакові пробірки з безбарвного прозорого нейтрального скла з плоским дном, що мають внутрішній діаметр від 15 мм до 25 мм. Порівняння рідин проводять у розсіяному денному світлі через 5 хв після приготування еталона, переглядаючи зразки уздовж вертикальної осі пробірок на чорному фоні. Розсіяння світла має бути таким, щоб еталон I легко відрізнявся від води для ін'єкцій P, а еталон II легко відрізнявся від еталона I.

Еталон I складається з 5 мл основної суспензії та 95 мл *води P*. Еталон II складається з 10 мл основної суспензії та 90 мл *води P*.

Випробовувану рідину вважають прозорою, якщо вона витримує порівняння з водою P або розчинником, використовуваним при приготуванні випробовуваної рідини при перегляді за зазначених вище умов, або її каламутність не перевищує каламутності еталона I.

4. Кольоровість. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.4, 2.2.2, метод II.

Кольоровість розчину 500 мг в 5 мл води для ін'єкцій повинна бути не інтенсивніше еталона №6 .

5. Втрата в масі при висушуванні. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.4, 2.2.32.

Визначення втрати в масі при висушуванні виражають у відсотках. Певну кількість речовини поміщають у зважений бюкс, попередньо висушений. Речовину сушать до постійної маси. Висушування проводять:

а) «в ексікаторі»: висушування проводять над *фосфору(V) оксидом P* за атмосферного тиску і кімнатної температури;

б) «у вакуумі»: висушування проводять над *фосфору(V) оксидом P* за тиску від 1.5 кПа до 2.5 кПа і кімнатної температури.

Втрата в масі при висушуванні повинна становити не більше 5%.

6. Стерильність. Препарат повинен бути стерильним. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.4, 2.6.1.

Випробування на стерильність проводять в асептичних умовах, використовуючи метод мембранної фільтрації або метод прямого висівання. В даному випадку використовується метод мембранної фільтрації, оскільки природа випробуваного ЛЗ це дозволяє. Використовують целюлозно-нітратні фільтри з номінальним розміром пор не більше 0,45 мкм. Діаметр фільтра близько 50мм.

Вміст кожного з 10 флаконів з дозуванням 0,5 г дефероксаміну метансульфонату розчиняють у 5 мл води для ін'єкцій, переносять у колбу, яка містить 100 мл того самого розчинника і негайно фільтрують крізь один мембранний фільтр. Після закінчення фільтрації мембрану промивають не менше ніж трьома порціями того самого стерильного розчинника. Загальний об'єм промивної рідини не має перевищувати п'яти порцій по 100 мл на один фільтр. Після відмивання фільтр розрізають навпіл і вміщують у поживні середовища. Для анаеробних бактерій використовують рідке тіогліколеве середовище, а для грибів та аеробних бактерій використовують соєво-казеїнове середовище. Посіви інкубують не менше 14 діб. Соєво-казеїнове середовище інкубують при температурі від 20 °С до 25 °С. Тіогліколеве середовище інкубують при температурі від 30 °С до 35 °С.

Посіви переглядають періодично під час та після закінчення інкубаційного періоду, відмічаючи наявність візуально виявлюваного зростання мікроорганізмів.

Лікарський засіб витримує випробування на стерильність, якщо при візуальному обліку не виявляється зростання мікроорганізмів.

7. Пірогени. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.1, 2.6.8. Випробування на пірогени полягає у вимірюванні підвищення температури тіла, що спричинене внутрішньовенним введенням кролям стерильного розчину випробовуваного лікарського засобу.

Використовують здорових статевозрілих кролів обох статей масою не менше 1.5 кг, які отримують повноцінне та збалансоване харчування без антибіотиків та не втрачають масу тіла протягом тижня, що передує випробуванню.

У будь-якому випробуванні використовують лише тих кролів, вихідні температури яких не різняться між собою більш як на 1 °С. Кролів, що мають вихідну температуру вище 39.8 °С або нижче 38.0 °С, вилучають із випробування.

Випробування проводять, використовуючи групу з трьох тварин. Тест-доза становить 20 мг суми активних речовин в 1 мл води для ін'єкцій на 1 кг маси кролика. Вводять внутрішньовенно впродовж 60 с в крайову вену вуха кожного кроля. Зразок витримує випробування, якщо сумарна реакція не перевищує 1, 15 °С. Якщо сумарна реакція перевищує 2,65 °С, то препарат не витримує випробування. Якщо сумарна реакція не перевищує 2,65 °С, але перевищує 1,15 °С, то дослід повторюють на двох групах із трьох кролів.

Препарат повинен бути апірогенним.

8. Аномальна токсичність. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.4, 2.6.9.

Тест-доза 15 мг суми активних речовин в 0,5 мл води для ін'єкцій на одну мишу. Вводять внутрішньовенно впродовж від 15 с до 30 с кожній із п'яти здорових мишей масою від 17 г до 24 г.. Термін спостереження 24 год.

Зразок витримує випробування, якщо жодна з мишей не гине протягом 24 год. Якщо більше, ніж одна тварина гине, то зразок не проходить випробування. У разі загибелі однієї тварини, випробування повторюють. Зразок витримує випробування, якщо жодна з тварин у другій групі не загинула в межах зазначеного інтервалу часу.

9. Механічні включення. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.2, 2.9.19.

Використовують підхожий прилад, заснований на принципі світлоблокування, який дозволяє автоматично вимірювати кількість і розмір часток. Прилад калібрують, використовуючи підхожі сертифіковані матеріали порівняння, що складаються з дисперсій сферичних часток відомих розмірів — 10 мкм та 25 мкм.

Порошки для парентерального застосування розчиняють у воді, вільній від часток або у підходящому розчиннику, вільному від часток.

Відбирають 4 проби, не менше 5 мл кожна, і визначають кількість часток із розмірами, що дорівнюють або перевищують 10 мкм і 25 мкм. Виключають результат, одержаний для першої проби, і розраховують середню кількість часток у випробовуваному зразку.

Препарат витримує випробування, якщо середня кількість часток у випробовуваних одиницях не перевищує 25 в 1 мл для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 3 в 1 мл для часток розміром 25 мкм або більше.

10. Однорідність маси. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 1.1, 2.9.5.

Для випробування використовують 20 одиниць дозованого лікарського засобу. Видаляють паперову етикетку з поверхні контейнера. Контейнер миють і сушать. Потім контейнер розкривають і зразу зважують. Обережним постукуванням звільняють якомога повніше контейнер від вмісту, обполіскують його, якщо необхідно, водою *P* і потім 96 % спиртом *P* і сушать при температурі від 100 °С до 105 °С протягом 1 год або, якщо природа контейнера не дозволяє використовувати нагрівання при такій температурі, сушать при більш низькій температурі до постійної маси. Після цього охолоджують в ексикаторі і зважують. За різницею зважувань розраховують масу вмісту контейнера. Повторюють процедуру з іншими 19 контейнерами.

Лікарський засіб витримав випробування, якщо не більше двох індивідуальних мас відхиляються від середньої маси на величину, яка перевищує 10 %. При цьому жодна індивідуальна маса не має віділлтися від середньої маси на величину, що у два рази перевищує значення 10%.

11. Ідентифікація. Дане дослідження включає непрямий аналітичний метод визначення препарату Десферал у деяких фармацевтичних дозах за допомогою молекулярної абсорбції. Метод заснований на реакції між Десфералом та іоном церію (IV) з утворенням помаранчевого хелатного комплексу ($\lambda_{\text{max}} = 443 \text{ нм}$) при рН 6. Максимальний час реакції (10 хв).

Підготовка флаконів з Десфералом. 10 флаконів Десфералу з дозами 500 і 2000 мг перемішують. Беруть 100 мг суміші, розчиняють невеликою кількістю води в колбі об'ємом 100 мл, потім доводять об'єм водою до позначки.

Метод прямого калібрування. В декілька колб об'ємом 5 мл переносять від 0,017 до 1,83 мл Десфералу концентрацією 300 мг/л, потім до кожної з них додають по 1,5 мл стандартного розчину Се (IV) концентрацією 100 мг/л і доводять водою до об'єму 5 мл. В результаті реакції утворюється помаранчевий колір. Спектр поглинання при рН 6, становить 443 нм. Вимірюють абсорбцію та будують калібрувальну криву залежності абсорбції від концентрації Десфералу.

12. Кількісне визначення. Будують калібрувальний графік залежності абсорбції (див. пункт 11) від концентрації Десфералу. Максимальний спектр поглинання Десфералу виявлено при 215 нм.

Дані отримані під час дослідження показані в табл 10. 2 [122].

Таблиця 10.2

Результати дослідження

Назва лікарського засобу	Тип упаковки	Заявлена концентрація (мг на одиницю)	Знайдена концентрація (мг на одиницю)
Десферал – Novartis	Флакон	500	490,53

Pharma Ltd- Швейцарія			
Десферал – Novartis Pharma Ltd- Швейцарія	Флакони	2000	1988.22

ВИСНОВКИ

Отже сидерофори – це досить велика та різноманітна група природних сполук, які синтезують бактерії: півердин (основні продуценти представники роду *Pseudomonas*), дефероксамін (*S. pilosus* ATCC 19797, *S. parvulus* CBS548.68), альбоміцин (*S. griseus* SCAK3), шизокенін (*B. megaterium*) та ін.; гриби: копроген (*C. compactiuscula* FKR-0021, *P. nalgiovense* S1), феррихром (*P. commune* ЛНО), феррихроцин (*A. Fumigatus* AF293) та ін. Завдяки властивостям, що дозволяють зробити залізо недоступним для патогенів і тим самим унеможливлуючи їх нормальну життєдіяльність, сидерофори можуть використовувати в якості нових терапевтичних засобів для боротьби з патогенними мікроорганізмами.

Дефероксамін В – це природний сидерофор, що виробляється ґрунтовими бактеріями *Streptomyces pilosus* ATCC 19797 в кількості 5 г/л при 29 °С протягом 144 год, рН 7,5, 150 об/хв. Даний сидерофор входить до складу препарату Десферал як АФІ у вигляді метансульфонату дефероксаміну. Десферал використовують для лікування анемії, що вимагають переливання крові. Нещодавно вчені встановили, що дефероксамін В може не лише виводити надлишок заліза з організму людини, а й пригнічувати різні патогени в пацієнтів.

Згідно ТЕО за 2020 р, серед породиль, кількість хворих на анемії, що потребують видалення надлишку заліза з крові становить 6 653. Для визначення потужності виробництва було прийнято 10 % від їх загальної потреби, тобто 730 кг на рік. Таку кількість пропонується виробляти протягом 52 циклів, по 14 кг/цикл. Об'єм культуральної рідини, що зливається за цикл 5,8 м³.

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>		
Зм.	Арк.	№ документа	Підпис	Дата			
Розробив		Підг ерська Т.О.			Літ.	Арк.	Аркунів
Консульт.						143	161
Керівник		Карлаш Ю.В.			<i>Висновки</i> <i>Кафедра БТМ</i>		
Н. Контр.							
Затверд.		Стабніков В.П.					

В результаті очищення, що складається з таких стадій як: отримання неочищеного хлориду дефероксаміну В (відділення біомаси, іонообмін, концентрування, осадження та кристалізація, фільтрування кристалів), отримання очищеного хлориду дефероксаміну В (розчинення кристалів, знебарвлення активованим вугіллям, фільтрування суміші, кристалізація, фільтрування кристалів, висушування), отримання метансульфонату дефероксаміну (розчинення кристалів, іонообмін, стерильна фільтрація, розлив розчину по флаконах, ліофільне висушування, укупорювання флаконів, обкатка ковпачків), пакування та маркування, – отримують готовий продукт зі ступенем очищення 99,6 %. В якості лікарської форми препарату Десферал було обрано порошок для ін'єкцій, а в якості первинної упаковки – скляні флакони. Під час виробництва отримують 29 767 флаконів, які пакують у картонні коробки по 10 шт. В одному флаконі міститься 495 мг діючої речовини, що відповідає вимогам АНД.

Сьогодні вчені по всьому світу продовжують вивчати сидерофори та їх вплив на мікроорганізми. Відкривають нові види цих сполук та описують їх властивості. Особливо активно ведуться дослідження застосування сидерофорів в медицині, оскільки розробка нових антимікробних препаратів є вкрай важливою в сучасному світі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Khan A., Gupta A., Singh P. Siderophore-assisted cadmium hyperaccumulation in *Bacillus subtilis*. *Int Microbiol.* 2020; 23(2): 277-286. doi: 10.1007/s10123-019-00101-4.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31655918/>
2. Абатуров А.Е., Крючко Т.А. Медикаментозне обмеження доступності іонів заліза для патогенних бактерій (частина 1). *Здоров'я дитини.* 2018; Т.13. №4. С. 416-425.
<https://repo.dma.dp.ua/3259/1/%D0%9C%D0%B5%D0%B4%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B7%D0%BD%D0%BE%D0%B5%20%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5%20%D0%B4%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%83%D0%BF%D0%BD..pdf>
3. Phelan J. J., McQuaid K., Kenny C. Desferrioxamine Supports Metabolic Function in Primary Human Macrophages Infected With *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol.* 2020; 13(11); 836. doi: 10.3389/fimmu.2020.00836 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32477344/>
4. Bellotti D., Remelli M. Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules.* 2021; 26(11): 3255. doi: 10.3390/molecules26113255. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/11/3255/htm>
5. Li K. Chen W. Bruner S. D. Microbial siderophore-based iron assimilation and therapeutic applications. 2016; 29 (3): 377-88. DOI 10.1007/s10534-016-9935-3 <https://sci-hub.se/10.1007/s10534-016-9935-3>
6. Swayambhu G., Bruno M. Siderophore natural products as farmaceutic agents. *Current Opinion in Biotechnology.* 2021; 69: 242-251.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.01.021>

					<i>НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ</i>			
<i>Зм.</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ документа</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розробив</i>		<i>Підг ерська Т.О.</i>			<i>Список використаних джерел</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Архивів</i>
<i>Консульт.</i>							<i>145</i>	<i>161</i>
<i>Керівник</i>		<i>Карлаш Ю.В.</i>				<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. Контр.</i>								
<i>Затверд.</i>		<i>Стабніков В.П.</i>						

7. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія./ Т. П. Пирог. –К.: НУХТ, 2010. – 632 с.
8. Івах В. Бактерії роду *Pseudomonas* – активні продуценти сидерофорів мікробного походження. Збірник наукових праць: Проблеми та перспективи розвитку науки на початку третього тисячоліття у країнах СНД. 2013; С. 14-16.<https://docplayer.com/44285164-2-vitchiznyana-nauka-suchasniy-stan-aktualni-problemi-ta-perspektivi-rozvitku.html>
9. AlMatar M., Albarri O. , Makky E. A Glance on the Role of Bacterial Siderophore from the Perspectives of Medical and Biotechnological Approaches. *Curr Drug Targets*. 2020; 21(13):1326-1343. [doi: 10.2174/1389450121666200621193018](https://doi.org/10.2174/1389450121666200621193018).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32564749/>
10. Wang W., Zhe Chi, Liu G. Buzdar M. Chemical and biological characterization of siderophore produced by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2 and its antibacterial activity. *Biometals*. 2009;22:965-972. DOI 10.1007/s10534-009-9248-x<https://sci-hub.se/10.1007/s10534-009-9248-x>
11. Eickhoff M. J., Bassler B. L. *Vibrio fischeri* siderophore production drives competitive exclusion during dual-species growth. *Mol Microbiol*. 2020; 114 (2): 244-261. DOI: 10.1111/mmi.14509<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32259318/>
12. Albelda-Berenguera M., Monachona M., Joseph E.. Siderophores: From natural roles to potential applications. *Advances in Applied Microbiology*. 2019; 106: 193-225. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.12.001>
<https://sci-hub.se/10.1016/bs.aambs.2018.12.001>
13. Golonka R. · Yeoh B.S. · Vijay-Kumar M. The Iron Tug-of-War between Bacterial Siderophores and Innate Immunity. *J Innate Immun*. 2019; 11:

- 249-262. <https://doi.org/10.1159/000494627>
<https://www.karger.com/Article/FullText/494627>
14. Ringel M. T., Brüser T. The biosynthesis of pyoverdines; *Microbial Cell*. 2018; 5(10): 424-437. doi: 10.15698/mic2018.10.649 <http://microbialcell.com/researcharticles/the-biosynthesis-of-pyoverdines/>
15. Silva-Stenico M.E., Pamplona Silva C.S., Sturion Lorenzi A. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research*. 2011; 166 (3): 161-175. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.04.002> <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501310000364?via%3Dihub>
16. Shinji Kishimoto, Shinichi Nishimura, Masaki Hatano. Total Synthesis and Antimicrobial Activity of Chlorocatechelin A. *J Org Chem*. 2015; 80 (12): 6076-82. doi: 10.1021/acs.joc.5b00532 <https://sci-hub.se/10.1021/acs.joc.5b00532>
17. Kishimoto S., Nishimura S., Hattori A. Chlorocatechelins A and B from *Streptomyces* sp.: new siderophores containing chlorinated catecholate groups and an acylguanidine structure. *Org Lett*. 2014; 16(23): 6108-11. doi: 10.1021/o1502964s <https://sci-hub.se/10.1021/o1502964s>
18. Sontag B., Gerlitz M., Paululat T. Oxachelin, a novel iron chelator and antifungal agent from *Streptomyces* sp. GW9/1258. *J Antibiot*. 2006; 59(10): 659-63. doi: 10.1038/ja.2006.88 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17191682/>
19. Adler C., Corbalan N. S., Seyedsayamdost M. R. Catecholate Siderophores Protect Bacteria from Pyochelin Toxicity. *J Plos Org*. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046754>
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046754>
20. Sass G. , Miller Conrad L. C., Nguyen T. H., Stevens D. A. The *Pseudomonas aeruginosa* product pyochelin interferes with *Trypanosoma cruzi* infection and multiplication in vitro. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2020; 114 (7):492-

498. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz136><https://academic.oup.com/trstmh/article/114/7/492/5810320>
21. Saha, M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B.K., Bhattacharjee S., Tribedi P. Microbial siderophores and their potential applications. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2016;23:3984-99. doi: 10.1007/s11356-015-4294-0 <https://scihub.se/10.1007/s11356-015-4294-0>
22. Ye L., Hildebrand F., Dingemans J., Ballet S., Laus G., Matthijs S., Draft genome sequence analysis of a *Pseudomonas putida* W15Oct28 strain with antagonistic activity to Gram-positive and *Pseudomonas* sp. Pathogens. PLoS One. 2014; 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110038> <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110038>
23. Murugappan R. M., Aravindh A., Rajarobbia R., Karthikeyan M., Alamelu M. R. Optimization of MM9 Medium Constituents for Enhancement of Siderophoregenesis in Marine *Pseudomonas putida* Using Response Surface Methodology. Indian J Microbiol. 2012; 52(3): 433-41. doi: 10.1007/s12088-012-0258-y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460122/>
24. Ивах В.В., Русакова М.Ю. Значение сидерофоров ризосферных псевдомонад при создании препаратов для биологической защиты растений. Матеріали IV наук.-практич. всеукр. конф. 2013. С.1-3. http://eprints.zu.edu.ua/14149/1/%D0%9A%D0%BE%D0%BF%D0%B8%D1%8F_%D0%A0%D0%BE%D0%B1%D0%BE%D1%87%D0%B8%D0%B9_%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D1%84%D0%B5%D1%80.pdf
25. Ивах В.В., Русакова М.Ю. Роль сидерофорів у механізмах антагоністичної активності псевдомонад. Збірка матеріалів VIII Всеукр. студ. наук. конф. „Сучасні проблеми природничих наук”. 2013. С. 64. http://www.ndu.edu.ua/images/stories/story/2013/2013_fulltext.pdf
26. Шульга О., Джогель Д., Карпанко О., Пристай М., Вільданова Р. Поверхнево-активні комплекси для штаму *Pseudomonas aeruginosa*

- JRV-L. 2017. C. 179-185.
http://ena.lp.edu.ua/bitstream/ntb/40639/2/2017n868_Shulga_O-Surface_active_complexes_179-185.pdf
27. Chuljerm H., Deedom M., Fucharoen S. Characterization of two siderophores produced by *Bacillus megaterium*: A preliminary investigation into their potential as therapeutic agents. BBA - General Subjects. 2020; 1864(10):1-28. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129670><https://sci-hub.se/10.1016/j.bbagen.2020.129670>
28. Chakraborty K, Francis A., Chakraborty R. Marine macroalga-associated heterotrophic *Bacillus velezensis*: a novel antimicrobial agent with siderophore mode of action against drug-resistant nosocomial pathogens. Arch Microbiol. 2021; 203(9): 5561-5575. doi: 10.1007/s00203-021-02513-1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34436634/>
29. Sheng M.M., Jia H.K., Zhang G.Y., Zeng L.N. Siderophore Production by Rhizosphere Biological Control Bacteria *Brevibacillus brevis* GZDF3 of *Pinellia ternata* and Its Antifungal Effects on *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. 2020; 30(5): 689-99. doi:
10.4014/jmb.1910.10066<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32482934/>
30. Olshvang E., Szabeszcyk A., Kozłowski H., Hadar Y. Biomimetic ferrichrome: structural motifs for switching between narrow- and broad-spectrum activities in *P. putida* and *E. coli*. Dalton Trans. 2015; 44(48): 20850-8. doi:
10.1039/c5dt02685g<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/DT/C5DT02685G>
31. Szigeti Z. M., Szaniszló S., Fazekas E., Gyemant G. Optimization of triacetylfusarinine C and ferricrocin productions in *Aspergillus fumigatus*. Acta Microbiol Immunol Hung. 2014; 61(2):107-19. doi:
10.1556/AMicr.61.2014.2.2<https://sci-hub.se/10.1556/AMicr.61.2014.2.2>

32. Ouchi T., Watanabe Y., Nonaka K., Muramatsu R. Clonocoprogens A, B and C, new antimalarial coprogens from the Okinawan fungus *Clonostachys compactiuscula* FKR-0021. *J Antibiot (Tokyo)*. 2020; 73(6): 365-371. doi: 10.1038/s41429-020-0292-7 <https://sci-hub.se/10.1038/s41429-020-0292-7>
33. Wang W. L., Chi Z. M., Chi Z., Li J., Wang X. H. Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. *Bioresour Technol*. 2009; 100(9): 2639-41. doi: 10.1016/j.biortech.2008.12.010 <https://sci-hub.se/10.1016/j.biortech.2008.12.010>
34. Sinatra J. A., Colby K. Notes from the Field: Fatal *Vibrio anguillarum* Infection in an Immunocompromised Patient — Maine, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018; 67(34): 962-63. doi: 10.15585/mmwr.mm6734a5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6124819/>
35. Emri T., Toth V., Nagy C. T. Towards high-siderophore-content foods: optimisation of coprogen production in submerged cultures of *Penicillium nalgiovense*. *J Sci Food Agric*. 2013; 93(9): 2221-8. DOI: 10.1002/jsfa.6029 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23349056/>
36. Ronan J. L., Kadi N., McMahon S. A. Desferrioxamine biosynthesis: diverse hydroxamate assembly by substrate-tolerant acyl transferase DesC. *The royal society*. 2018; 337 (1748). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0068> <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2017.0068>
37. Wang L. , Li X., Mu Y. The iron chelator desferrioxamine synergizes with chemotherapy for cancer treatment. *J Trace Elem Med Biol*. 2019; 56:131-138. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.07.008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31466045/>
38. Moon J.H., Herr Y., Kim S. W. In vitro activity of deferoxamine against *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*. 2011; 323(1): 61-67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02357.x> <https://academic.oup.com/femsle/article/323/1/61/451373>

39. Nathan P. Wiederhold. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2017; 1-32. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.09.002><https://scihub.se/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.002>
40. Akemi Kita, Mikihiro Fujiya, Hiroaki Konishi, Probiotic-derived ferrichrome inhibits the growth of refractory pancreatic cancer cells; *International Journal of Oncology*. 2020; 721-732. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5096><https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2020.5096>
41. Takuya Iwama, Mikihiro Fujiya, Hiroaki Konishi, Bacteria-derived ferrichrome inhibits tumor progression in sporadic colorectal neoplasms and colitis-associated cancer; *Cancer Cell Int*. 2021. DOI: 10.1186/s12935-020-01723-9<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33407519/>
42. Hiroaki Konishi, Mikihiro Fujiya, Hiroki Tanaka, Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis; *Nat Commun*. 2016. doi: 10.1038/ncomms12365<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27507542/>
43. Абатуров А.Е., Крючко Т.А. Медикаментозное ограничение доступности ионов железа для патогенных бактерий (часть 2). *Здоровье ребенка*. 2018; Т.13. №5. С. 188-196. <http://www.mif-ua.com/archive/article/46442>
44. Gumienna-Kontecka E., Peggy L Carver, Building a Trojan Horse: Siderophore-Drug Conjugates for the Treatment of Infectious Diseases; *Met Ions Life Sci*. 2019; 19. doi: 10.1515/9783110527872-013<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30855108/>
45. Górska A., Sloderbach A., Piotr Marszał M. Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy; *Trends Pharmacol Sci*. 2014; 35(9): 442-9. doi: 10.1016/j.tips.2014.06.007<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25108321/>

46. Abdul-Mutakabbir J. C, Alosaimy S. Cefiderocol: A Novel Siderophore Cephalosporin against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens; *Pharmacotherapy*. 2020; 40(12): 1228-1247. doi: 10.1002/phar.2476 <https://sci-hub.se/10.1002/phar.2476>
47. Bonomo R. A. Cefiderocol: A Novel Siderophore Cephalosporin Defeating Carbapenem-resistant Pathogens. *Clin Infect Dis*. 2019; 69: 519-520. doi:10.1093/cid/ciz823 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31724046/>
48. Paquette S. J., Reuter T. *Escherichia coli*: Physiological Clues Which Turn On the Synthesis of Antimicrobial Molecules. *Vet Sci*. 2020; 7(4). doi: 10.3390/vetsci7040184 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233401/>
49. Braun V., Pramanik A., Gwinner T. Sideromycins: tools and antibiotics; *BioMetals*. 2009; 22 (3): 3-13. DOI: 10.1007/s10534-008-9199-7 <https://link.springer.com/article/10.1007/s10534-008-9199-7>
50. Матвеева Л. Пробиотичні бактерії роду *Bacillus*: нормалізація мікробіоценозу кишечника. *Гастроентерологія: наукові праці*. 2019; № 4 (449). С. 10. http://health-ua.com/multimedia/userfiles/files/2019/ZU_04_2019/ZU_2019_04_str_10.pdf
51. Chakraborty K., Kizhakkekalam V. K., Joy M. Bacillibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022;106(1):329-340. doi: 10.1007/s00253-021-11632-0. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34913995/>
52. Mular A., Shanzer A., Kozłowski H. Cyclic Analogs of Desferrioxamine E Siderophore for ⁶⁸Ga Nuclear Imaging: Coordination Chemistry and Biological Activity in *Staphylococcus aureus*. *Inorg Chem*. 2021; 60(23):17846-17857. doi: 10.1021/acs.inorgchem. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34783539/>
53. Mattos A. L., Constantino V. R. Desferrioxamine-cadmium as a 'Trojan horse' for the delivery of Cd to bacteria and fungi. *J Trace Elem Med Biol* .

- 2013; 27(2):103-8. doi: 10.1016/j.jtemb.2012.09.001.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23122029/>
54. Шкут О.О., Карпов О.В. Возможности використання сидерофорів. Наукові праці НУХТ. 2017; Т. 23. №1. С. 49-57.http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?I21DBN=LINK&P21DBN=UJRN&Z21ID=&S21REF=10&S21CNR=20&S21STN=1&S21FMT=ASP_meta&C21COM=S&S21P03=FILA=&S21STR=Npnukht_2017_23_1_7
55. Khan A., Singh P., Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. Microbiological Research. 2018; 212-213: 103-111.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012><https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501317306730>
56. Nathan P. The Antifungal Arsenal: Alternative Drugs and Future Targets. International Journal of Antimicrobial Agents. 2017; 1-32.
<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.09.002>. <https://sci-hub.se/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.002>
57. Negash K. H., Norris K. S. Siderophore-Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs? Molecules. 2019; 24(18): 3314. doi: 10.3390/molecules24183314.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31514464/>
58. Леонов В.В., Миронов А.Ю., Ананьина И.В. микробные сидерофоры: строение, свойства и функции. 2016. С. 24-37.
<https://cyberleninka.ru/article/n/mikrobnye-siderofory-stroenie-svoystva-i-funktsii/viewer>
59. Gáll T., Lehoczki G., Gyémánt G. Optimization of desferrioxamine E production by *Streptomyces parvulus*. Acta Microbiol Immunol Hung. 2016; 63(4): 475-498. DOI: 10.1556/030.63.2016.029 <https://sci-hub.se/10.1556/030.63.2016.029>
60. Chiani M., Akbarzadeh A., Farhangi A. Production of Desferrioxamine B (Desferal) using Corn Steep Liquor in *Streptomyces pilosus*. Pakistan

- Journal of Biological Sciences. 2010; 13: 1151-1155. DOI:
10.3923/pjbs.2010.1151.1155
<https://scialert.net/fulltext/?doi=pjbs.2010.1151.1155>
61. Chiani M., Akbarzadeh A., Farhangi A. Optimization of Culture Medium to Increase the Production of Desferrioxamine B (Desferal) in *Streptomyces pilosus*. Pak J Biol Sci. 2010; 13(11): 545-550. doi:
10.3923/pjbs.2010.546.550
<https://scialert.net/fulltext/?doi=pjbs.2010.546.550>
62. Mortazavi M., Akbarzadeh A. Improvement of Desferrioxamine B production of *Streptomyces pilosus* ATCC 19797 with use of protease inhibitor and minerals related to its activity. Ind J Clin Biochem. 2012; 27(3): 274-277. doi: 10.1007/s12291-012-0197-8
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26405387/>
63. Aditya Kulkarni, Yu Zeng, Wei Zhou, A Branch Point of *Streptomyces* Sulfur Amino Acid Metabolism Controls the Production of Albomycin. Appl Environ Microbiol. 2015; 82(2): 467-77. doi: 10.1128/AEM.02517-15
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.02517-15>
64. Vindeirinho J. M., Soares H., Soares E. V. Modulation of Siderophore Production by *Pseudomonas fluorescens* Through the Manipulation of the Culture Medium Composition. Appl Biochem Biotechnol. 2021; 193(3): 607-18. doi: 10.1007/s12010-020-03349-z <https://sci-hub.se/10.1007/s12010-020-03349-z>
65. Shaikh S. S., Wani S. J., Sayyed R. Z. Statistical-based optimization and scale-up of siderophore production process on laboratory bioreactor. Biotech. 2016; 6(1): 69. doi: 10.1007/s13205-016-0365-2
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28330140/>
66. Русакова М.Ю., Галкін Б.М., Філіпова Т.О., Івах В.В., Тітлянов О.О. Продукція сидерофорів бактеріями роду *Pseudomonas*. Мікробіологія і біотехнологія. 2014; № 4. С. 88-89.
https://www.researchgate.net/publication/320239256_THE_SIDEROPHOR

[E PRODUCTION BY PSEUDOMONAS BACTERIA/fulltext/59d6db1d0f7e9b42a6aa0b45/THE-SIDEROPHORE-PRODUCTION-BY-PSEUDOMONAS-BACTERIA.pdf](https://www.researchgate.net/publication/328111111/E_PRODUCTION_BY_PSEUDOMONAS_BACTERIA/fulltext/59d6db1d0f7e9b42a6aa0b45/THE-SIDEROPHORE-PRODUCTION-BY-PSEUDOMONAS-BACTERIA.pdf)

67. Русакова М. Ю. Утворення сидерофорів клітинами синьогнійної палички за впливу препарату «Бактеріофаг псевдомонас аеругіноза». Вісник Львівського університету. 2016; №71. С. 222-229.
<http://prima.lnu.edu.ua/faculty/biologh/wis/71/6/22/22.pdf>
68. Левченко В.В., Русакова М.Ю. Характеристика продукції сидерофорів деякими штамми псевдомонад. Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології. Матеріали VIII наук.-практич. конф. 2019. С.292-295.
<http://dspace.onu.edu.ua:8080/bitstream/123456789/29336/3/292-295.pdf>
69. Santos S, Neto I.F., Machado M. D., Soares H.M., Soares E. V. Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditions. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014; 172(1): 549-60. doi: 10.1007/s12010-013-0562-y <https://sci-hub.se/10.1007/s12010-013-0562-y>
70. Schwabeab R., Sengesc C. H., Bandowc J. E., Heine T. Cultivation dependent formation of siderophores by *Gordonia rubripertincta* CWB2. *Microbiological Research.* 2020; 238. doi: 10.1016/j.micres.2020.126481
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501320303499?via%3Dihub>
71. Paquette S. J., Reuter T. *Escherichia coli*: Physiological Clues Which Turn On the Synthesis of Antimicrobial Molecules. *Vet Sci.* 2020; 7(4). doi: 10.3390/vetsci7040184 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233401/>
72. Hussein K.A., Joo J.H. Zinc Ions Affect Siderophore Production by Fungi Isolated from the *Panax ginseng* Rhizosphere. *J Microbiol Biotechnol.* 2019; 29(1): 105-113. doi: 10.4014/jmb.1712.12026
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30304916/>
73. Szigeti Z. M., Szaniszló S., Fazekas E., Gyemant G. Optimization of triacetylfusarinine C and ferricrocin productions in *Aspergillus fumigatus*.

