

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**Факультет медико-фармацевтичних технологій**  
**Кафедра біотехнології**

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему: **«ОРГАНІЗАЦІЯ ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІОФАГА**  
**ПОЛІВАЛЕНТНОГО»**

**Виконала:** здобувачка вищої освіти групи БТ621(4,6з)-01  
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія  
освітньої програми Біотехнологія

Вікторія КОСЕНКО

**Керівник:** Завідувачка кафедри біотехнології, д.фарм.н, проф.  
Наталя ХОХЛЕНКОВА

**Рецензент:** Начальник відділу фармацевтичної розробки ТОВ  
«БІОЛІК ФАРМА», к.фарм.н., с.н.с.

Олена НАЗАРОВА

## АНОТАЦІЯ

Обґрунтовано склад трикомпонентного коктейлю бактеріофагів, що охоплює основні збудники гнійно-запальних інфекцій. Розроблено повний цикл виробництва серії об'ємом 50 л. Впроваджено сучасну схему очищення продукту методом тангенціальної ультрафільтрації, що забезпечує високу чистоту препарату від бактеріальних ендотоксинів. Результати роботи можуть бути використані для впровадження у виробництво інноваційних засобів фаготерапії в межах стратегії імпортозаміщення та боротьби з антибіотикорезистентністю.

*Ключові слова:* бактеріофаги, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, літичний цикл, ультрафільтрація, GMP, біотехнологія.

## ANNOTATION

The composition of a three-component bacteriophage cocktail has been substantiated, covering the primary causative agents of purulent-inflammatory infections. A full production cycle for a 50-liter batch has been developed. A modern product purification scheme using tangential flow filtration (TFF) has been implemented, ensuring high purity of the preparation and effective removal of bacterial endotoxins. The results of this work can be utilized for the industrial implementation of innovative phage therapy agents within the framework of import substitution strategies and the global effort to combat antibiotic resistance.

*Keywords:* bacteriophages, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, lytic cycle, ultrafiltration, GMP, biotechnology.

## ЗМІСТ

Вступ.....	3
1 Аналітичний огляд.....	6
2 Характеристика готового продукту, сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	18
2.1 Характеристика готового продукту.....	18
2.2 Характеристика сировини, матеріалів, напівпродуктів.....	22
2.3 Обґрунтування вибору біологічних об'єктів для полівалентного бактеріофага .....	25
2.4 Характеристика біологічних об'єктів .....	30
3 Технологічна частина.....	44
3.1 Розрахунок матеріального балансу.....	44
3.2 Вибір обладнання .....	46
3.3 Опис технологічного процесу.....	49
3.4 Схеми виробництва.....	55
3.5 Контроль виробництва.....	61
3.6 Екологічні аспекти виробництва.....	68
Висновок.....	72
Список використаної літератури.....	74
Додатки.....	80

					<i>162.01.02.00 000 ПЗ</i>			
<i>Змн..</i>	<i>Арк.</i>	<i>№ докум.</i>	<i>Підпис</i>	<i>Дата</i>	<i>Організація виробництва бактеріофага полівалентного</i>  <i>Пояснювальна записка</i>	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розробив</i>		<i>Косенко</i>					2	73
<i>Перевірив</i>		<i>Хохленкова</i>				<i>НФаУ</i> <i>Кафедра біотехнології</i>		
<i>Рецензент.</i>								
<i>Затвердив</i>		<i>Хохленкова</i>						

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Стрімке зростання резистентності патогенних мікроорганізмів до антибіотиків є однією з найбільших загроз для світової системи охорони здоров'я. У цьому контексті бактеріофаготерапія повертає собі статус провідного методу боротьби з бактеріальними інфекціями. Створення полівалентних препаратів, що містять коктейлі літичних фагів, дозволяє одночасно впливати на декілька видів збудників, мінімізуючи ризик селекції стійких штамів бактерій. Основними етіологічними агентами гнійно-запальних процесів залишаються *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* та *Escherichia coli*, що зумовлює необхідність виробництва комплексних засобів, здатних ефективно лізувати ці мікроорганізми.

Незважаючи на значний досвід використання фагів, організація сучасного виробництва згідно з принципами GMP залишається складним завданням. Це вимагає ретельного відбору штамів, таких як *Staphylococcus phage Sb-1*, *Streptococcus phage A25* та *Escherichia phage T4*, які характеризуються високою літичною активністю та відсутністю генів вірулентності. Впровадження технології випуску такого препарату на базі вітчизняного підприємства, наприклад, ТОВ «БІОЛІК ФАРМА» (м. Харків), що володіє необхідними потужностями для стерильного виробництва імунобіологічних засобів, є стратегічно важливим кроком для забезпечення національної лікарської безпеки та імпортозаміщення у сегменті антибактеріальних препаратів.

**Мета роботи** полягає у теоретичному обґрунтуванні та розробці технологічної схеми виробництва полівалентного бактеріофага на основі вірусів *Sb-1*, *A25* та *T4*.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		3

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання:**

1. Провести аналіз наукової літератури щодо біологічних властивостей бактеріофагів та механізмів їхньої взаємодії з клітиною-господарем.
2. Обґрунтувати вибір літичних фагів як основу безпечного терапевтичного засобу та проаналізувати їхню геномну організацію.
3. Обґрунтувати та розрахувати склад специфічних живильних середовищ для вирощування культур клітин-господарів та параметри культивування для кожного штаму-продуцента.
4. Виконати розрахунок матеріального балансу виробництва з отриманням цільового об'єму фаголізатів.
5. Скласти технологічну та апаратурну схеми виробництва, включаючи стадії багатоступеневої фільтрації та стерильного розливу.
6. Визначити критичні точки контролю процесу для забезпечення стабільного титру вірусних часток у готовому продукті.
7. Провести екологічну оцінку технології, приділивши увагу знезараженню бактеріальних відходів.

**Об'єктом роботи** є технологічний процес виробництва полівалентного бактеріофага.

**Предметом роботи** є організація виробництва, штам-продуцент, параметри літичного циклу та критичні точки контролю якості, що гарантують чистоту та активність препарату.

**Методи.** Для вирішення завдань використано аналітичні, мікробіологічні, розрахункові та графічні методи.

**Практичне значення отриманих результатів.** Обґрунтовано технологію полівалентного бактеріофага, яку потенційно можна реалізувати на вітчизняному підприємстві, зокрема в умовах підприємства ТОВ «БІОЛІК ФАРМА». Розраховано матеріальний баланс, що дозволяє оптимізувати витрати сировини при отриманні високотитражних концентратів фагів,

									Арк.
									4
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				

сформована апаратурна схема. Результати роботи можуть бути впроваджені для розширення арсеналу вітчизняних антимікробних засобів, ефективних проти мультирезистентних штамів бактерій.

Окремі результати роботи представлені на VI міжнародній науково-практичній конференції «Youth Pharmacy Science» (10-11 грудня 2025 р., м. Харків) та опубліковані в збірці тез (додаток).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		5

# 1 АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

## 1.1 Сфери застосування бактеріофагів

Сучасний стан розвитку біотехнології характеризується зміною парадигми боротьби з бактеріальними інфекціями, де бактеріофаги розглядаються не лише як інструмент фундаментальних досліджень, а й як універсальні агенти для контролю мікробіологічного фону в медицині, сільському господарстві та промисловості. Унікальною особливістю бактеріофагів, що зумовлює їх перевагу над традиційними хімічними антисептиками та антибіотиками, є висока специфічність дії, здатність до самореplikації безпосередньо у вогнищі інфекції та повна безпечність для еукаріотичних клітин і природної мікрофлори організму [2, 6, 16].

У клінічній медицині застосування бактеріофагів є пріоритетним напрямком у терапії інфекцій, спричинених мультирезистентними штамми патогенів. Полівалентні препарати, що містять літичні штами, демонструють високу ефективність у лікуванні гнійно-запальних процесів, опікових ран та хронічних остеомієлітів. Особливе значення має здатність фагів синтезувати деполімерази - специфічні ферменти, що руйнують екзополісахаридний матрикс бактеріальних біоплівків. Це дозволяє здійснювати ефективну санацію вогнищ інфекції, які є недоступними для більшості сучасних антибіотиків. Окрім терапевтичної ролі, фаги активно використовуються у фагодіагностиці для швидкої ідентифікації збудників у клінічних ізолятах, що дозволяє оперативно призначити етіотропне лікування [16, 22, 23].

Сільське господарство та ветеринарія представляють ще один масштабний ринок для фагових препаратів. Впровадження фаготерапії в тваринництво дозволяє реалізувати концепцію «Єдиного здоров'я», спрямовану на зниження використання антибіотиків у продуктах харчування

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		6

[38]. Використання фагів для лікування маститів у великої рогатої худоби та профілактики колібактеріозу в птахівництві забезпечує отримання екологічно чистої продукції без залишків антибактеріальних речовин, що є критичним для міжнародної сертифікації продуктів харчування. У рослинництві бактеріофаги застосовуються як біопестициди для захисту культур від бактеріального опіку та гнилі, не впливаючи при цьому на корисних комах-запилювачів та ґрунтову мікрофлору [3].

Харчова промисловість використовує бактеріофаги як ефективний засіб біоконтролю для підвищення безпеки продукції та подовження термінів її зберігання. Обробка м'ясної, молочної та рибної продукції фаговими розчинами дозволяє селективно елімінувати такі небезпечні патогени, як *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* та ентеропатогенні штами *Escherichia coli*. Важливою перевагою є те, що фаги не змінюють органолептичних властивостей харчових продуктів і є повністю біодеградабельними. У промисловій санітарії фагові коктейлі використовуються для дезінфекції виробничих ліній, де вони ефективно видаляють стійкі біоплівки на обладнанні, запобігаючи перехресній контамінації [3, 14].

Екологічний напрямок застосування фагів охоплює сферу очищення стічних вод та моніторингу довкілля. Фаги використовуються для корекції мікробіоценозу на очисних спорудах, зокрема для боротьби з надмірним розростанням нитчастих бактерій, що покращує технологічні показники активного мулу. Крім того, розробка біосенсорів на основі фагів дозволяє здійснювати високочутливий моніторинг патогенів у водних екосистемах та системах водопостачання в режимі реального часу [3, 5, 15].

Таким чином, організація виробництва полівалентного бактеріофага на вітчизняному підприємстві відповідає глобальним технологічним трендам і має потенціал для впровадження в різних галузях національної економіки, забезпечуючи високу біологічну безпеку та екологічну стабільність.

## 1.2 Перспективність застосування бактеріофагів як альтернативи антибіотикотерапії

Історично впровадження антибіотиків у медичну практику стало однією з найважливіших подій у галузі охорони здоров'я, що дозволило суттєво знизити рівень захворюваності та смертності від бактеріальних інфекцій. Проте на сучасному етапі ефективність антимікробної терапії стрімко знижується через надмірне та неконтрольоване застосування препаратів, що призвело до формування глобальної резистентності мікроорганізмів.

Бактеріальні види використовують складні внутрішні механізми стійкості, детерміновані хромосомними мутаціями. Це призводить до модифікації рецепторів та втрати специфічних мішеней, з якими мають взаємодіяти антибіотики. Згідно зі звітом Всесвітнього економічного форуму про глобальні ризики, антибіотикорезистентність визнана критичною загрозою для людства. Поява мультирезистентних (MDR) та екстремально резистентних (XDR) штамів фактично повертає медицину до «до-антибіотикової ери», де інфекційні агенти стають невиліковними [16].

Основні механізми антибіотикорезистентності [15]:

1. Ферментативна інактивація – синтез бактеріальних ферментів, що руйнують молекулу антибіотика.
2. Ефлюкс – активне виведення препарату з клітини за допомогою спеціальних насосів.
3. Зниження проникності – формування біоплівки та зміна структури клітинної стінки, що перешкоджає дифузії ліків.
4. Альтернативні метаболічні шляхи – зміна біохімічних процесів, які є мішенями для антимікробних засобів.
5. Надмірна експресія мішені – створення надлишкової кількості молекул-мішеней, що нівелює дію препарату.