- Acta Microbiol Immunol Hung.* 2014; 61(2):107-19. doi:
10.1556/AMicr.61.2014.2.2 <https://sci-hub.se/10.1556/AMicr.61.2014.2.2>
74. Emri T., Toth V., Nagy C. T. Towards high-siderophore-content foods: optimisation of coprogen production in submerged cultures of *Penicillium nalgiovense*. *J Sci Food Agric.* 2013; 93(9): 2221-8. DOI: 10.1002/jsfa.6029 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23349056/>
75. Ouchi T., Watanabe Y., Nonaka K., Muramatsu R. Clonocoprogens A, B and C, new antimalarial coprogens from the Okinawan fungus *Clonostachys compactiuscula* FKR-0021. *J Antibiot (Tokyo).* 2020; 73(6): 365-371. doi: 10.1038/s41429-020-0292-7 <https://sci-hub.se/10.1038/s41429-020-0292-7>
76. Rivera G., Beamish C.R., Wenciewicz T.M. Immobilized FhuD2 Siderophore-Binding Protein Enables Purification of Salmycin Sideromycins from *Streptomyces violaceus* DSM 8286. *ACS Infect Dis.* 2018; 4(5): 845-859. doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00015 <https://sci-hub.se/10.1021/acsinfecdis.8b00015>
77. Egbers P. H., Harder T., Koch B. P., Tebben J. Siderophore purification with titanium dioxide nanoparticle solid phase extraction. *Analyst.* 2020; 145(22):7303-11. doi: 10.1039/d0an00949k <https://sci-hub.se/10.1039/d0an00949k>
78. Duckworth O. W., Markarian D. S, Parker D. L., Harrington J. M. A two-column flash chromatography approach to pyoverdinin production from *Pseudomonas putida* GB1. *J Microbiol Methods.* 2017; 135:11-13. doi: 10.1016/j.mimet.2017.01.019 <https://sci-hub.se/10.1016/j.mimet.2017.01.019>
79. Нормативно-директивні документи МОЗ України. Десферал. Електронний ресурс. Режим доступу: <https://mozdocs.kiev.ua/likiview.php?id=2414>
80. Prisciandaro M., Adriaticob A., Lanciab A., Marzocchellab A. Thermodynamic Equilibrium Study of Deferoxamine Salting Out

- Crystallization. *Aidic*. 2013; 32: 2179-2184. Doi: 10.3303/CET1332364
<https://www.aidic.it/cet/13/32/364.pdf>
81. Novartis Pharma Stein AG. Desferal. Електронний ресурс. Режим доступу:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/016267s044lbl.pdf
82. Nuzzi R., Geronazzo G., Tridico F., Nuzzi A. Long-Term Effects of Iron Chelating Agents on Ocular Function in Patients with Thalassemia Major. *Clin Ophthalmol*. 2021; 15: 2099-2109. doi: 10.2147/OPTH.S300974.
<https://www.dovepress.com/long-term-effects-of-iron-chelating-agents-on-ocular-function-in-patie-peer-reviewed-fulltext-article-OPTH>
83. Центр медичної статистики МОЗ України. [Електронний ресурс].
Режим доступу: <http://medstat.gov.ua>
84. Богдан І.С. Анемія. Як з'ясувати причину? *Журнал Внутрішня медицина*. 2009, 4(16). <http://www.mif-ua.com/archive/article/10369>
85. Державна служба статистики України. [Електронний ресурс]. Режим доступу: http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2020/gdv/dg/sdhd/Arh_sdhd.htm
86. Pat. 5 374 771 USA. Process for the preparation of high-purity deferoxamine salts/ Konyari Z., Keri V., Kovacs A., Horkay S. Publ. 20.12.94.
87. Перцев І.М. Фармацевтична енциклопедія. Лікарська форма. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/2076>
88. Загальна рецептура. Рекомендації для студентів медич. та фарм. факульт. оч. та заоч. форми навч. 2010, 36 с. [Електронний ресурс].
Режим доступу:
http://dspace.zsmu.edu.ua/bitstream/123456789/2896/1/10Zagal_recep.pdf
89. DESFERAL[®]. Product monograph. 2019, 26 с. [Електронний ресурс].
Режим доступу:

[https://www.ask.novartispharma.ca/download.htm?res=desferal_scrip_e.pdf
&resTitleId=736](https://www.ask.novartispharma.ca/download.htm?res=desferal_scrip_e.pdf&resTitleId=736)

90. Шевченко В.О. Полімерні контейнери — первинне пакування парентеральних розчинів. *Український біофармацевтичний журнал*. 2010, 1(6): 10-13.
91. Пакування та маркування готових лікарських засобів. 2020, 116-141. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tovaroved.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2020/06/GLZ.pdf>
92. Замкова А. В. Фасування, пакування, маркування готових лікарських форм. перспективи упакування ГЛЗ. Метод. рекомендації з дисцип. технологія ліків. осв. ступ. «магістр» спец. 226 «Фармація, промислова фармація заоч. форми навч. О – ОНМедУ. 2021, 26 с.
93. Ямнюк О.К., Гурєєва С.М. Сучасні види упаковки готових лікарських засобів. *Сучасні матеріали і технології виробництва виробів широкого вжитку та спеціального призначення*. 2018, 521 – 523. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://er.knutd.edu.ua/bitstream/123456789/11537/1/NRMSE2018_V1_P521-523.pdf
94. Замкова А. В. Вимоги до стерильної продукції. Визначення основних показників якості ампульного скла. Метод. рекомендації з дисцип. Промислова технологія лз. осв. ступ. «магістр» спец. 226 «Фармація, промислова фармація денної форми навч. О – ОНМедУ. 2021, 22 с.
95. Держлікслужба. Інформація щодо маркування, що наноситься на етикетку, зовнішню та внутрішню упаковку лікарського засобу. 2020. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.dls.gov.ua/for_subject/%D1%96%D0%BD%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%BC%D0%B0%D1%86%D1%96%D1%8F-%D1%89%D0%BE%D0%B4%D0%BE-%D0%BC%D0%B0%D1%80%D0%BA%D1%83%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%BD%D1%8F-%D1%89%D0%BE-%D0%BD%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D1%81%D0%B8/

96. Дмитрієвський Д. І. Технологія лікарських препаратів промислового виробництва - В: НОВА КНИГА, 2008. - 280 с.
<https://buklib.net/books/36222/>
97. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: конспект лекцій - К: НУХТ, 2019. – 252 с.
98. Методичні рекомендації щодо застосування засобу «Біомой».
[Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://farmakos.nethouse.ua/static/doc/0000/0000/0082/82184.itby47bitk.pdf>
99. МОЗ України Наказ № 502 від 14.12.2001 Про затвердження методичних рекомендацій щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог та проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. [Електронний ресурс] Режим доступу: https://zakononline.com.ua/documents/show/41907___487517
100. Методичні рекомендації щодо застосування засобу «Хлорантоін».
[Електронний ресурс] Режим доступу:
<https://farmakos.nethouse.ua/static/doc/0000/0000/0082/82185.2ae4iqrdtm.pdf>
101. Методичні вказівки щодо застосування засобу Мікробак® форте (Mikrobac® forte) з метою дезінфекції. [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.xn--80aaolbmrsqie.com.ua/upl/admin_upload/bode/mikrobak_forte.pdf.
102. Інструкція по використанню засобу «Гембар» [Електронний ресурс] Режим доступу: http://www.attis.com.ua/files/gembar_usage.doc.
103. Поводзинський В.М., Шибецький В.Ю. Устаткування асептичних і неасептичних виробництв лікарських засобів. Конспект лекцій – К.: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2017. – 251с.
104. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв: конспект лекцій – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.

105. МОЗ України Настанова 42-4.6 від 2015. Вимоги до виготовлення стерильних та асептичних лікарських засобів в умовах аптек.
[Електронний ресурс] Режим доступу: <https://atl.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2022/09/vimogi-do-vigotovlennja-sterilnih-likarskih-zasobiv-umovah-aptek.pdf>
106. Чуєшов В. І., Хохлова Л. М., Ляпунова О. О. Технологія ліків промислового виробництва: Підруч. —Х.:Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. — 720с.
107. Чуєшов В.І. Промислова технологія ліків, т.1,2. Харків:“НФаУ” - 2002, 1272 с.
108. Challis G. L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* . 2005; 6(4): 601-11. doi: 10.1002/cbic.200400283.
<https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1002/cbic.200400283>
109. Drechsel H, Jung G. Peptide siderophores. *J Pept Sci*. 1998; 4(3):147-81. doi: 10.1002/(SICI)1099-1387(199805)4:3%3C147::AID-PSC136%3E3.0.CO;2-C. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9643626/>
110. Streptomycetes. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.britannica.com/science/actinomycete>
111. Буценко Л.М., Пенчук Ю.М. Пирог Т.П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: Навч. посіб. – К: НУХТ, 2010. – 323 с.
112. Грачова І.М., Кривова А.Ю. Технологія ферментних препаратів. – 3-е изд., перероб. и доп. – М: Элевар, 2000, 512 с.
113. Тертишний О.О., Тертишна О. В. Конспект лекцій з курсу «Процеси та апарати хімічної технології»– Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2011. – 79 с.
114. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: метод. рекомендації – К.: НУХТ, 2016. – 83 с.
115. ТОВ «ГК ЕВРОХІММАШ К.О.» [Електронний ресурс] Режим доступу: http://euromash.kiev.ua/ua/druk_filtr_ua.php

116. Ведута В. В. Практикум з органічної хімії – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2019. – 80 с.
http://dspace.onu.edu.ua:8080/bitstream/123456789/25025/1/practik_chem.pdf
117. Шестопалов О. В., Пітак І. В. Аналіз існуючих процесів та апаратів біологічної очистки газових викидів. *Technology audit and production reserves*. 2014, 3/5(17): 49-52.
118. Садецький В. М. Переробка органічних відходів агропромислового комплексу в біодобриво «біогумус» методом вермикультивування. *Збірник наукових праць*. 2009, 17:93-97.
119. Долина Л.Ф. Очистка стічних вод від біогенних елементів. – Дніпро.: Континент. 2011. - 198с.
120. Дефероксамін. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://medzai.net/ru/substances/deferoksamin-474.php>
121. Десферал. [Електронний ресурс]. Режим доступу:
<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=a7174843-5965-49fc-b842-f7eff7b48bbc>
122. Ashraf S. R. Indirect Method for Determination Desferal in Pure and Pharma-ceutical Formulations Using Cerium (IV) As a Chelating Element. *Journal of Global Pharma Technology*. 2019; 11(7):15-20.
https://www.researchgate.net/publication/339177690_Indirect_Method_for_Determination_Desferal_in_Pure_and_Pharmaceutical_Formulations_Using_Cerium_IV_As_a_Chelating_Element

До джерела [60]

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 63 (4), pp. 475–489 (2016)
DOI: 10.1556/030.63.2016.029

OPTIMIZATION OF DESFERRIOXAMINE E PRODUCTION BY *STREPTOMYCES PARVULUS*

TAMÁS GÁLL^{1*}, GÁBOR LEHOCZKI², GYÖNGYI GYÉMÁNT², TAMÁS EMRI³,
ZSUZSA M. SZIGETI³, GYÖRGY BALLA^{1,4}, JÓZSEF BALLA⁵ and ISTVÁN PÓCSI³

¹MTA-DE Vascular Biology, Thrombosis and Hemostasis Research Group, Hungarian
Academy of Sciences, Debrecen, Hungary

²Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Science and Technology,
University of Debrecen, Debrecen, Hungary

³Department of Biotechnology and Microbiology, Faculty of Science and Technology,
University of Debrecen, Debrecen, Hungary

⁴Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen,
Hungary

⁵Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Debrecen,
Debrecen, Hungary

(Received: 19 April 2016; accepted: 16 June 2016)

Siderophores are produced by a number of microbes to capture iron with outstandingly high affinity, which property also generates biomedical and industrial interests. Desferrioxamine E (DFO-E) secreted by streptomycetes bacteria can be an ideal candidate for iron chelation therapy, which necessitates its cost-effective production for *in vitro* and animal studies. This study focused on the optimization of DFO-E production by *Streptomyces parvulus* CBS548.68. Different combinations of various carbon and nitrogen sources as well as the addition of 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid (MOPS) markedly affected DFO-E yields, which were attributed, at least in part, to the higher biomass productions found in MOPS-supplemented cultures. In MOPS-supplemented glucose and sodium glutamate medium, DFO-E productions as high as $2,009 \pm 90$ mg/l of culture medium were reached. High-performance liquid chromatography analysis demonstrated that a simple two-step purification process yielded DFO-E preparations with purities of ~97%. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis showed that purified DFO-E always contained traces of desferrioxamine D2.

Siderophore production

All glasswares were rinsed with 36% HCl and were washed subsequently with distilled water to remove any residual iron. Siderophore production was carried out in glass Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 50 ml aliquots of production medium, which were inoculated with 1.9×10^8 CFU spores from glycerol stock, and were incubated at 28 °C and at 4.2-Hz shaking frequency. The basic siderophore production medium (pH 7.5) contained 5 g/l L-Asp or Na-L-glutamate monosodium salt monohydrate (Na-L-Glu), 5 g/l L-lysine monohydrochloride (L-Lys), 2 g/l K_2HPO_4 , 2 g/l K_2SO_4 , 1 g/l NaCl, 0.1 g/l anhydrous $CaCl_2$, 0.2 g/l anhydrous $MgSO_4$, 0.1 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, and 2.5%

Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 63, 2016

478

GÁLL ET AL.

carbon source (glucose, glycerol, or soluble starch). The buffered siderophore production medium contained the same ingredients as the basic medium, but it was also supplemented with 21 g/l MOPS and autoclaved for 15 min at 121 °C. Carbon sources were autoclaved separately as 25% stock solutions. In order to determine

two-factor-two-level response surface analysis are summarized in Table III. Three repeats were included at the center of the design, and the total number of the test runs was 11. Regression coefficients, their *t* values, and determination coefficient (R^2) for the full second-order polynomial model of DFO-E production are presented in Table IV. The regression model for DFO-E production was significant ($p = 0.01912$) with a satisfactory value of R^2 (0.89). The estimated DFO-E production at optimal Na-L-Glu (12.96 g/l) and L-Lys (13.60 g/l) concentrations was 2,130 mg/l, which corresponded well with the measured $2,009 \pm 90$ mg/l DFO-E production ($n = 3$) at 13 g/l Na-L-Glu and 14 g/l L-Lys concentrations.]