									Арк.
									8
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				

У пошуках нових засобів боротьби з резистентними патогенами (зокрема представниками групи ESKAPE – акронім, що об'єднує шість найбільш проблемних бактеріальних патогенів, які демонструють високий рівень стійкості до антибіотиків, *E - Enterococcus faecium*, *S - Staphylococcus aureus*, *K - Klebsiella pneumoniae*, *A - Acinetobacter baumannii*, *P - Pseudomonas aeruginosa*, *E - Enterobacter spp.*) особлива увага приділяється фаготерапії [15]. Бактеріофаги – це облигатні паразити бактерій, які характеризуються високою специфічністю, здатністю до саморегуляції чисельності та безперервною коєволюцією разом із господарем.

До основних переваг фагів порівняно з антибіотиками слід віднести:

1. специфічність - вони вражають лише конкретні штами патогенів, не порушуючи нормальну мікробіоту;
2. проникнення в біоплівки - фаги та їхні ферменти здатні деградувати матрикс біоплівок, що є недоступним для більшості антибіотиків;
3. еволюційна адаптивність - на відміну від статичних хімічних сполук, фаги постійно адаптуються до нових механізмів захисту бактерій.

Аналіз переваг та недоліків фаготерапії порівняно з антибіотикотерапією наведено у табл. 1.1 [15, 16, 23, 39].

Таблиця 1.1

Порівняльна характеристика бактеріофагів та антибіотиків у терапевтичній практиці

Переваги фаготерапії	Спільні риси фаго- та антибіотикотерапії	Недоліки фаготерапії
Висока специфічність - препарат не пригнічує нормальну мікробіоту організму.	Вимоги до рН - для введення препарату необхідне нейтральне середовище.	Вузкий спектр дії - вимагає попередньої ідентифікації збудника (неможливість емпіричного призначення).
Саморегуляція - життєдіяльність фагів припиняється після	Залежність результату - успіх терапії залежить від терміну початку	Імуногенність - потенційне вироблення нейтралізуючих антитіл



дозволяє швидко досягати лізису патогенів (наприклад, *S. aureus*, *A. baumannii*) без ризику розвитку горизонтального перенесення генів.

2. Рекомбінантні технології. Використання методів генетичної інженерії дозволяє створювати модифіковані фаги з покращеними характеристиками. Це включає розширення спектра дії, зниження імуногенності та використання фагів як векторів для доставки антибактеріальних генів.

3. Фагові коктейлі та синергія з антибіотиками. Найбільш перспективним підходом є використання коктейлів (суміші кількох типів фагів) та стратегії фаго-антибіотикового синергізму. Дослідження показують, що комбіноване застосування фагів та субінгібіторних концентрацій антибіотиків (наприклад, ципрофлоксацину або цефотаксиму) призводить до скорочення латентного періоду розмноження фагів; збільшення виходу фагових часток; ефективної ерадикації мультирезистентних штамів, таких як MRSA та *K. pneumoniae*.

Незважаючи на складність нормативного регулювання фаготерапії у багатьох країнах, накопичені дані підтверджують її високий потенціал. Бактеріофаги та їхні похідні стають фундаментом медицини майбутнього, забезпечуючи ефективні засоби для подолання кризи антибіотикорезистентності.

### 1.3 Загальна характеристика полівалентного бактеріофагу для *Staphylococcus*, *Streptococcus* та *E. coli*

Об'єктом роботи є полівалентний бактеріофаг, що являє собою специфічний комбінований коктейль бактеріофагів, розроблений для цілеспрямованої терапії інфекцій, викликаних штамми *Staphylococcus*, *Streptococcus* та ентеропатогенними кишковими паличками (*Escherichia coli*).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		11

Як аналог використовується препарат Phago-SES Bacteriophage, виробник Eliava Biopreparations, Грузія [17]. Механізм дії препарату базується на здатності вірулентних фагів до специфічного лізису клітин патогена, що зумовлює його високу ефективність при лікуванні гнійно-запальних, ентеритних та хірургічних інфекцій, викликаних збудниками [14]:

- *Staphylococcus aureus* є головним чинником хірургічних інфекцій, остеомієлітів, опікових нагноєнь та піодермій у новонароджених;
- *Streptococcus* (зокрема *S. pyogenes*) є основним збудником бешихи (рожистого запалення), ангін, фарингітів та інфекцій м'яких тканин;
- *Escherichia coli* є ключовим збудником уrogenітальних інфекцій, гастроентероколітів та сепсису у новонароджених.

Завдяки широкому спектру літичної активності препарат демонструє наступну терапевтичну активність:

- отоларингологія та пульмонологія - лікування отитів, тонзилітів, ларингітів, ринітів, синуситів, а також бронхітів та пневмоній, бронхіти та плеврити, ускладнені коковою флорою, добре піддаються санації фагами під час бронхоскопії;
- хірургія та дерматологія - терапія фурункульозу, карбункульозу, абсцесів, маститів, флегмон та інфікованих ран, остеомієліти та інфекції після трансплантації суглобів часто спричинені MRSA (резистентним стафілококом);
- гастроентерологія - корекція дисбактеріозів, лікування гастроентероколітів та холециститів;
- урологія та гінекологія - застосування при уретритах, циститах, пієлонефритах та ендометритах;
- педіатрія - омфаліт (запалення пупкового кільця) та сепсис новонароджених часто мають стафілококову або ешерихіозну етіологію;
- офтальмологія - стафілококи та стрептококи - найчастіша причина

										Арк.
										12
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ					

гнійних кон'юнктивітів;

- стоматологія - лікування запальних процесів ротової порожнини (стоматити, гінгівіти).

Аналіз терапевтичного потенціалу препарату дозволяє виділити декілька визначальних аспектів:

- етіологічна універсальність - препарат охоплює найширший спектр збудників, що є критично важливим при лікуванні мікст-інфекцій у хірургічній, педіатричній та отоларингологічній практиці;

- клінічна гнучкість - широка номенклатура показань - від поверхневих піодермій до системних септичних станів та глибоких остеомієлітів - підтверджує доцільність використання фаготерапії як альтернативи або доповнення до традиційних антибіотиків, особливо у випадках інфікування резистентними штамми (зокрема MRSA);

- екологічність та безпека - здатність препарату вибірково знищувати патогени без пригнічення нормофлори (наприклад, при корекції дисбактеріозів) робить його пріоритетним засобом у сучасній персоналізованій медицині.

Підсумовуючи загальну характеристику полівалентного бактеріофага, можна зробити висновок, що даний біопрепарат є високоефективним інструментом таргетованої терапії. Його унікальність полягає у синергічному поєднанні вірулентних фагів, здатних до специфічного лізису ключових опортуністичних патогенів: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* та *Escherichia coli*.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		13

## 1.4 Протоколи ізоляції бактеріофагів для *Staphylococcus*, *Streptococcus* та *E. coli*

Основними мішенями препарату є *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* та різні серотипи ентеропатогенної *E. coli*, тому розглянемо протоколи ізоляції цих видів бактеріофагів.

Ізоляція бактеріофагів з навколишнього середовища (наприклад, стічних вод, ґрунту чи фекалій) є стандартним процесом, який включає збір зразків, фільтрацію, збагачення на бактеріях-господарях, ідентифікація фагів та очищення. Протоколи ізоляції є типовими для лабораторних умов і вимагають стерильності, дотримування біобезпеки (BSL-2 для патогенних штамів) для уникнення контамінації та зараження.

Протокол ізоляції фагів проти *Staphylococcus* (наприклад, *S. aureus*, включаючи MRSA) базується на методах ізоляції лізуючих фагів з стічних вод, де фаги часто зустрічаються через наявність бактерій-господарів. Він оптимізований для високого виходу і включає етапи збагачення та очищення [32].

Матеріали: зразки стічних вод (50 мл), зібрані з міських каналізаційних систем, лікарень або тваринницьких ферм; штами-господарі: *S. aureus* (клінічні ізоляти або еталонний штам ATCC 29213); середовища: триптиказо-соєвий бульйон (TSB) - універсальне рідке середовище, що застосовувалося для інтенсивного вирощування широкого спектра мікроорганізмів та накопичення бактеріальної маси, агар Лурія-Бертані (LB) - використовувався у двох варіаціях для проведення фагового аналізу: твердий агар (1,5%) для формування базового шару та культивування колоній бактерій; м'який (напіврідкий) агар (0,7%) для використання у методі подвійних агарових шарів (метод Грація) з метою візуалізації зон лізису (стерильних плям) бактеріофагів; агар Чепмена (Chapman agar) - селективно-диференціальне

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		14

середовище (манітно-сольовий агар), що використовувалося для ізоляції та ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus*; реактиви: 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, фосфатно-сольовий буфер, хлороформ.

Обладнання: центрифуга з охолодженням, фільтри 0,45 мкм (для попереднього очищення від клітинного дебрису) та 0,22 мкм (для отримання стерильного фільтрату, вільного від бактеріальних клітин), термостат.

Методика:

1. Попередня обробка. Зразки центрифугують (3000 об/хв, 5 хв, 4°C). Супернатант фільтрують крізь фільтр 0,45 мкм.

2. Збагачення. До 15 мл TSB додають 10 мл фільтрату, 500 мкл суспензії бактерій (0,5 за МакФарландом) та 63,75 мкл 2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Інкують 48 год при 37°C. Після центрифугування (3000 об/хв, 20 хв) супернатант фільтрують через 0,22 мкм.

3. Виявлення (Спот-тест). 10 мкл фільтрату наносять на подвійний шар LB-агару з бактеріальним газоном. Інкують 24 год при 37°C до появи зон лізису (плак).

4. Очищення. Плаки екстрагують у 1 мл PBS з додаванням 10 мкл хлороформу. Процедуру пересіву повторюють тричі для отримання гомогенної популяції фагів.

5. Зберігання. Очищені фаги зберігають у PBS при 4°C. Концентрацію визначають у КУО/мл.

Протокол ізоляції бактеріофагів проти *Streptococcus* (*S. pyogenes*, *S. suis*) із навколишнього середовища. Методика адаптована для виділення фагів зі стічних вод, ґрунту або фекалій. Враховуючи біологічну спорідненість, протокол враховує можливість крос-активності фагів у межах родини *Streptococcaceae* [26, 33].

Матеріали: зразки - стічні води або ґрунт (екстракція - 5 г ґрунту на 10 мл буфера); штами-господарі: *Streptococcus spp.* (наприклад, АТСС 27957 або локальні ізоляти); поживні середовища: серцево-мозковий інфузійний

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		15

бульйон (ВНІ), триптиказо-соевий агар (TSA) 0,75%, жовчно-ескуліновий агар; реактиви: сольовий магнісвий-буфер (SM), хлороформ.

Методика:

1. Екстракція. Стічні води центрифугують при 700 g (10 хв) та фільтрують (0,45 мкм). Зразки ґрунту попередньо гомогенізують у буфері.

2. Збагачення. Фільтрат змішують із добовою культурою хоста в TSB, додають 5 мл ВНІ та інкубують 24 год. Очищення проводять шляхом додавання 300 мкл хлороформу з наступним центрифугуванням та фільтрацією (0,22 мкм).

3. Титрація. Використовують метод серійних розведень ( $10^0$ – $10^{-8}$ ) з посівом на TSA.

4. Характеристика. Для візуалізації морфології використовують просвічуючу електронну мікроскопію (ПЕМ) з контрастуванням уранілацетатом. Для *S. suis* можливе використання 96-лункових планшетів для визначення спектра активності.

Протокол ізоляції бактеріофагів проти *Escherichia coli* (MDR-штами) зі стічних вод. Протокол фокусується на виділенні фагів проти мультирезистентних штамів кишкової палички з використанням ультрацентрифугування для концентрації віріонів [31].

Матеріали: зразки - стічні води, зібрані з глибини 15–20 см; штами-господарі: *E. coli* (клінічні ізоляти або ATCC 25922); поживні середовища - поживний бульйон (Nutrient Broth), LB-агар; реактиви - 1% MgSO<sub>4</sub>, хлороформ, PBS.