Table IV. Regression of coefficients, *p* values, determination coefficient (R^2), and *F*-statistic of a full second-order polynomial model for DFO-E production

Term ^a	Coefficient	<i>p</i> value
b0	2.033	4.524×10^{-7}
b1	0.138	0.01383
b2	0.113	0.02871
b12	0.100	0.11637
b11	-0.154	0.01777
b22	-0.104	0.06578

$R^2 = 0.89$

F-statistic: 8.124 (Degrees of freedom 5 and 5), *p* value = 0.01912

^a $Y = b_0 + b_1Z_1 + b_2Z_2 + b_{11}Z_1^2 + b_{12}Z_1Z_2 + b_{22}Z_2^2$, where *Y* is DFO-E (g/l) production, and *Z*₁ and *Z*₂ are Na-L-Glu and L-Lys content of the media (given in coded values), respectively.

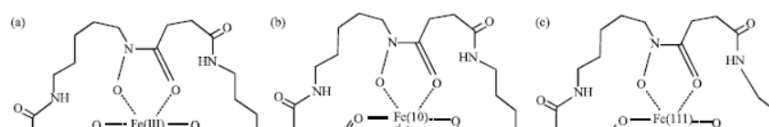
До джерела [61]

Research Article

Optimization of Culture Medium to Increase the Production of Desferrioxamine B (Desferal) in *Streptomyces pilosus*

M. Chiani, A. Akbarzadeh, A. Farhangi, M. Mazinani, Z. Saffari, K. Emadzadeh and M.R. Mehrabi

In this regard, the bacterium was cultured in soybean broth medium (2% soybean flour and 2% mannitol) for 8 days at 29°C under shaking (150 rpm). Every 8 h, 1 mL sample was withdrawn and centrifuged at 4000 rpm (4°C). The supernatant was diluted ten times with distilled water and 5 mg mL⁻¹ of ammonium ferric sulfate in 1% sulfuric acid was added to a final concentration of 20%. The absorbance of Desferal was read at 430 nm and its concentration was found by comparing the ODs with the standard curve prepared with different concentrations of Desferal.

**RESULTS**

In this study we focused on the media ingredients and tried to modify its composition in direction with improvement for increasing the yield of Desferal production. In this regard, we experimented several media and concluded that the soybean is the best medium and has the highest productivity. This medium has considered as base medium and the additives that mentioned above with distinct quantities were added to the medium.

Present results showed that some additives with distinct concentration have the most significantly effects on Desferal synthesis. Compare to control KH_2PO_4 (32 g L⁻¹), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (4 g L⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6 g L⁻¹), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 g L⁻¹), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.004 g L⁻¹), Tris-base (100 mM) and threonine (0.1 g L⁻¹) increased the desferal production about 7.6, 5, 5, 4, 3, 2 and 2 times respectively (Fig. 4). Arginine (0.1 g L⁻¹) and glycine (0.1 g L⁻¹) also to some extent had a positive effect on Desferal production. Combination of positive-effect additives also increased the Desferal synthesis (about 7.8 times in compare to control).

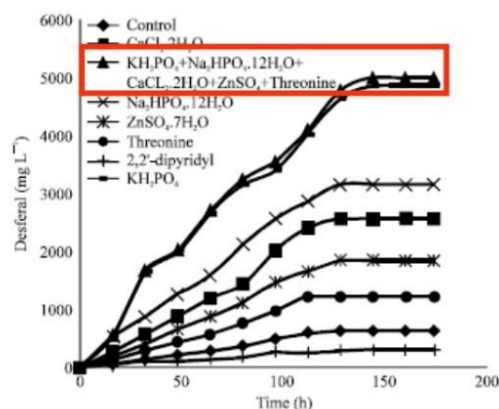


Fig. 4: Desferal production curve of *S. pilosus* (ATCC 19797) with different additives

До джерела [62]

Culture Condition

Protease production in batch culture of *S. pilosus* was studied. The bacterial strain was cultured in 250 ml of Erlenmeyer flasks containing 100 ml soybean broth medium consisting (g/l): soybean flour, 20; D-mannitol 20; the initial pH of the medium was adjusted to about 7/5 with sterile sodium hydroxide solution. Erlenmeyer flask experiments were carried out at 29°C and 150 rpm for 9 day, ten Erlenmeyer flask for each days and control separately. The cells at each day were removed from the culture medium by gentle filtration with 0.22 µm filters and were dried in incubator and the its pH were determined.

Each of the ten flasks was removed at the determined days and analyzed the protease production and residual DFO was estimated. The contents of each flask were centrifuged at 4°C and this supernatant was used as the source of Desferal or crude enzyme. The culture was subjected to centrifugation (4000×g for 10 min to remove cells).

Each of the ten flasks was removed at the determined days and analyzed the protease production and residual DFO was estimated. The contents of each flask were centrifuged at 4°C and this supernatant was used as the source of Desferal or crude enzyme. The culture was subjected to centrifugation (4000×g for 10 min to remove cells).

Determination of Produced Desferrioxamine B

The amount of DFO was estimated calorimetrically at 430 nm [3, 4]. The standard curve was provided for Desferal. The assay was applied an iron (III) chloride assay consisted in adding 0.9 ml of filtered medium or supernatant medium to 0.1 ml of FeCl₃ reagent (0.1% v/v iron chloride), then measuring the absorbance (430 nm) using a 1 cm quartz cell was used.

Protease Activity by Agar Plate Assay

The casein plate assay was used as test for the presence of alkaline protease. An agar casein medium was used for the protease activity assay. The samples of cultured medium cell free were applied onto a Luria–Bertani (LB)-agar medium containing 1% casein and incubated overnight [5].

Protease Assay

The alkaline serine protease of *S. pilosus* was characterized spectrophotometrically by the casein-Folin phenol method [6, 7]. The protease was assayed at 37°C in 100 mM tris-base buffer. One milliliter of appropriately diluted enzyme was incubated with 1 ml of 0.5% casein solution (prepared in tris base buffer) for 10 min at 37°C. The reaction was arrested by the addition of 200 µl of 5% trichloroacetic acid (TCA). The contents were centrifuged after 15 min at

(Table 1).

Results and Discussion

pH Variation During Protease Production

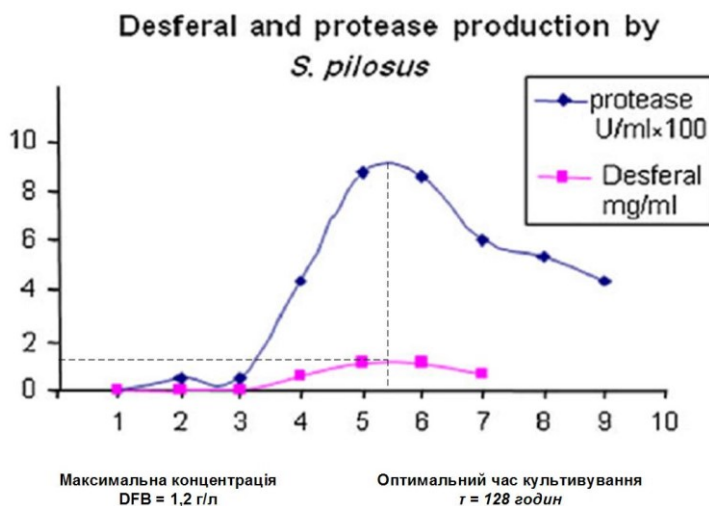
The medium pH declined from 7.5 to 6.7 during 5 days fermentation to be the end of exponential growth phase and then the pH started to rise and at 9 days old cultures pH reached to 8.2. This decline of medium pH might be due of acid production from glucose utilization during growth phase and rate reduced, pH started to rise. This pH variation during fermentation is a good indicator of the state (start or end) of protease production. A rise in culture pH due to production of free amino protease fermentation has been reported before [10].

Table 1 Effect of metals and inhibitor on protease activity

Inhibitor	Concentration (mM)	Residual activity (%)
None	–	100
PMSF	0.5	70
	1	40
	2	20
Minerals		
CaCl ₂	2	125
ZnSO ₄	2	131
MgSO ₄	2	121
MnCl ₂	2	112
FeSO ₄	2	60
Na ₂ HPO ₄	2	108

9 day-old cultures. It is shown that production of Desferal is elevated (induced) in minerals addition. The effect of different minerals was studied in mannitol-soybean media (CaCl_2 , ZnSO_4 , MgSO_4 , MnCl_2 , FeSO_4 and Na_2HPO_4). Supplementation with Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} and Na^+ improved the production of Desferal in media. However, the DFO production increased by Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} and Na^+ , indicated that the enzyme might be inhibited by metal ions for its activity. FeSO_4 reduced the DFO production by 40%. It was shown previously that iron has negative effect of DFO production because its effect on iron-regulated gene expression that exists in *S. pilosus* [12].

The protease was strongly inhibited by PMSF. The medium containing protease inhibitor provides more Desferal B production. This study indicates that dissimilation of DFO by *S. pilosus* is correlated with protease production and it is maybe for protease activity. Deferrioxamine B was rapidly (degrade) by protease. The rise in culture pH is due to production of free amino protease fermentation.



БИОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 579.61

**SIDEROPHORES AS A NEW ALTERNATIVE
TO ANTIMICROBIAL AGENTS**

T. Pidgerskaya, Yu. Karlash

*National University of Food Technologies***Key words:**

Siderophores
Iron
Fungi
Bacteria
Antimicrobial properties

Article history:

Received 03.07.2022
Received in revised form
19.07.2022
Accepted 12.08.2022

Corresponding author:

T. Pidgerskaya
E-mail:
ssmile21@ukr.net

ABSTRACT

The search for new antimicrobial agents to suppress drug-resistant forms of microorganisms is relevant nowadays. Siderophores (Greek: "iron carrier") are small iron binding organic molecules with low molecular mass and different chemical structure. They are synthesized by bacteria and fungi and are important for their normal functioning, possess high antimicrobial activity and can be used to inhibit drug-resistant microbial pathogens.

Siderophores can be used for control of pathogens of many diseases, because due to their close relationship with virulence, the strategy of iron-dependent pathogen control is a promising direction for future research and offers a wide range of possible therapeutic applications as an alternative to common types of antibiotics.

This review provides information on studies of the antimicrobial properties of new, as well as already known siderophores of microbial origin for the last ten years.

Microorganisms capable for synthesizing siderophores were isolated from various natural sources such as soil, plants, seas and oceans. Not all of them have antimicrobial properties, however, due to a number of studies, antimicrobial activity was proved for such bacterial siderophores as: albumycin (*Streptomyces griseus* SCAK3), pyoverdine (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*), schizokinen (*Bacillus megaterium*), ferritin (*Brevibacillus brevis* GZDF3). Also, among the fungi, strains capable for synthesizing antimicrobial siderophores such as ferrichrome (*Penicillium commune* JJHO), ferricocin (*Aspergillus fumigatus* AF293) were isolated.

DOI: 10.24263/2225-2924-2022-28-4-4

BIOTECHNOLOGIES

**СИДЕРОФОРИ ЯК НОВА АЛЬТЕРНАТИВА
АНТИМІКРОБНИМ ЗАСОБАМ**

Т.О. Підгерська, Ю. В. Карлаш

Національний університет харчових технологій

Нині актуальним є пошуки нових антимікробних засобів для боротьби з великою кількістю резистентних форм мікроорганізмів. Серед таких виділяється клас низькомолекулярних органічних молекул — сидерофори, які синтезуються бактеріями та грибами для захоплення заліза та інших мікроелементів, що є досить важливим елементом для нормальної життєдіяльності мікроорганізмів.

Сидерофори можуть бути використані у боротьбі зі збудниками багатьох захворювань, оскільки завдяки їх тісному взаємозв'язку з вірулентністю стратегія залізоалежної боротьби з патогенами є перспективним напрямом для майбутніх досліджень, що пропонує широкий спектр можливих терапевтичних застосувань як альтернативу поширеним типам антибіотиків.

Для досягнення високої концентрації під час синтезу сидерофорів потрібно враховувати низку факторів, таких як склад поживного середовища, наявність феруму, рН, температуру.

У пропонуваному огляді наведено інформацію за останні десять років щодо досліджень антимікробних властивостей нових вже відомих сидерофорів мікробного походження, а також інформацію, що стосується оптимізації складу поживного середовища та підбору оптимальних показників культивування мікроорганізмів, здатних синтезувати сидерофори з антимікробними властивостями.

Мікроорганізми, здатні синтезувати сидерофори, були виділені з таких природних джерел, як ґрунт, рослини, моря та океани. Не всі з них проявляють антимікробні властивості, однак було доведено антимікробну активність для таких бактеріальних сидерофорів, як альбоміцин (*Streptomyces griseus* SCAK3), піовердин (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*), шизокінен (*Bacillus megaterium*), феритин (*Brevibacillus brevis* GZDF3). Також серед грибів було виділено штами, що синтезують такі антимікробні сидерофори, як феріхром (*Penicillium commune* JJHO), феріхроцин (*Aspergillus fumigatus* AF293).

Ключові слова: сидерофори, залізо, гриби, бактерії, антимікробні властивості.

Постановка проблеми. Антибіотикова резистентність основних збудників інфекційних захворювань є однією з найбільших проблем сучасної медицини. Всесвітня організація охорони здоров'я оголосила антибіотикорезистентність однією з основних загроз людству. Причиною зростаючої хвилі антибіотикорезистентності бактерій експерти називають безконтрольне застосування антибіотиків пацієнтами без призначення лікаря (самодіагностику й самолікування). Сьогодні зі 115 розроблених основних антибіотиків 68 уже практично не діють (Мінухіна, & Звягінцева, 2014).

БІОТЕХНОЛОГІЇ

Вирішенням цієї проблеми є інтенсифікація розробки і впровадження нових антимікробних препаратів шляхом використання сидерофорів.

Мета статті: визначення поняття сидерофорів, їх роль у життєдіяльності мікроорганізмів, а також аналіз сучасної літератури щодо антимікробної активності сидерофорів, які синтезуються бактеріями (Chakraborty, Francis, & Chakraborty, 2021) новими штамми грибів (Olshvang, Szebesczyk, Kozłowski, & Hadar, 2015; Szigeti, Szaniszló, Fazekas, & Gyemant, 2014; Ouchi, Watanabe, Nonaka, & Muramatsu, 2020) і дріжджів (Wang, Chi, Li, & Wang, 2009); визначення впливу складу поживного середовища та умов культивування на синтез сидерофорів; пошук мікроорганізмів, які на оптимізованих поживних середовищах під час культивування продукують сидерофори з найбільшою кінцевою концентрацією.

Матеріали і методи. Предметом дослідження є роль заліза у біосинтетичних процесах мікроорганізмів і роль залізо специфічних хелаторів-сидерофорів, які синтезуються різними видами мікроорганізмів, на їхню антимікробну активність.