Методика:

1. Обробка. До зразка додають 0,1% хлороформу, витримують 24 год при 4–8°C. Проводять фільтрацію через паперові та мембранні фільтри (0,45 мкм).

2. Збагачення. До 10 мл фільтрату додають концентрований поживний бульйон, суспензію бактерій ( $10^8$  КУО/мл) та 100 мкл 1% MgSO<sub>4</sub>. Інкубують з

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		16

активною аерацією 18–24 год.

3. Концентрація. Для отримання високотитражних препаратів проводять ультрацентрифугування при 100000 g протягом 90 хв при 4°C. Осад ресуспендують у 1 мл PBS.

4. Ідентифікація. Титрацію проводять методом подвійних агарових шарів. Окремі морфотипи плак відбирають для подальшого секвенування геному та ПЕМ-аналізу (з використанням фосфоровольфрамової кислоти).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		17

## 2 ХАРАКТЕРИСТИКА ГОТОВОГО ПРОДУКТУ, СИРОВИНИ, МАТЕРІАЛІВ, НАПІВПРОДУКТУ

### 2.1 Характеристика готового продукту

Об'єкт роботи являє собою специфічний комбінований коктейль бактеріофагів, розроблений для цілеспрямованої терапії інфекцій, викликаних штамми *Staphylococcus*, *Streptococcus* та ентеропатогенними кишковими паличками (*Escherichia coli*). Механізм дії препарату базується на здатності вірулентних фагів до специфічного лізису клітин патогена, що зумовлює його високу ефективність при лікуванні гнійно-запальних, ентеритних та хірургічних інфекцій.

Основними мішенями препарату є *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* та різні серотипи ентеропатогенної *E. coli*. Завдяки широкому спектру літичної активності препарат демонструє різну терапевтичну доцільність:

- отоларингологія та пульмонологія - лікування отитів, тонзилітів, ларингітів, ринітів, синуситів, а також бронхітів та пневмоній.
- хірургія та дерматологія - терапія фурункульозу, карбункульозу, абсцесів, маститів, флегмон та інфікованих ран.
- гастроентерологія - корекція дисбактеріозів, лікування гастроентероколітів та холециститів.
- урологія та гінекологія - застосування при уретритах, циститах, пієлонефритах та ендометритах.
- стоматологія - лікування запальних процесів ротової порожнини (стоматити, гінгівіти).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		18

Ключовою перевагою препарату є вибірковість дії, так як фаги ініціюють деструкцію лише цільових бактеріальних клітин, не пригнічуючи при цьому нормальну мікробіоту організму. Препарат може застосовуватися як з лікувальною, так і з профілактичною метою, зокрема для санації післяопераційних ран та запобігання поширенню внутрішньолікарняних інфекцій.

#### *1. Склад та форма випуску*

Препарат являє собою суміш стерильних фільтратів фаголізатів бактерій родів *Staphylococcus*, *Streptococcus* та ентеропатогенної *Escherichia coli*.

#### *Активні речовини:*

стерильні фільтрати фаголізатів бактерій *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* та ентеропатогенної *Escherichia coli*, концентрація специфічних бактеріофагів (титр) становить не менше  $10^5 - 10^7$  фагових часток в 1 мл за методом Грація (БУО/мл, бляшкоутворюючих речовин).

#### *Допоміжні речовини (ексципієнти):*

- поживне середовище: залишки специфічного поживного середовища (на основі м'ясного або казеїнового пептону), на якому відбувалося культивування бактерій-господарів та подальша репродукція фагів;

- розчин натрію хлориду (0,9%): ізотонічний розчин, що використовується як фізіологічна основа для підтримання осмотичного тиску та структурної цілісності капсидів бактеріофагів;

- хінозолін (0,01%): консервант з антисептичними властивостями, що забезпечує мікробіологічну чистоту препарату протягом усього терміну придатності та запобігає вторинній контамінації після розкриття флакона.

#### *Лікарська форма:*

рідина для перорального, місцевого, ректального та зовнішнього застосування.

#### *Упаковка:*

скляні флакони об'ємом 20 мл по 5 флаконів у коробці.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		19

## *2. Фізико-хімічні властивості*

Прозора рідина, від безбарвного до світло-жовтого кольору різної інтенсивності. Допускається наявність слабкого специфічного запаху (продуктів метаболізму бактерій-господарів). Важливо: наявність каламуті, пластівців або сторонніх домішок є ознакою непридатності препарату.

## *3. Фармакологічні властивості*

Механізм дії базується на специфічному лізисі цільових бактерій незалежно від їхньої резистентності до антибіотиків. Препарат ефективний проти госпітальних штамів та може застосовуватися як монотерапія (при непереносимості антибіотиків) або у комбінації з антибактеріальними засобами, демонструючи ефект синергізму.

## *4. Показання до застосування*

Препарат призначається при гострих та хронічних захворюваннях, викликаних фагочутливими штамми:

- офтальмологія: гнійні кон'юнктивіти, кератокон'юнктивіти, виразки рогівки;
- хірургічна інфекція: нагноєння ран, опіки, остеомієліти, бурсити, а також інфекції після трансплантації органів та суглобів;
- дерматологія: бактеріальні токсикодермії, бешиха, інфікована екзема;
- педіатрія: омфаліт, піодермія, гастроентероколіт, сепсис;
- пульмонологія: ларингіти, трахеїти, плеврити, а також промивання бронхів під час бронхоскопії.

## *5. Особливості застосування та маніпуляцій*

Для збереження стерильності та активності препарату при роботі з відкритим флаконом необхідно дотримуватися правил:

- Попередній контроль: необхідне проведення бактеріологічного дослідження на чутливість виділеного штаму до даного фага.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		20

- Підготовка: перед використанням флакон необхідно ретельно збовтати. При зберіганні в холодильнику препарат слід довести до кімнатної температури безпосередньо перед введенням.

- Стерильний відбір: відбір дози проводиться шляхом проколу гумової пробки стерильним шприцом. Кожного разу слід використовувати нову голку. Не рекомендується залишати флакон відкритим.

- Застереження: категорично заборонено парентеральне (внутрішньовенне/внутрішньом'язове) введення препарату.

*6. Спосіб застосування та дозування (типові схеми)*

- Перорально: за 30–45 хв до прийому їжі. Дорослим - по 20 мл 3–4 рази на добу; дітям до 3-х років - по 5–10 мл.

- Порожнини (плевральна, суглобова): введення 100–200 мл препарату після попереднього видалення гною та дренивання.

- Пародонтологія: аплікації на ясна або введення в пародонтальні кишені турунд, просочених фагом, на 15–20 хв.

- Урологія: інстиляції в сечовий міхур або введення через нефростому (20–50 мл 1–2 рази на добу).

*7. Безпека та взаємодія*

- Взаємодія: повна сумісність з антибіотиками, пробіотиками та антисептиками.

- Вагітність та лактація: застосування дозволено за призначенням лікаря у випадках інфекцій, викликаних чутливими штамми.

- Побічна дія: не встановлена; можливі поодинокі реакції гіперчутливості.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		21

## 2.2 Характеристика сировини, матеріалів, напівпродуктів

Вибір сировини для виробництва полівалентного бактеріофага базується на необхідності забезпечення високої біологічної активності вірусних часток та суворому дотриманні вимог стерильності й безпеки готового лікарського засобу. Кожна група використовуваних матеріалів виконує специфічну роль у технологічному циклі.

Поживні середовища (TSB, THB, LB) сформовані з компонентів високої якості, оскільки бактеріофаги є чутливими до складу середовища, в якому росте бактерія-господар.

Білкові основи (гідролізат казеїну, рослинний пептон та триптон) слугують джерелом амінокислот та пептидів, необхідних для інтенсивного синтезу структурних білків фагових капсидів. Використання рослинного пептону в середовищі для стрептококів мінімізує ризики внесення пріонних інфекцій, що відповідає сучасним вимогам фармакопеї.

Дріжджовий екстракт виступає джерелом вітамінів групи В та факторів росту, що пришвидшує досягнення бактеріями логарифмічної фази, яка є критичною для ефективного інфікування фагом.

Буферні системи (гідрокарбонат натрію та гідрофосфати) забезпечують стабільність рН. Це важливо, оскільки навіть незначне відхилення кислотності може призвести до передчасної інактивації віріонів або зниження їхньої адсорбційної здатності.

Допоміжні речовини та реактиви підібрані з огляду на фізико-хімічну стабільність препарату.

Натрію хлорид використовується для створення ізотонічного середовища (0,9%), що запобігає осмотичному шоку як бактеріальних клітин, так і самих фагів.

Впровадження хінозоліну як консерванту дозволяє зберегти

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

мікробіологічну чистоту препарату протягом усього терміну придатності (24 місяці) без негативного впливу на літичну активність фагових коктейлів.

Вода очищена проходить багатоступеневу підготовку, оскільки наявність іонів важких металів або залишків хлору в неочищеній воді може діяти як інгібітор фагової реплікації.

Матеріали первинного пакування (флакони зі скла I або II гідролітичного класу та бутылкаучукові пробки) забезпечують інертність системи «препарат - упаковка». Скляна тару обрано через її здатність витримувати стерилізацію гарячою парою та нульову проникність для газів, що гарантує стабільність титру фага.

Застосування мембранних фільтрів на основі полієфірсульфону (PES) з порогом відсікання 0,22 мкм є технологічним стандартом. На відміну від глибинних фільтрів, вони мають низьку адсорбцію білків, що дозволяє уникнути значних втрат цільового продукту - бактеріофагів - під час фінішної стерилізації.

Таблиця 2.1

Характеристика сировини, матеріалів і напівпродуктів

Найменування	Категорія та номер НТД	Показники НТД, обов'язкові для перевірки	Примітка
1. Основна сировина:			
Панкреатичний гідролізат казеїну	Сертифікат виробника	Зовнішній вигляд, вміст амінного азоту, розчинність у воді	Приготування середовища TSB
Рослинний пептон	Сертифікат виробника	Зовнішній вигляд, вміст загального азоту	Приготування середовища THB
Триптон	Сертифікат виробника	Відсутність сторонніх домішок, масова частка азоту	Приготування середовища LB
Дріжджовий екстракт	Сертифікат виробника	Зовнішній вигляд, вміст вітамінів групи B, рН розчину	Приготування середовищ THB, LB
Глюкоза (декстроза)	ДСТУ 4464:2005	Масова частка речовини, відсутність механічних домішок	Приготування середовищ TSB, THB

Натрію гідрокарбонат	ГОСТ 2156-76	Масова частка основної речовини не менше 99%	Буфер для середовища ТНВ
Калію гідрофосфат	ГОСТ 2493-75	Зовнішній вигляд, рН 5% розчину	Буфер для середовища TSB
Динатрію фосфат	ГОСТ 4172-76	Масова частка основної речовини, відповідність сертифікату	Буфер для середовища ТНВ
2. Допоміжна сировина:			
Натрію хлорид	ДСТУ 3583:2015	Масова частка речовини, маркування згідно з сертифікатом	Ізотонічний розчин, середовища
Хінозолін	Сертифікат виробника	Зовнішній вигляд, температура плавлення, чистота	Консервант готового продукту
Спирт етиловий 96%	ДСТУ 4221:2003	Вміст етанолу, відсутність сторонніх часток	Приготування деззасобів
Перекис водню 50%	ГОСТ 177-88	Масова частка основної речовини	Для дезінфекції приміщень
Вода очищена	ДФУ / USP	Електропровідність, вміст ТОС, мікробіологічна чистота	Розчинник для середовищ та розчинів
3. Матеріали:			
Флакони скляні (20 мл)	Сертифікат виробника	Гідролітична стійкість (тип I/II), цілісність, геометрія	Первинне пакування
Пробки гумові бутилові	Сертифікат виробника	Відсутність токсичності, герметичність, стерильність	Закупорювання флаконів
Ковпачки алюмінієві	Сертифікат виробника	Наявність контрольного кільця, відсутність деформацій	Фіксація пробки
Картриджі фільтраційні 0,22 мкм	Сертифікат виробника	Тест на цілісність, відсутність вимивних речовин	Стерилізуюча фільтрація
4. Напівпродукти:			
Маточна культура фагів	Паспорт штамів	Специфічна стерильність, титр (не менше 10 <sup>9</sup> БУО/мл)	Для інфікування бактерій
Посівна культура бактерій	Паспорт штамів	Відсутність контамінації, фаза росту	Для ферментації та лізису
Стерильне середовище (TSB/ТНВ/LB)	НД підприємства	Стерильність (48 год), рН, прозорість	Для культивування
Фаголізат (концентрат)	НД підприємства	Титр фага, вміст ендотоксинів, чистота (SDS-PAGE)	Після очищення на стерильну фільтрацію

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

162.01.02.00 000 ПЗ

Арк.