Викладення основних результатів дослідження. *Роль сидерофорів для мікроорганізмів.* Залізо є одним з найбільш важливих мікроелементів, необхідних для розвитку всіх організмів. Це важливий кофактор, який у мікромолярних концентраціях забезпечує ріст мікроорганізмів та їх основних видів метаболічної діяльності й біосинтетичних процесів. Специфічне надходження елементарного заліза в клітину є критичним для виживання мікробів, оскільки залізо міститься в цитохромах, фередоксинах та інших залізосіркопротеїдах. Воно необхідне для відновлення кисню та синтезу АТФ, відновлення ДНК-прекурсорів (Пирог, 2010).

У звичайних умовах іони заліза в навколишньому середовищі мають низьку концентрацію біодоступності. Залізо, незважаючи на те, що є четвертим за поширеністю елементом у природі, не є легкодоступним для мікроорганізмів у розчиненій залізистій формі Fe^{3+} . Це пов'язано з поганою розчинністю гідроксиду феруму ($K_{sp} = 10^{-38}$), що зменшує кількість вільного заліза за рН 7, якого не вистачає для оптимального росту мікроорганізмів (Swayambhu, & Bruno, 2021).

Як наслідок, бактерії і гриби виробили різноманітні стратегії імпорту й утилізації заліза в умовах його дефіциту. Вони синтезують залізоспецифічні хелатори — сидерофори.

Сьогодні встановлено, що сидерофори — це специфічний клас низькомолекулярних органічних молекул, які здатні зв'язуватись із залізом і утворювати розчинні Fe^{3+} комплекси. Вони ефективно зв'язують Fe^{3+} і транспортують його до клітин мікроорганізмів, де залізо зв'язується з рецепторами і потрапляє всередину клітини. Там воно звільняється і може бути використане мікроорганізмом.

Основна функція сидерофора полягає в тому, щоб з'єднатися із залізом, зробити його розчинним і забезпечити поглинання його клітинами (Matar, Albarri, & Makky, 2020).

Раніше сидерофори були відомі як сидерохроми (носії кольору) або сидераміни (носії аміну), оскільки здатність до зв'язування заліза була ідентифікована не одразу (Swayambhu, & Bruno, 2021).

Сидерофори певною мірою впливають на стан мікроорганізмів. Наприклад, у грибових клітинах вони необхідні для вірулентності, стійкості до окислювального стресу, безстатевого та статевого розмноження, зберігання заліза, захисту

BIOTECHNOLOGIES

проти токсичності, спричиненої залізом і взаємодією гриба з господарем (Wang, Zhe, Liu, & Buzdar, 2009).

Наявність сидерофорів дає переваги у пристосованості тим видам мікроорганізмів, які їх використовують, покращуючи поглинання заліза і позбавляючи заліза конкурентів, які не можуть використовувати комплекс сидерофори-залізо (Eickhoff, & Bassler, 2020).

Мікроорганізми виробляють велику кількість сидерофорів:

- аеробактин, ентеробактин — *Escherichia coli*;
- десферіоксамін — *Streptomyces spp.*;
- десферитіоцин — *Streptomyces antibioticus*;
- мікобактин — *Mycobacterium tuberculosis*;
- піочелін — *Pseudomonas aeruginosa*;
- ерсиніябактин — *Yersinia pestis* (Albelda-Berenguera, & Monachona, 2019).

Загалом, усі вони поділяються на основі функціональних лігандів, які зв'язуються з важкими металами (Swayambhu, & Bruno, 2021). Основні групи сидерофорів включають:

- катехолатний тип (ентеробактин, бацилбактин, петробактин);
- гідроксаматний тип (дефероксамін, екзохелін);
- карбоксилатний тип (стафілоферин А, ахробактин);
- змішаний тип (аеробактин, ерсиніябактин, піовердин, піочелін) (Albelda-Berenguera, & Monachona, 2019; Golonka, Yeoh, & Vijay-Kumar, 2019).

Сидерофори катехолатного типу мають найвищу спорідненість із тривалентним залізом завдяки утворенню п'ятичленних хелатних кілець. До їх складу входить катехолатна частина (рис. А).

Сидерофори гідроксаматного типу — це майже всі грибні сидерофори. Вони також утворюють п'ятичленні хелатні кільця, але з меншою спорідненістю до заліза. Складаються з гідроксаматної частини (рис. В).

Сидерофори карбоксилатного типу мають карбоксилатну та гідроксильну донорні групи. При нейтральному рН карбоксилати, як правило, є менш ефективними сидерофорами в поглинанні заліза. Однак сидерофори карбоксилатного типу мають перевагу при більш кислому рН, де вони ефективніші, ніж катехолати та гідроксамати, які залишаються протонуваними, тому цей тип сидерофорів корисний для мікробів, що живуть у кислому середовищі (рис. С).

Змішаний тип сидерофорів містить у своєму складі обидва фрагменти цих частин (Albelda-Berenguera, & Monachona, 2019).

Варто зазначити, що деякі сидерофори являють собою комбінацію частинок, що зв'язують залізо, і відомі як сидерофори змішаного типу (D) (Albelda-Berenguera, & Monachona, 2019).

Сидерофори виробляють багато бактерій, в тому числі патогенних. Мікроорганізми, особливо ті, які живуть на організмах-господарях або всередині них, конкурують за обмежені ресурси заліза. Сидерофори, які вони продукують, виявляють антибактеріальні властивості, пригнічуючи таким чином ріст мікроорганізмів-конкурентів. Виграє той мікроорганізм, який продукує сидерофор з найвищою константою зв'язування заліза, тобто той, що має найвищу спорідненість із залізом. "Залізне голодування" є ключовим сигналом для вироблення сидерофорів (Ringel, & Brüser, 2018).

БІОТЕХНОЛОГІЇ

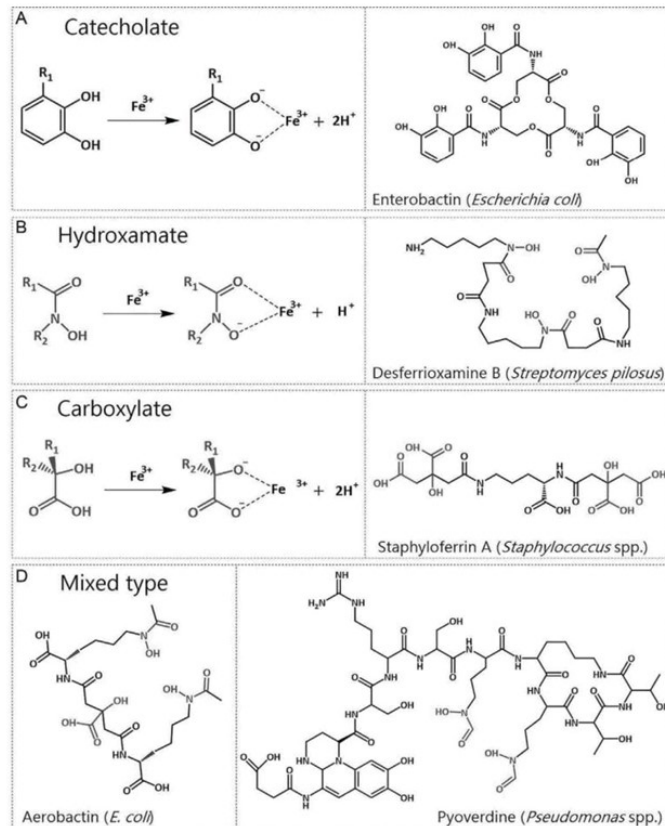


Рис. Найпоширеніші фрагменти, що зв'язують залізо, знайдені в мікробних сидерофорах: (А) катехолат, (В) гідроксамат і (С) карбоксилат

Антимікробні властивості сидерофорів. За останні кілька років усе більше привертають увагу сидерофори з антимікробними властивостями, які можуть бути використані в медицині як нові антимікробні засоби.

Наприклад, сидерофори, що синтезуються ціанобактеріями *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Synechococcus elongatus*, *Microcystis aeruginosa*, демонструють протимікробну активність проти кількох патогенних бактерій (*Salmonella typhimurium* та *Bacillus subtilis*) (Silva-Stenico, Pamplona, Sturion, & Lorenzi, 2011). Хлоркатехелін, що синтезується *Streptomyces* sp., — це мікробний сидерофор, що також проявляє антимікробну активність (Kishimoto, Nishimura, & Hattori, 2014). Оксихелін проявляє антимікробні властивості проти *Streptomyces* sp. GW9/1258 (Sontag, Gerlitz, & Paululat, 2006) Як повідомляється у статті (Adler, Corbalan, & Seyedsayamdost, 2012), піочелін пригнічує ріст деяких представників роду *Xanthomonas* та *Staphylococcus aureus*. Також піочелін синтезований *Pseudomonas aeruginosa* пригнічує ріст *Trypanosoma cruzi* (Sass, Miller Conrad, Nguyen &

BIOTECHNOLOGIES

Stevens, 2020). Сидерофори, продуктовані *Pseudomonas fluorescens* BVc6R8, інгібують зростання актиноміцету *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877 (Saha та ін., 2016; Ye та ін., 2014).

Одним із сидерофорів, що вже використовується в медицині, є дефероксамін (сидерофор гідроксаматного типу), який синтезується культурою *Streptomyces pilosus*. Він відомий тим, що його використовують для лікування перевантаження крові залізом. Однак цей сидерофор також проявляє й антимікробні властивості, адже перешкоджає росту коагулазонегативних стафілококів, які є основними патогенами у пацієнтів (Абатуров, & Крючко, 2018) Також дефероксамін відіграє певну роль під час перебігу атеросклерозу — захворювання, що супроводжується запальним процесом, який викликають різноманітні збудники. Сидерофор пригнічує їх ріст, зменшуючи запальний процес і пошкодження тканин (Emri, Toth, & Nagy, 2013). У (Phelan, McQuaid, & Kenny, 2020) повідомляється про те, що дефероксамін впливає на збудників туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis*. Зокрема, сидерофор бере участь у підтримці функції інфікованих імунних клітин, посилюючи гліколітичний метаболізм у макрофагах. Дефероксамін підтримує функцію вродженого імунітету, індукуючи виробництво білка IL1 β у макрофагах людини під час раннього зараження *M. Tuberculosis*. Відомо також, що дефероксамін підвищує протиракову активність трихостатину А (Ronan, Kadi, & McMahon, 2018).

У (Wang, Li, & Mu, 2019) є підтвердження того, що й сам дефероксамін проявляє протипухлинну активність, оскільки залізо сприяє зростанню та розмноженню злоякісних клітин, тому хелатори заліза можуть пригнічувати ріст пухлинних клітин, виснажуючи внутрішньоклітинний вміст заліза.

Дефероксамін має також певний інгібуючий ефект проти *Porphyromonas gingivalis in vitro*, що є збудником парадонтиту людини. Також у присутності дефероксаміну підвищується згубна дія H₂O₂ на бактерії (Moon, Heeg, & Kim, 2011).

VL-2397 — препарат, що знаходиться на стадії клінічної розробки, він схожий за своєю будовою на сидерофор ферихром і проявляє протигрибкові властивості (Nathan, 2017). У статтях (Akemi, Mikihiro, & Hiroaki, 2020; Такуя, Mikihiro, & Hiroaki, 2021; Akemi, Mikihiro, & Hiroaki, 2016) повідомляється про те, що ферихром володіє протипухлинною активністю.

Новим напрямком етіологічного лікування інфекційних захворювань, викликаних антибіотикорезистентними бактеріальними штамами, є застосування сидероміцинів.

Сидероміцини — це сидерофори (катехолати і гідроксамати), які кон'юговані з антибіотиками (Абатуров, & Крючко, 2018). Власне сидерофор являє собою ніби транспортну систему, яка легко проникає в клітину, доставляючи всередину захоплене залізо і переносячи таким чином протимікробну сполуку, яка до цього не могла проникнути в клітину. У такий спосіб за допомогою сидерофорів створюють так званий "троянський кінь". Цей метод дає змогу розробити нові препарати, здатні вражати бактерії та гриби, які були раніше стійкими до лікування. Нещодавно виявлені переваги цієї стратегії призвели до синтезу серії антибіотиків на основі сидерофорів (Gumienna-Konteska, & Peggy, 2019; Górska, & Sloderbach, 2014). Одним із них є цефалоспориновий антибіотик цефідероксол

БІОТЕХНОЛОГІЇ

(Abdul-Mutakabbir, & Alosaimy, 2020; Bonomo, 2019).

Прикладами натуральних сидероміцинів є альбоміцини, фериміцини, даноміцини, сальміцини і мікроцини.

Перші сидероміцини, які були розроблені в 1960 р., — це фериміцини-сидерофори, що продукуються бактеріями *Streptomyces griseoflavus*. Фериміцини (A1, A2 і B) — це кон'югат феріоксаміна В і антибіотиків. Фериміцини проявляють виражену антибактеріальну активність тільки проти грампозитивних бактерій, зокрема проти бактерій *S. aureus*.

Мікроцини — це невеликі, рибосомально синтезовані антимікробні пептиди, які продукуються грамнегативними бактеріями і володіють вузьким спектром антимікробної дії (Gumienna-Kontecka, & Peggy, 2019). Мікроцини класу Пв, E492, H47 і М називаються сидерофорними мікроцинами, оскільки щільно з'єднані з катехолатним сидерофором. Ці мікроцини використовують рецептори сидерофорів для проникнення в конкуруючі бактеріальні клітини, проявляючи таким чином антимікробні властивості. Вони мають вузький спектр пригнічення, діючи на близькі види (пригнічує ріст 31 штаму *E. coli*). Ці сполуки пригнічують також ріст *Salmonella* і *Klebsiella*, які належать до родини *Enterobacteriaceae* (Paquette, & Reuter, 2020).

Даноміцини і сальміцини складаються з тригідроксаматного даноксаміна (сидерофор) і аміноглікозидного антибіотика. Ці сполуки інгібують синтез білка стафілококів і стрептококів. Сальміцини були виділені зі штаму бактерій *Streptomyces violaceus* і містять феріоксамін, кон'югований з амінодисахаридом. Припускають, що сальміцин пригнічує синтез протеїнів подібно до антибіотиків аміноглікозидної групи (Gumienna-Kontecka, & Peggy, 2019).

Альбоміцини інгібують ріст як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій (Gumienna-Kontecka, & Peggy, 2019). Було виявлено, що *Enterobacteriaceae* чутливі до альбоміцину, за винятком видів, які не мають ферікогідроксаматної транспортної системи. Більше того, грампозитивні *S. aureus* і *Streptococcus pneumoniae* також високочутливі до дії альбоміцину (Albelda-Berenguera, & Monachona, 2019).

Сальміцин демонструє той самий спектр активності з грампозитивними бактеріями, що й альбоміцин, однак на відміну від нього сальміцин активний проти *S. agalactiae*. Сальміцин неактивний щодо більшості грамнегативних бактерій, виняток становлять *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* та деякі штами *Yersinia enterocolitica*, які чутливі в концентрації до 10 нг/мл сальміцину, що пригнічує грампозитивні бактерії (Braun, Pramanik, & Gwinner, 2009).

Ще один сидерофор, який використовується на сьогодні вченими як "троянський кінь" для доставки лікарських засобів безпосередньо в патогенні бактеріальні клітини, це бацилобактин, що синтезує *Bacillus subtilis*. Бацилобактин спрямований переважно проти грампозитивних бактерій, проте він також охоплює грамнегативні бактерії, віруси, гриби (Матвеева, 2019; Chakraborty, Kizhakkalkalam, & Joy, 2022).

Застосування галійвісних сидерофорів — це ще один підхід до терапії інфекцій, викликаних антибіотикорезистентними бактеріями. Було встановлено, що Ga-DFO (галій-десфероксамін) володіє великою терапевтичною активністю при лікуванні інфекцій, викликаних *Pseudomonas* (Gumienna-Kontecka, & Peggy,

BIOTECHNOLOGIES

2019; Mular, Shanzer, & Kozłowski, 2021).