24

## 2.3 Обґрунтування вибору біологічних об'єктів для полівалентного бактеріофага

Однією із важливих властивостей бактеріофагів, яку слід враховувати при створенні терапевтичних препаратів, є відношення бактеріофагу до літичних або помірних.

За стратегією репродукції бактеріофаги класифікують на дві основні категорії:

- літичні фаги використовують метаболічний апарат бактерії-господаря для реплікації власного геному та синтезу білків капсиду з наступним вивільненням потомства шляхом індукції лізису клітини під дією холінів та ендолізинів,

- помірні фаги інтегрують свій генетичний матеріал у бактеріальний геном і реплікують його разом із клітиною-господарем у стані профага. Така інтеграція забезпечує бактерії резистентність до повторного інфікування подібними фагами (суперінфекційний імунітет) і може надавати господарю нових фізіологічних ознак, устанавлюючи симбіотичні відносини [16, 34].

Хоча одинична інфекція зазвичай ініціює літичний цикл, множинне інфікування часто призводить до лізогенії. Літичний та лізогенний цикли є взаємопов'язаними: помірні фаги здатні перемикатися між цими станами у відповідь на сигнали довкілля або зміну щільності бактеріальної популяції, що розпізнається через молекули «відчуття кворуму». Доля бактеріальної клітини після інфікування визначається взаємодією між «прийняттям рішення» вірусом та захисною системою бактерії. У більшості випадків домінує стратегія фага, що диктує лізис або збереження клітини як носія. Проте деякі бактерії еволюціонували, розвинувши механізми абортивної інфекції (Аві-системи), за яких клітина ініціює власну загибель після детекції вірусу, запобігаючи подальшій реплікації фага та захищаючи навколишню

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		25

популяцію.

Класичною моделлю для вивчення механізмів прийняття рішень у фагів є помірний фаг  $\lambda$  *Escherichia coli*. Система *Escherichia coli* – фаг  $\lambda$  має не лише наукове, а й клінічне значення: *E. coli* є ключовим компонентом мікробіоти кишечника людини, проте певні її штами асоційовані з патологіями від інфекцій сечовивідних шляхів до сепсису. Здатність фага  $\lambda$  до лізогенії сприяє тривалому персистуванню вірусу в популяції, що може призводити до горизонтального перенесення генів і поширення факторів вірулентності.

Рішення про лізис або лізогенію регулюється експресією низки генів на ранніх стадіях інфекції. У системі фага  $\lambda$  такі чинники, як низька температура, висока множинність інфікування, зменшення розміру клітин та дефіцит поживних речовин, сприяють лізогенії. Навпаки, умови, сприятливі для оптимальної реплікації вірусу, стимулюють лізис [36].

Ключову роль у цьому процесі відіграють регуляторні білки та промотори:

CI (репресор) - високий рівень CI забезпечує лізогенний стан, пригнічуючи літичні гени.

CII та CIII - CII активує експресію CI; CIII стабілізує CII, захищаючи його від деградації протеазами господаря.

Cro - антагоніст CI, що сприяє літичному циклу, пригнічуючи синтез CI.

N та Q - антитермінаційні фактори. N активує ранню експресію літичних генів, а Q - пізню, забезпечуючи синтез структурних білків та вивільнення віріонів.

Int (інтеграза) - фермент, що забезпечує вбудовування фагового геному в хромосому бактерії.

На прийняття рішення також впливають фактори середовища: коливання солоності, аерація, рН, вплив антибіотиків, ультрафіолетове випромінювання та наявність інших профагів у клітині [37].

Окрім класичних циклів, у природі існують додаткові стратегії:

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

- псевдолізогенія - стан спокою, спричинений дефіцитом поживних речовин, за якого геном фага перебуває в клітині у неінтегрованому стані до покращення умов.

- хронічна інфекція - процес, за якого фаги безперервно реплікуються та вивільняються з клітини (шляхом екструзії або брунькування) поступово, не спричиняючи негайного лізису господаря.

Слід зазначити, що суворо вірулентні (літичні) фаги, які використовуються у фаготерапії, за своєю генетичною природою позбавлені здатності до лізогенії, що робить їх безпечними та ефективними інструментами для ерадикації патогенних бактерій.

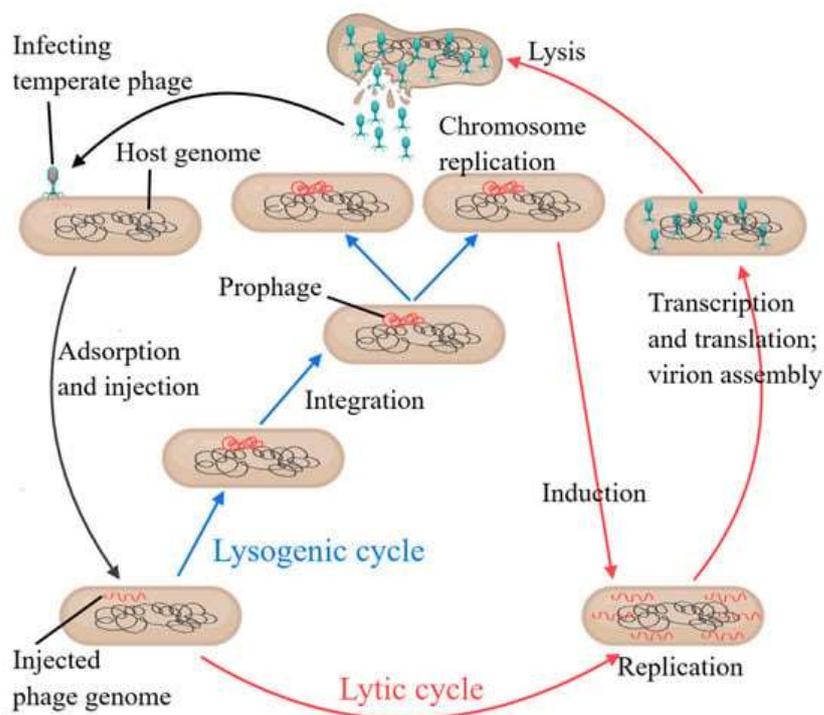


Рис. 2.1 - Загальна модель літичного та лізогенного життєвих циклів фагів.