Відомо, що *Pseudomonas* виробляють сидерофори, що захоплюють галій так само активно, як і залізо. Було проведено ряд дослідів, при яких у поживне середовище додавали галій, при цьому сидерофори, які його захоплюють і несуть, повертаються в колонії мікроорганізмів. За наявності галію досліджувані колонії гинуть за рахунок того, що сидерофори, зв'язані галієм, не можуть захоплювати залізо, яке життєво необхідне клітинам. При потраплянні галію в клітини мікроорганізми гинуть, оскільки це важкий метал, що є токсичним у великих кількостях. Можна припустити, що сидерофори псевдомонад можна ефективно використовувати в медицині для розробки антимікробних препаратів (Шкут, & Карпов, 2017).

Також комплекс дефероксаміну і кадмію (Cd-DFO) призводить до пригнічення таких мікроорганізмів, як *E. coli*, *P. aeruginosa* і *C. albicans* (Mattos, & Constantino, 2013).

Оскільки залізо має вирішальне значення для життєздатності мікробів, то його зв'язування, тобто недоступність для патогенів, є одним із засобів, що може бути використаний у медицині для розробки нових антимікробних засобів (Nathan, 2017). На основі сидерофорів створюються синтетичні комплексні сполуки, зокрема кон'югати сидерофорів з антибіотиками. За рахунок того, що сидерофори легко потрапляють всередину клітини, оминаючи цитоплазматичну мембрану, кон'югати сидерофорів так само легко доставляють антибіотик у клітину, в результаті чого вона гине (Negash, & Norris, 2019).

Також сидерофори можуть бути використані не лише як транспортувальники заліза, а й інших металів у токсичних для клітин концентраціях (Mattos & Constantino, 2013).

Сидерофори бактерій. Бактерія *Bacillus velezensis* MBTDLP1 MTCC 13048, яка була виділена з макроводорості південно-східного прибережного регіону Індії, продукує сидерофори, здатні пригнічувати ріст *Staphylococcus aureus* (зона затримки інгібування близько 35 мм) (Chakraborty, Francis, & Chakraborty, 2021).

Бактерії роду *Pseudomonas* продукують сидерофори піовердини, які виявляють виражені антибактеріальні властивості проти збудників різноманітних хвороб рослин, що можуть бути розглянуті для застосування в медицині. Було проведено ряд досліджень і зроблено висновок про те, що піовердин не володіє вираженими цитотоксичними властивостями щодо клітин людини. У табл. 1 наведено певні види мікроорганізмів, які чутливі до піовердину (Murugappan, Aravinth, Rajaroobia, Karthikeyan, & Alamelu, 2012).

Таблиця 1. Вплив піовердину на патогенні види мікроорганізмів

Назва мікроорганізму, ріст якого пригнічує піовердин	Зона затримки росту, мм	
	Безклітинний супернатант	Очищений сидерофор
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> NCIM 2079	9	12
<i>Aeromonas hydrophila</i> MTCC 646	13	16
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> MTCC 451	11	15
<i>Vibrio harveyi</i> MTCC 3438	10	14
<i>Asperillus niger</i> NCIM 586	15	11

БІОТЕХНОЛОГІЇ

Продовження таблиці 1

1	2	3
<i>Microsporium gypseum</i> MTCC 2830	13	12
<i>Aspergillus flavus</i> MTCC 7133	18	14
<i>Penicillium oxalicum</i> MTCC 4931	13	9
<i>Fusarium oxysporum</i> MTCC 4894	14	10

Як можна побачити з табл. 1, піовердин проявляє антимікробні властивості до значної кількості мікроорганізмів, серед яких наявні як гриби, так і бактерії. Особливо слід відмітити, що піовердин пригнічує *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum*, *Aspergillus flavus*, які є збудниками хвороб людини, тому можна зробити висновок стосовно потенціалу цього сидерофора при розробці нових медичних препаратів для боротьби з патогенами (Murugarpap, Aravinth, Rajaroobia, Karthikeyan, & Alamelu, 2012).

Загалом представники роду *Pseudomonas* синтезують широкий спектр антибіотичних речовин, серед яких сидерофори займають особливе місце. За рахунок того, що сидерофори псевдомонад швидше зв'язують залізо, воно стає недоступним для інших мікроорганізмів, які продукують сидерофори. Так псевдомонади виграють у конкурентній боротьбі за цей життєво необхідний елемент і таким чином пригнічують ріст інших мікроорганізмів (Івах, & Русакова, 2013).

Надмолекулярний комплекс рамноліпідів-альгінату-піовердину JRV-L-2, що синтезує *Pseudomonas aeruginosa* JRV-L, можна використовувати як противірусний засіб для лікування хвороб, спричинених фітопатогенами рослин, бактеріями, грибами та вірусами (Шульга, Джогель, Карпанко, Пристай, & Вільданова, 2017).

Сидерофор шизокенін має потенціал як діагностичний агент для візуалізації грампозитивних організмів у клінічній діагностиці (Chuljerm, Deedum, & Fuchagoen, 2020).

Бактерія *Brevibacillus brevis* GZDF3 синтезує сидерофор феритин, що проявляє антимікробну активність проти *Candida albicans*, яка здатна спричиняти опортуністичні інфекції людини. Зони інгібування росту *C. albicans* після обробки культуральною рідиною становлять 41 ± 3 мм та 45 ± 3 мм з вихідним та оптимізованим середовищем відповідно (Sheng, Jia, Zhang, & Zeng, 2020).

Сидерофори грибів і дріжджів. Вчені, які займалися розробкою аналогів ферихрому (*Penicillium commune* JHO), встановили, що вони пригнічують *E. coli* та *P. putida* і проявляють активність широкого спектра (так само, як ферихром у нативному стані) (Olshvang, Szebesczyk, Kozłowski, & Hadar, 2015).

Сидерофори патогенних грибів, такі як ферикроцин (*Aspergillus fumigatus*), викликають особливий інтерес у протигрибковій терапії (Szigeti, Szaniszló, Fazekas, & Gyemant, 2014).

Було встановлено, що гриб *Clonostachys compactiuscula* FKR-0021 синтезує сидерофори копрогени, які впливають на збудників малярії *Plasmodium falciparum* FCR3 та K1 *in vitro* (Ouchi, Watanabe, Nonaka, & Muramatsu, 2020). Вони можуть бути використані для розробки нових протималярійних засобів. Вплив копрогенів на збудників малярії показано в табл. 2.

Дріжджі *Aureobasidium pullulans* HN6.2 здатні виробляти сидерофор, що проявляє антимікробну активність проти *B. subtilis*, *Vibrio anguillarum* та *Vibrio para-*

BIOTECHNOLOGIES

haemolyticus (Wang, Chi, Chi, Li, & Wang, 2009). Відомо, що *V. Parahaemolyticus* викликає шлунково-кишкові захворювання людини, а *V. anguillarum* є збудником хвороб риби.

Таблиця 2. Вплив копрогенів на штами *Plasmodium falciparum*

Тип сидерофору	Концентрація напівмаксимального інгібування IC ₅₀ , мкМ	
	Штам <i>Plasmodium falciparum</i> K1	Штам <i>Plasmodium falciparum</i> FCR3
	Копроген А	9,9
Копроген В	5,4	3,5
Копроген С	5,2	3,0
N ¹⁴ -пальмітоїл-копроген	2,6	1,7

Однак, як повідомляється в (Sinatra, & Colby, 2018), були також зареєстровані випадки смертності людей після ураження *V. anguillarum*. У табл. 3 представлені основні типи сидерофорів, що володіють антимікробними властивостями.

Таблиця 3. Антимікробні властивості сидерофорів

Назва сидерофору 1	Продукенти 2	Антимікробні властивості 3	Література 4
Альбоміцин	<i>Streptomyces griseus</i> SCAK3	Пригнічує ріст грам позитивних (<i>Staphylococcus aureus</i> і <i>Streptococcus pneumoniae</i>) і деяких грамнегативних бактерій <i>Enterobacteriaceae</i>	Albelda-Berenguera & Monachona, 2019
—	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Synechococcus elongatus</i> , <i>Microcystis aeruginosa</i>	Ефективні проти <i>Salmonella typhimurium</i> та <i>Bacillus subtilis</i>	Silva-Stenico, Pamplona & Sturion Lorenzi, 2011
Піочелін	Представники роду <i>Pseudomonas</i>	Пригнічує ріст представників роду <i>Xanthomonas</i> та <i>Staphylococcus aureus</i> , також знижує активність <i>Trypanosoma cruzi</i>	Абатуров & Крючко, 2018
Піовердин	Представники роду <i>Pseudomonas</i> (різні штами <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i>)	Піовердин володіє вираженими протимікробними властивостями проти: <i>Staphylococcus aureus</i> NCIM 2079, <i>Aeromonas hydrophila</i> MTCC 646, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> MTCC 451, <i>Vibrio Harveyi</i> MTCC 3438, <i>Aspergillus niger</i> NCIM 586, <i>Microsporium gypseum</i> MTCC 2830, <i>Aspergillus flavus</i> MTCC 7133, <i>Penicillium oxalicum</i> MTCC 4931, <i>Fusarium oxysporum</i> MTCC 4894. Комплекс рамноліпідів альгіна-піовердину JRV-L-2 застосовують як противірусний засіб	Абатуров & Крючко, 2018 Moon, Herr & Kim, 2011

БИОТЕХНОЛОГІЇ

Продовження таблиці 3

1	2	3	4
Шизокінен	<i>Bacillus megaterium</i>	Має потенціал як діагностичний агент, зокрема для візуалізації грам позитивних організмів у клінічній діагностиці	Olshvang, Szebesczyk, Kozłowski & Hadar, 2015
Феритин	<i>Brevibacillus brevis</i> GZDF3	Пригнічує ріст <i>Candida albicans</i> , що здатна спричиняти опортуністичні інфекції людини	(Moon, Herr & Kim, 2011)
Ферихром	<i>Penicillium commune</i> JJHO	Виявляє активність проти <i>E. coli</i> та <i>P. putida</i> . Проявляє протигрибкові властивості Володіє протипухлинною активністю	Olshvang, Szebesczyk, Kozłowski & Hadar, 2015; Abdul-Mutakabbir & Alosaimy, 2020; Bonomo, 2019; Paquette & Reuter, 2020; Braun, Pramanik & Gwinner, 2009
Ферикроцин	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	Активний проти стафілококів та в протигрибковій терапії	(Szigeti, Szaniszló, Fazekas & Gyemant, 2014)
Копроген	<i>Clonostachys compactuscula</i> FKR-0021 <i>Penicillium nalgiovense</i> NCAIM F-001333 <i>Penicillium nalgiovense</i> S1	Пригнічує життєдіяльність збудників малярії <i>Plasmodium falciparum</i> FCR3 та K1 <i>in vitro</i> . Можуть бути використані для розробки протималярійних засобів	Ouchi, Watanaabe, Nonaka K & Muramatsu, 2020
Сидерофор гідроксаматного типу	<i>Aureobasidium pullulans</i> HN6.2	Проявляє антимікробну активність проти <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Vibrio anguillarum</i> та <i>V. parahaemolyticus</i>	Wang, Chi, Chi, Li & Wang, 2009
Дефероксамін	<i>Streptomyces parvulus</i> CBS548.68 <i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Пригнічує ріст коагулазо-негативних стафілококів. Зменшує запальний процес під час перебігу атеросклерозу, пригнічуючи ріст мікроорганізмів, що його викликають. Пригнічує збудників туберкульозу <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . Проявляє протипухлинну та протиракову активність Пригнічує <i>Porphyromonas gingivalis in vitro</i> , що є збудником парадонтиту людини	Akemi, Mikihiro & Hiroaki, 2020 Takuya, Mikihiro & Hiroaki, 2021 Hiroaki, Mikihiro & Hiroki, 2016 Абатуров, Крючко, 2018; Górska & Sloderbach, 2014

BIOTECHNOLOGIES

Продовження таблиці 3

1	2	3	4
Сальміцин	<i>Streptomyces violaceus</i>	Пригнічує ріст стафілококів та стрептококів. Активний проти <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Citrobacter freundii</i> та деяких штамів <i>Yersinia enterocolitica</i>	Матвєєва, 2019 Negash & Norris, 2019
Мікроцинин	<i>Escherichia coli</i>	Пригнічує ріст <i>Salmonella</i> і <i>Klebsiella</i> , які належать до родини <i>Enterobacteriaceae</i>	Nathan, 2017
Бацилбактин	<i>Bacillus subtilis</i>	Пригнічує ріст грамнегативних бактерій	Murugappan, Aravinth, Rajarobia, Karthikeyan & Alamelu, 2012

Біотехнологічні особливості отримання сидерофорів роду *Streptomyces*. Серед представників роду *Streptomyces* досить поширеними антимікробними сидерофорами є дефероксаміни (табл. 4).

Таблиця 4. Сидерофори представників роду *Streptomyces*

Штам	Джерело вуглецю та азоту, г/л	Назва сидерофору	Концентрація, г/л	Література
<i>Streptomyces parvulus</i> CBS548.68.	Глюкоза — 25 Глутамат натрію — 13 MOPS — 21	Дефероксамін Е	2,09	Gáll, Lehoczki & Gyémánt, 2016
<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Соєве борошно — 20 Маніт — 20 Треонін — 0,1	Дефероксамін В	5	Chiani, Akbarzadeh & Farhangi, 2010
<i>Streptomyces pilosus</i> ATCC 19797	Соєве борошно — 20 Манітол — 20	Дефероксамін В	1,2	Mortazavi & Akbarzadeh, 2012

Важливим моментом для практичного використання сидерофорів у суспільній практиці є розроблення ефективних біотехнологій їх отримання. Увага вчених-дослідників нині прикута до пошуку оптимального складу поживних середовищ для культивування штамів мікроорганізмів продуцентів сидерофорів, які мають найвищу продуктивність і раціональну вартість поживного середовища.

У (Gáll, Lehoczki, & Gyémánt, 2016) проводився підбір оптимального поживного середовища для найвищого синтезу сидерофору дефероксаміну Е штамом *S. parvulus* CBS548.68. У результаті було встановлено, що при наявності глюкози, глутамату натрію та MOPS (3-морфолінопропан-1-сульфонова кислота) концентрація сидерофору становить 2 г/л (біомаса 8,9 г/л), якщо порівняти з іншими джерелами вуглецю та азоту: крохмаль і аспарагін — 96 мг/л (біомаса 2,8 г/л); крохмаль, аспарагін, MOPS — 882 мг/л (біомаса 7,9 г/л).

У (Chiani, Akbarzadeh, & Farhangi, 2010) дослідники підбирали поживне середовище для синтезу дефероксаміну В з використанням культури *S. pilosus* ATCC 19797. Після вирощування культури на кількох поживних середовищах (МҮВ,

БИОТЕХНОЛОГІЇ

NB, LB, соєве середовище) було встановлено, що соєве середовище є найкращим серед інших, тож воно було обрано для подальших досліджень. Далі до базового соєвого середовища додавали різні солі. В результаті комбінації солей KH_2PO_4 ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ було досягнуто найвищої концентрації сидерофору (5 г/л), що свідчить про значний вплив цих солей на синтез дефероксаміну В.

У (Mortazavi, & Akbarzadeh, 2012) вивчався вплив мінералів на синтез дефероксаміну В *S. pilosus* ATCC 19797. Вихідне середовище містило лише маніт та соєве борошно. В процесі культивування додавали мінерали солі (CaCl_2 ; ZnSO_4 ; MgSO_4 ; MnCl_2 ; FeSO_4 ; Na_2HPO_4), які всі (окрім феруму) позитивно впливали на синтез сидерофору. Загалом концентрація дефероксаміну становила 1,2 г/л.

Біотехнологічні особливості отримання сидерофорів роду Pseudomonas. У (Vindeirinho, Soares, & Soares, 2021) дослідники вивчали зміну синтезу піовердину шляхом маніпуляцій зі складом поживного середовища, на якому здійснювали культивування штаму *P. fluorescens* DSM 50090. Бактерії вирощували на двох видах поживних середовищ — середовищі Кінга В, що містить багато поживних речовин, і мінімальному середовищі MMS. Враховуючи продуктивність біосинтезу піовердину в ммоль /г сухої біомаси, виробництво сидерофорів було більш ефективним саме на середовищі MMS (~ 25 ммоль/г), якщо порівняти із середовищем Кінга В (~ 11 ммоль/г). Саме тому це середовище було обрано для подальших досліджень. У табл. 5 показано результати культивування представників роду *Pseudomonas* при біосинтезі сидерофорів піовердинів.

Таблиця 5. Умови культивування представників роду *Pseudomonas*

Штам	Концентрація джерел вуглецю та азоту, г/л	Концентрація сидерофорів	Література
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50090	Сукцинат — 4	24 ммоль/л	Vindeirinho, Soares & Soares, 2021
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RZS9.	Сукцинат — 4,9	69,41% SU*	Shaikh, Wani & Sayyed, 2016
<i>Pseudomonas putida</i> CMMB2	Сукцинат — 4 Казамінокислоти — 4,6	81 % SU*	Murugappan, Aravinth, Rajarobbia, Karthikeyan & Alamelu, 2012

Примітка: * — сидерофорні одиниці, виражені у %.

Наступним етапом було дослідження впливу джерела вуглецю на синтез сидерофорів. Найкращі результати спостерігались саме при використанні сукцинату (~ 24 ммоль/л), якщо порівняти з декстозою (~ 11 ммоль/л) та гліцерином (~ 11,5 ммоль/л). Додавання амінокислот і зміна концентрації фосфату не підвищували синтез піовердину.

У (Shaikh, Wani, & Sayyed, 2016) проводилась оптимізація сукцинатного середовища (концентрація сидерофору 63% SU) *P. aeruginosa* RZS9. Параметри, що підлягали оптимізації: концентрація солей K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, бурштинова кислота, рН (6—8) і температура (22—34 °С). У резу-

BIOTECHNOLOGIES

льтаті оптимізації була досягнута концентрація сидерофорів 69,41% SU.

У (Murugappan, Aravinth, Rajarobia, Karthikeyan, & Alamelu, 2012) вирощували *P.putida* СММВ2 на мінімальному середовищі ММ9. Визначали вплив заліза, рН, джерела вуглецю та азоту на синтез сидерофору півердину. Найкращим виявився сукцинат (73% SU), амінокислоти (71% SU), NH_4Cl (71% SU). Загалом додавання заліза негативно вплинуло на синтез при його додаванні в кількості 2 мкМ (70% SU), максимальне зростання та синтез сидерофорів спостерігалось при рН 8. При доповненні середовища ММ9 сукцинатом (4 г/л), казамінокислотами (4,6 г/л) та NH_4Cl (10 г/л) концентрація сидерофору склала 81% SU.

У (Русакова, 2016) вчені досліджували вплив іонів феруму на синтез сидерофорів різних штамів *P. aeruginosa*, які вирощували при температурі 37 °С (табл. 6). Аналізуючи дані таблиці, можна побачити, що додавання 3 мкМ $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ практично не мало впливу на синтез сидерофорів. Концентрація 30 мкМ призвела до 1,5—2,5-кратного пригнічення синтезу сидерофорів, а концентрація 300 мкМ повністю зупиняла їх синтез.

Таблиця 6. Вплив іонів феруму на синтез сидерофорів

Штам	Концентрація сидерофорів, мкМ/10 ⁹			
	Середовище без $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Середовище з 3 мкМ $\text{MFeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Середовище з 30 мкМ $\text{MFeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Середовище з 300 мкМ $\text{MFeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692	13,2	13,0	7,5	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,0	12,6	4,8	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	12,1	11,4	4,6	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	13,2	12,9	5,6	0

У (Левченко, & Русакова, 2019) вчені також вивчали вплив іонів феруму на синтез сидерофорів. Використовували такі представники роду *Pseudomonas*: *P. chlororaphis* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) та *P. fluorescens* ONU 303. Розвиток культур відбувався на рідкому поживному середовищі Кінга. Культури *P. fluorescens* та *P. chlororaphis* продукували залізохелатуючі сполуки, що належать до сидерофорів півердинового типу.

Якщо при культивуванні мікроорганізмів без додавання феруму показники синтезу сидерофорів були досить великі (найбільш активна продукція сидерофорів спостерігалась у штамі *P. fluorescens*), то при додаванні 30 мкг/мл Fe^{3+} утворення цих сполук зменшувалось. Наявність Fe^{3+} у концентрації 1000 мкг/мл у поживному середовищі спричинила практично повну зупинку синтезу цих сполук.

Біотехнологічні особливості отримання сидерофорів інших бактерій. У статті (Sheng, Jia, Zhang, & Zeng, 2020) дослідники вивчали сидерофори, що

БИОТЕХНОЛОГІЇ

продукує бактерія *Brevibacillus brevis* GZDF3, та їх антимікробну активність проти *Candida albicans*. Крім того, проводили оптимізацію поживного середовища та досліджували вплив на синтез сидерофорів різноманітних факторів: рН, температури, джерел вуглецю та азоту, іонів металів та їх концентрацій.

У результаті виявили, що сахароза та аспарагін дають найвищу концентрацію сидерофорів, що становила 31,59 % SU та 31,64 % SU відповідно. Поєднання оптимізованої концентрації сахарози, аспарагіну і температури 32 °C сприяли утворенню 54,99% SU. Оптимальним для синтезу сидерофорів є рН 7,0. У результаті проведення досліджень з додаванням металів було виявлено, що збільшення концентрації Fe, Cu, Mn, Zn негативно впливало на синтез сидерофорів.

У статті (Santos, Neto, Machado, Soares, & Soares, 2014) описано оптимізацію середовища для культури *Bacillus megaterium*. Максимальна концентрація сидерофору у вихідному середовищі становила 1300 мкМ/л. Після підбору кількох джерел вуглецю максимальна продуктивність сидерофору ($1,182 \pm 115$ мкМ/г сухої біомаси) була досягнута при використанні гліцерину. Зміна концентрації джерела азоту (аргініну) не мала впливу. Також було доведено, що сидерофори продукуються в значно більшій кількості при перемішуванні 150 об/хв ($1\ 103 \pm 69$ мкМ/л через 48 год), ніж за відсутності аерації (223 ± 3 мкмоль/л через 20 днів).

У статті (Schwabeab, Sengesc, Bandowc, & Heine, 2020) авторами наведено дані про культивування *Gordonia rubripertincta* CWB2. Середовище оптимізували, додаючи різні джерела вуглецю (сахароза, глюкоза, фруктоза, сукцинат). Сукцинат виявився найкращим. У результаті використання підживлення сукцинатом була досягнута концентрація сидерофору дефероксаміну 178 мг/л.

У табл. 7 показано види бактерій, що продукують антимікробні сидерофори та умови їх культивування.

Таблиця 7. Бактеріальні сидерофори

Назва сидерофору	Продуцент	Джерело вуглецю та азоту, г/л	Концентрація сидерофорів	Література
Феритин	<i>Brevibacillus brevis</i> GZDF3	Сахароза — 15 L-аспарагін — 2	54,99 % SU	Sheng, Jia, Zhang & Zeng, 2020
Ізокінен	<i>Bacillus megaterium</i>	Глюкоза — 20 CH ₃ COONH ₄ — 3 Гідрохлорид аргініну — 1,5 Гліцерин — 20	$1,182 \pm 115$ мкМ/ г сухої біомаси	Santos, Neto, Machado, Soares & Soares, 2014
Дефероксамін E	<i>Gordonia rubripertincta</i> CWB2	Сукцинат — 4 NH ₄ Cl — 1	178 мг/л	Schwabeab, Sengesc, Bandowc & Heine, 2020

Біотехнологічні особливості отримання сидерофорів грибів і дріжджів. У (Hussein, & Joo, 2019) дослідники перевіряли на біосинтез сидерофорів 23 гриб-

BIOTECHNOLOGIES

кових штами, використовуючи бульйон Чапека-Докса. Після цього досліджували вплив іонів цинку різних концентрацій (50—250 мкг/мл) на синтез сидерофорів. У результаті виявилось, що найкращим продуцентом є штама *Penicillium commune* JJHO. Цей штама продукував найбільшу кількість сидерофору ферихрому (72,65% SU) при додаванні 150 мкг/мл іонів цинку порівняно з вихідним середовищем без цинку (67,37% SU).

У літературному джерелі (Szigeti, Szaniszló, Fazekas & Gyemant, 2014) описують культивування *Aspergillus fumigatus* AF293. Вихідне середовище — бульйон Баррґата, змінюють шляхом збільшення концентрації глюкози (10—100 г/л) та додавання амінокислот (аргінін, аспарагін, гліцин, глутамін, метіонін, орнітин або серин в концентрації 0,1—1 г/л). Підбирають оптимальне значення рН (4—9). Продуктивність синтезу сидерофору визначали у мг/г сухого міцелію. В результаті досліджень встановлено, що максимальний вихід сидерофору (19,6 мг/г) було досягнуто при початковій концентрації глюкози 102 г/л та глутаміну 5,2 г/л, рН 7,4.

У (Emri, Toth, & Nagy, 2013) проводили порівняння синтезу копрогену в двох штаммах: *P. nalgioense* S1 та *P. nalgioense* NCAIM F-001333. При культивуванні штамів на однакових вихідних середовищах синтез копрогену був майже однаковий (169 мг/л та 182 мг/л відповідно). Додавання заліза негативно вплинуло на синтез сидерофорів (0,8 мг/л та 0,9 мг/л відповідно). Після цього подальші дослідження проводили зі штамом *P. nalgioense* NCAIM F-001333 шляхом оптимізації зміни концентрації глюкози, глутамату натрію та рН. У результаті найбільший вихід сидерофору становив 238 мг/л при концентрації глюкози 47 г/л, глутамату натрію 5 г/л, рН 8.

Як повідомляється у (Wang, Chi, Li, & Wang, 2009), дріжджі *Aureobasidium pullulans* HN6.2 здатні виробляти сидерофор, що проявляє антимікробну активність проти *B. subtilis*, *Vibrio anguillarum* та *V. parahaemolyticus*.

У результаті було проведено оптимізацію поживного середовища шляхом зміни концентрації сахарози, K_2HPO_4 та додавання орнітину. Таким чином була підібрана оптимальна температура (28 °C) та кількість обертів перемішувального пристрою (170 об/хв). Як результат, була досягнута концентрація сидерофору 1,1 мг/мл. Умови біосинтезу сидерофорів, що продукуються грибами і дріжджами, показано у табл. 8.

Таблиця 8. Сидерофори грибного та дріжджового походження

Назва сидерофору	Продуцент	Джерело вуглецю та азоту, г/л	Концентрація	Література
1	2	3	4	5
Ферихром	<i>Penicillium commune</i> JJHO	Сахароза — 30 Нітрат натрію — 3	72,65 % SU	Hussein & Joo, 2019
Ферикроцин	<i>Aspergillus fumigatus</i> AF293	NaNO ₃ — 6 Глюкоза — 102 Глутамін — 5,2	19,6 мг/г сухого міцелію	Szigeti, Szaniszló, Fazekas & Gyemant, 2014

БИОТЕХНОЛОГІЇ

Продовження таблиці 8

1	2	3	4	5
Копроген	<i>Clonostachys compactiuscula</i> FKR-0021	<u>Середовище I:</u> Глюкоза — 20 Поліпептон — 5 Дріжджовий екстракт — 2 <u>Середовище II:</u> Рис змочений водою — 500 г	Із 4,5 кг культури: Копроген А — 26,8 мг; Копроген В — 8,4 мг; Копроген С — 77,2 мг; N ¹⁴ -пальмітоил-копроген — 41,1 мг	Ouchi, Watanabe, Nonaka & Muramatsu, 2020
Копроген	<i>Penicillium nalgiovense</i> NCAIM F-001333	Глюкоза — 47; Глутамат натрію — 5; NaNO ₃ — 3; K ₂ HPO ₄ — 1; KCl — 1; MgSO ₄ — 1	238 мг/л	Emri, Toth & Nagy, 2013
Копроген	<i>Penicillium nalgiovense</i> S1	Глутамат натрію — 4,9 Глюкоза — 49,1	169 мг/л	Emri, Toth & Nagy, 2013
Сидерофор гідроксаматного типу	<i>Aureobasidium pullulans</i> HN6.2	Сахароза — 3 Аміачна селітра — 3 Лимонна кислота — 1 Орнітин — 10 мМ.	1100 мг/л	Wang, Chi, Li & Wang, 2009

Висновки

Нині вчені по всьому світу продовжують вивчати сидерофори та їх вплив на мікроорганізми. Відкривають нові види цих сполук та описують їх властивості. Особливо активно ведуться дослідження з використання сидерофорів у медицині, оскільки розробка нових антимікробних препаратів є вкрай важливою в сучасному світі.

Представлений огляд літератури показує, що синтез сидерофорів значною мірою залежить як від типу мікроорганізму, так і від складу поживного середовища. Для різних продуцентів характерні певні особливості, що впливають на синтез сидерофорів, зокрема це природа джерела вуглецю та азоту, наявність певних солей. Однак спільним для всіх було те, що наявність Fe³⁺ в поживному середовищі негативно впливає на синтез або зупиняє його повністю. Все це необхідно враховувати під час культивування мікроорганізмів для досягнення максимальної продуктивності. Продовжуються пошуки нових штамів мікроорганізмів-продуцентів сидерофорів, проводиться оптимізація складу поживного середовища та умов культивування з метою отримання максимальної продуктивності сидерофорів. Залишаються відкритими питання вибору раціональних технологій подальшого виділення та очищення сидерофорів з метою отримання комерційних препаратів та їх використання у суспільній практиці.

Література

- Абатуров, А. Е., Крючко, Т. А. Медикаментозне обмеження доступності іонів заліза для патогенних бактерій (частина 1). Здоров'я дитини. 2018. Т. 13, № 4. С. 416—425.
Абатуров, А. Е., Крючко, Т. А. Медикаментозне обмеження доступності іонів заліза для патогенних бактерій (частина 2). Здоров'я дитини. 2018. Т. 13, № 5. С. 188—196.

BIOTECHNOLOGIES

- Івах, В. В., Русакова, М. Ю. Значення сидерофорів ризосферних псевдомонад при створенні препаратів для біологічного захисту рослин: матеріали IV наук.-практич. всеукр. конф. 2013. С. 1—3.
- Шевченко, В. В., Русакова, М. Ю. Характеристика продукції сидерофорів деякими штамми псевдомонад. Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології: матеріали VIII наук.-практич. конф. 2019. С. 292—295.
- Матвєєва, Л. Пробиотичні бактерії роду *Bacillus*: нормалізація мікробіоценозу кишечника. Гастроентерологія: наукові праці. 2019, № 4 (449). С. 10
- Мінухіна, В. В., Звягінцева, Т. В. *Антибіотикорезистентність. Сучасний погляд на проблему та шляхи подолання*: збірник тез міжкафедральної науково-практичної конференції. Х.: ХНМУ. 2014. 16 с.
- Пирог, Т. П. *Загальна мікробіологія* / Т. П. Пирог. К.: НУХТ, 2010. 632 с.
- Русакова, М. Ю. Утворення сидерофорів клітинами синьогнійної палички за впливу препарату "Бактеріофаг псевдомонас аеругіноза". Вісник львівського університету. 2016. № 71. С. 222—229.
- Шкут О.О., Карпов О.В. Можливості використання сидерофорів. Наукові праці НУХТ. 2017. Т. 23, №1. С. 49—57.
- Шульга, О., Джогель, Д., Карпатко, О., Пристай, М., Вільданова, Р. Поверхнево-активні комплекси для штаму *Pseudomonas aeruginosa* JRV-L. SCHMT. 2017. С. 179—185.
- Abdul-Mutakabbir, J. C., Alosaimy, S. (2020). Cefiderocol: A Novel Siderophore Cephalosporin against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *Pharmacotherapy*, 40(12), 1228—1247. doi: 10.1002/phar.2476.
- Adler, C., Corbalan, N. S., Seyedsayamdost, M. R. (2012). Catechol Siderophores Protect Bacteria from Pyochelin Toxicity. *J Plos Org*. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046754>.
- Akemi, K., Mikihiro, F., Hiroaki, K. (2020). Probiotic-derived ferrichrome inhibits the growth of refractory pancreatic cancer cells. *International Journal of Oncology*, 721—732. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5096>. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2020.5096>.
- Albelda-Berenguera, M., Monachona, M. (2020). Siderophores: From natural roles to potential applications. *Advances in Applied Microbiology*, 106, 193—225. <https://doi.org/10.1016/bs.aamb.2018.12.001>.
- Bonomo, R. A. (2019). Cefiderocol: A Novel Siderophore Cephalosporin Defeating Carbapenem-resistant Pathogens. *Clin Infect Dis*, 69, 519—520. doi:10.1093/cid/ciz823.
- Braun, V., Pramanik, A., Gwinner, T. (2009). Sideromycins: tools and antibiotics. *BioMetals*, 22 (3), 3—13. DOI: 10.1007/s10534-008-9199-7.
- Chakraborty, K., Kizhakkekalam, V. K., Joy, M. (2022). Bacillibactin class of siderophore antibiotics from a marine symbiotic *Bacillus* as promising antibacterial agents. *Appl Microbiol Biotechnol*, 106(1), 329—340. doi: 10.1007/s00253-021-11632-0.
- Chiani, M., Akbarzadeh, A., Farhangi, A. (2010). Optimization of Culture Medium to Increase the Production of Desferrioxamine B (Desferal) in *Streptomyces pilosus*. *Pak J Biol Sci*, 13(11), 545—550. doi: 10.3923/pjbs.2010.546.550.
- Chuljerm, H., Deeudom, M., Fucharoen, S. (2020). Characterization of two siderophores produced by *Bacillus megaterium*: A preliminary investigation into their potential as therapeutic agents. *BBA — General Subjects*, 1864(10), 1—28.
- Eickhoff, M. J., Bassler, B. L. (2020). *Vibrio fischeri* siderophore production drives competitive exclusion during dual-species growth. *Mol Microbiol*, 114(2), 244—261. DOI: 10.1111/mmi.14509.
- Emri, T., Toth, V., Nagy, C. T. (2013). Towards high-siderophore-content foods: optimisation of coprogen production in submerged cultures of *Penicillium nalgiovense*. *J Sci Food Agric*, 93(9), 2221—8. DOI: 10.1002/jsfa.6029.
- Gáll, T., Lehoczki, G., Gyémánt, G. (2016). Optimization of desferrioxamine E production by *Streptomyces parvulus*. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 63(4), 475—498. DOI: 10.1556/030.63.2016.029.
- Golonka, R., Yeoh, B.S., Vijay-Kumar, M. (2019). The Iron Tug-of-War between Bacterial Siderophores and Innate Immunity. *J Innate Immun*, 11, 249—262. <https://doi.org/10.1159/>

БІОТЕХНОЛОГІЇ

000494627.

Górska, A., Sloderbach, A. (2014). Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy. *Trends Pharmacol Sci.*, 35(9), 442—9. doi: 10.1016/j.tips.2014.06.007.

Gumienna-Kontecka, E., Peggy, L. C. (2019). Siderophore-Drug Conjugates for the Treatment of Infectious Diseases. *Met Ions Life Sci.*, 19. doi: 10.1515/9783110527872-013.

Hiroaki, K., Mikihiro, F., Hiroki, T. (2016). Probiotic-derived ferrichrome inhibits colon cancer progression via JNK-mediated apoptosis. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms12365.

Hussein, K.A., Joo, J.H. (2019). Zinc Ions Affect Siderophore Production by Fungi Isolated from the *Panax ginseng* Rhizosphere. *J Microbiol Biotechnol.*, 29(1), 105—113. doi: 10.4014/jmb.1712.12026.

Kishimoto, S., Nishimura, S., Hattori, A. (2014). Chlorocatechins A and B from *Streptomyces* sp.: new siderophores containing chlorinated catecholate groups and an acylguanidine structure. *Org Lett.*, 16(23), 6108—11. doi: 10.1021/ol502964s.

Matar M., Albarri O., Makky E. (2020). A Glance on the Role of Bacterial Siderophore from the Perspectives of Medical and Biotechnological Approaches. *Curr Drug Targets*, 21(13), 1326—1343. doi: 10.2174/1389450121666200621193018.

Mattos, A. L., Constantino, V. R. (2013). Desferrioxamine-cadmium as a "Trojan horse" for the delivery of Cd to bacteria and fungi. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 27(2), 103—8. doi: 10.1016/j.jtemb.2012.09.001.

Moon, J.H., Herr, Y., Kim, S. W. (2011). In vitro activity of deferoxamine against *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 323(1), 61—67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02357.x>.

Mortazavi, M., Akbarzadeh, A. (2012). Improvement of Desferrioxamine B production of *Streptomyces pilosus* ATCC 19797 with use of protease inhibitor and minerals related to its activity. *Ind J Clin Biochem.*, 27(3), 274—277. doi: 10.1007/s12291-012-0197-8.

Mular, A., Shanzer, A., Kozłowski, H. (2021). Cyclic Analogs of Desferrioxamine E Siderophore for 68 Ga Nuclear Imaging: Coordination Chemistry and Biological Activity in *Staphylococcus aureus*. *Inorg Chem.*, 60(23), 17846—17857. doi: 10.1021/acs.inorgchem.

Murugappan, R. M., Aravinth, A., Rajarobbia, R., Karthikeyan, M., Alamelu, M. R. (2012). Optimization of MM9 Medium Constituents for Enhancement of Siderophoregenesis in Marine *Pseudomonas putida* Using Response Surface Methodology. *Indian J Microbiol.*, 52(3), 433—41. doi: 10.1007/s12088-012-0258-y.

Nathan, P. (2017). The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1—32. <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.002>.

Negash, K. H., Norris, K. S. (2019). Siderophore-Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs Molecules, 24(18), 3314. doi: 10.3390/molecules24183314.

Olshvang, E., Szebesczyk, A., Kozłowski, H., Hadar, Y. (2015). Biomimetic ferrichrome: structural motifs for switching between narrow- and broad-spectrum activities in *P. putida* and *E. coli*. *Dalton Trans.*, 44(48), 20850—8. doi: 10.1039/c5dt02685g.

Ouchi, T., Watanabe, Y., Nonaka, K., Muramatsu, R. (2020). Clonocoprogens A, B and C, new antimalarial coprogens from the Okinawan fungus *Clonostachys compactiuscula* FKR-0021. *J Antibiot* (Tokyo), 73(6), 365—371. doi: 10.1038/s41429-020-0292-7.

Paquette S. J., Reuter T. (2020). *Escherichia coli*: Physiological Clues Which Turn On the Synthesis of Antimicrobial Molecules. *Vet Sci.*, 7(4). doi: 10.3390/vetsci7040184.

Phelan, J. J., McQuaid, K., Kenny, C. (2020). Desferrioxamine Supports Metabolic Function in Primary Human Macrophages Infected With *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Immunol.*, 13(11), 836. doi: 10.3389/fimmu.2020.00836.

Ringel, M. T., Brüser, T. (2018). The biosynthesis of pyoverdines. *Microbial Cell*, 5(10), 424—437. doi: 10.15698/mic2018.10.649.

Ronan, J. L., Kadi, N., McMahon, S. A. (2018). Desferrioxamine biosynthesis: diverse hydroxamate assembly by substrate-tolerant acyl transferase Des C. *The royal society*, 337 (1748). <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0068>.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., Tribedi, P. (2016). Microbial

BIOTECHNOLOGIES

siderophores and their potential applications: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23, 3984–99. doi: 10.1007/s11356-015-4294-0.

Santos, S., Neto, I. F., Machado, M. D., Soares, H. M., Soares, E. V. (2014). Siderophore production by *Bacillus megaterium*: effect of growth phase and cultural conditions. *Appl Biochem Biotechnol.*, 172(1), 549–60. doi: 10.1007/s12010-013-0562-y.

Sass, G., Miller Conrad, L. C., Nguyen, T. H., Stevens, D. A. (2020). The *Pseudomonas aeruginosa* product pyochelin interferes with *Trypanosoma cruzi* infection and multiplication in vitro. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 114 (7), 492–498. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trz136>. <https://academic.oup.com/trstmh/article/114/7/492/5810320>.

Schwabeab, R., Sengesc, C. H., Bandowc, J. E., Heine, T. (2020). Cultivation dependent formation of siderophores by *Gordonia rubripertincta* CWB2. *Microbiological Research*, 238. doi: 10.1016/j.micres.2020.126481.

Sheng, M. M., Jia, H. K., Zhang, G. Y., Zeng, L.N. (2020). Siderophore Production by Rhizosphere Biological Control Bacteria *Brevibacillus brevis* GZDF3 of *Pinelliaternata* and Its Antifungal Effects on *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol.*, 30(5), 689–99. doi: 10.4014/jmb.1910.10066.

Shaikh, S. S., Wani, S. J., Sayyed, R. Z. (2016). Statistical-based optimization and scale-up of siderophore production process on laboratory bioreactor. *Biotech.*, 6(1), 69. doi: 10.1007/s13205-016-0365-2.

Silva-Stenico, M. E., Pamplona, C. S., Sturion Lorenzi, A. (2011). Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research*, 166 (3), 161–175.

Sinatra, J. A., Colby, K. (2018). Notes from the Field: Fatal *Vibrio anguillarum* Infection in an Immunocompromised Patient — Maine, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, 67(34), 962–63. doi: 10.15585/mmwr.mm6734a5.

Sontag, B., Gerlitz, M., Paululat, T. (2006). Oxachelin, a novel iron chelator and antifungal agent from *Streptomyces* sp. GW9/1258. *J Antibiot.*, 59(10), 659–63. doi: 10.1038/ja.2006.88.

Swayambhu, G., Bruno, M. (2021). Siderophore natural products as farmaceutic agents. *Current Opinonin Biotechnology*, 69, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.01.021>.

Szigeti, Z.M., Szaniszló, S., Fazekas, E., Gyemant, G. (2014). Optimization of triacetylfulvarinine C and ferricrocin productions in *Aspergillus fumigatus*. *Acta Microbiol Immunol Hung.*, 61(2), 107–19. doi: 10.1556/AMicr.61.2014.2.2.

Takuya, I., Mikihiro, F., Hiroaki, K. (2021). Bacteria-derived ferrichrome inhibits tumor progression in sporadic colorectal neoplasms and colitis-associated cancer. *Cancer Cell Int.* DOI: 10.1186/s12935-020-01723-9.

Vindeirinho, J. M., Soares, H., Soares, E. V. (2021). Modulation of Siderophore Production by *Pseudomonas fluorescens* Through the Manipulation of the Culture Medium Composition. *Appl Biochem Biotechnol.*, 193(3), 607–18. doi: 10.1007/s12010-020-03349-z.

Wang, W. L., Chi, Z. M., Chi, Z., Li, J., Wang, X. H. (2009). Siderophore production by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* and its antimicrobial activity. *Bioresour Technol.*, 100(9), 2639–41. doi: 10.1016/j.biortech.2008.12.010.

Wang, W., Zhe, Chi, Liu, G., Buzdar, M. (2009). Chemical and biological characterization of siderophore produced by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2 and its antibacterial activity. *Biometals*, 22, 965–972. DOI 10.1007/s10534-009-9248-x.

Wang, L., Li, X., Mu, Y. (2019). The iron chelator desferrioxamine synergizes with chemotherapy for cancer treatment. *J Trace Elem Med Biol.*, 56, 131–138. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.07.008.

Ye, L., Hildebrand, F., Dingemans, J., Ballet, S., Laus, G., Matthijs, S. (2014). Draft genome sequence analysis of a *Pseudomonas putida* W15Oct28 strain with antagonistic activity to Gram-positive and *Pseudomonas* sp. Pathogens. *PLoS One*, 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110038>. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0110038>.

Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", Квітень – Травень 2022 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1.

23. Антимікробна активність сидерофорів

Тетяна Підгерьська, Юрій Карлаш

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. Сьогодні є досить актуальним пошуки нових антимікробних засобів для боротьби з великою кількістю резистентних форм мікроорганізмів. За останні кілька років все більше до себе привертають увагу залізоспецифічні хелатори – сидерофори з антимікробними властивостями, які можуть бути використані в медицині.

Матеріали та методи. Здійснено аналіз літературних джерел з метою встановлення антиімкробної дії сидерофорів різних мікроорганізмів.

Результати та обговорення. Бактерії роду *Pseudomonas*, продукують сидерофори піовердини. Дані сидерофори можуть бути розглянуті для застосування в медицині, оскільки володіють антимікробними властивостями проти певної кількості патогенів, що викликають захворювання людини: *Staphylococcus aureus* NCIM 2079, *Asperillus niger* NCIM 586, *Microsporium gypseum* MTCC 2830, *Aspergillus flavus* MTCC 7133 та інші [1].

В роботі [2] повідомляється про сидерофори, що продукує бактерія *Brevibacillus brevis* GZDF3 та їх антимікробну активність проти *Candida albicans*, яка здатна спричиняти опортуністичні інфекції людини. Було проведено перевірку інгібування росту *C. albicans* після обробки культуральною рідиною. Зона затримки росту патогена становить 45 ± 3 мм.

Було встановлено, що гриб *Clonostachys compactiuscula* FKR-0021, синтезує сидерофори копрогени, які впливають на збудників малярії *Plasmodium falciparum* FCR3 та *P. falciparum* K1 *in vitro*. *C. compactiuscula* FKR-0021 синтезує такі копрогени як: копроген А, В, С та N¹⁴-пальмітоїл-копроген. Найбільш ефективним виявився копроген А, концентрація напівмаксимального інгібування IC₅₀ для штаму *P. falciparum* K1 9,9 мкМ та *P. falciparum* FCR3 5,5 мкМ [3].

Висновки. Мікробні сидерофори мають досить великий потенціал застосування в медицині та можуть бути ефективними при розробці сучасних антиімкробних препаратів.

Література

1. Murugappan R. M., Aravinth A., Rajaraoobia R., Karthikeyan M., Alamelu M. R. Optimization of MM9 Medium Constituents for Enhancement of Siderophoregenesis in Marine *Pseudomonas putida* Using Response Surface Methodology. *Indian J Microbiol.* 2012; 52(3): 433-41. doi: 10.1007/s12088-012-0258-y
2. Sheng M.M., Jia H.K., Zhang G.Y., Zeng L.N. Siderophore Production by Rhizosphere Biological Control Bacteria *Brevibacillus brevis* GZDF3 of *Pinellia ternata* and Its Antifungal Effects on *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol.* 2020; 30(5): 689-99. doi: 10.4014/jmb.1910.10066
3. Ouchi T., Watanabe Y., Nonaka K., Muramatsu R. Clonocoprogens A, B and C, new antimalarial coprogens from the Okinawan fungus *Clonostachys compactiuscula* FKR-0021. *J Antibiot (Tokyo).* 2020; 73(6): 365-371. doi: 10.1038/s41429-020-0292-7