Після зв'язування зі специфічними рецепторами клітини-хазяїна, помірні фаги вводять свою ДНК (червоний колір) у бактеріальну клітину. Після ін'єкції геном фага може пройти або літичний, або лізогенний цикл.

Під час літичного циклу геном фага реплікується за допомогою апарату клітини-хазяїна, синтезуючи фагові білки для отримання зрілого вірусного потомства. Лізис бактеріальної клітини вивільняє нові віріони, які потім інфікують інші бактеріальні клітини.

Під час лізогенезу геном фага інтегрується в хромосому хазяїна (профаг) та пасивно реплікується під час поділу клітини-хазяїна. Індукція профага може

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

відбуватися після певних стресових факторів навколишнього середовища, коли геном фага видаляється з хромосоми хазяїна та вступає в літичний цикл ([48])

Для виробництва терапевтичних бактеріофагів «золотим стандартом» вважаються суворо літичні (або вірулентні) фаги, що обумовлено низкою причин [37, 42, 43]:

1. Гарантоване знищення бактерії. Після інфікування клітини вірулентний фаг перемикає її метаболізм на реплікацію власних копій, що завжди закінчується розривом (лізисом) клітини та виходом нових віріонів.

2. Відсутність лізогенії. На відміну від помірних фагів, суворо літичні не здатні вбудовувати свій геном у хромосому бактерії. Помірні фаги можуть створювати «бактерії-носії» (лізогени), які стають імунними до подальшого зараження цим фагом, що часто робить терапію неефективною.

3. Генетична безпека. Суворо літичні фаги зазвичай не мають генів вірулентності, токсинів або стійкості до антибіотиків. Помірні фаги часто переносять гени токсинів (наприклад, стрептококові пірогенні екзотоксини *speA* або *speC*), що може погіршити стан пацієнта.

4. Технологічна прогнозованість. Процес культивування літичних фагів легше контролювати, оскільки вони демонструють стабільний титр і швидкий цикл реплікації.

Для розробки високоефективного та безпечного полівалентного бактеріофага було обрано три штами вірусів: *Staphylococcus phage Sb-1*, *Streptococcus phage A25* та *Escherichia phage T4*. Вибір даних об'єктів базується на їхній здатності забезпечувати швидкий лізис найбільш поширених збудників гнійно-запальних інфекцій та відповідності міжнародним стандартам безпеки імунобіологічних препаратів.

Основним критерієм відбору штамів для промислового виробництва є приналежність фагів до суворо літичного (вірулентного) типу розвитку. На

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

відміну від помірних фагів, обрані об'єкти характеризуються наступними перевагами:

1. Гарантована деструкція патогена - після інфікування клітини вірулентний фаг перемикає її метаболізм на реплікацію власних копій, що завжди завершується лізисом клітини збудника.

2. Виключення лізогенії - обрані фаги не здатні вбудовувати свій геном у хромосому бактерії, що запобігає формуванню «бактерій-носіїв», які стають імунними до фаготерапії.

3. Генетична безпека - геноми літичних фагів не містять генів вірулентності, бактеріальних токсинів та маркерів антибіотикорезистентності.

4. Технологічна стабільність - використання літичних штамів дозволяє отримувати стабільно високі титри препарату (не менше  $10^9$  БУО/мл) завдяки короткому латентному періоду та великому виходу фагових часток з однієї клітини.

*Staphylococcus phage Sb-1* є ключовим компонентом препарату, специфічним до *S. aureus*. Це один із найкраще охарактеризованих літичних фагів, що належить до роду *Kauvirus*. Його геном не містить генів вірулентності бактерій, що робить його придатним для антимікробної терапії. Особливістю *Sb-1* є механізм пакування ДНК за принципом «повної головки» (pac-style), що забезпечує стабільність та кінцеву надлишковість геному.

*Escherichia phage T4* обраний як найбільш доцільний партнер для *Sb-1* через ідентичну морфологію (Myoviridae зі скорочувальним хвостом) та суворо літичний цикл розвитку. *T4* демонструє аналогічний механізм пакування ДНК (pac-style), що спрощує технологічний контроль якості при сумісному виробництві. Його автономність від функцій клітини-господаря та широкий спектр літичної дії на клінічні ізоляти *E. coli* забезпечують високу терапевтичну цінність коктейлю.

*Streptococcus phage A25* представляє групу фагів *Siphoviridae*, специфічних до *S. pyogenes*. Даний штам є унікальним об'єктом - «втікачем від

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

лізогенії». У процесі еволюції він втратив інтегразу та головний репресор, що зробило його функціонально вірулентним. Хоча геном A25 містить залишкові елементи модуля лізогенії (антирепресор *cro*-типу та оператори), він не здатний до інтеграції в геном хазяїна, що дозволяє безпечно використовувати його для розширення спектра дії препарату на стрептококову інфекцію. Крім цього, він має трансдукційний потенціал, що робить його дуже ефективним у розпізнаванні та проникненні в різні штами *S. pyogenes*.

Об'єднання *Sb-1*, *T4* та A25 у складі одного препарату дозволяє створити збалансовану систему, де два потужних міовіруси забезпечують агресивний лізис стафілококів та ешерихій, а адаптований фаг A25 гарантує ефективність проти стрептококів. Усі обрані об'єкти мають подібні фізіолого-біохімічні показники (рН-стабільність, термочутливість тощо), що дозволяє використовувати єдину технологічну лінію для їх очищення та концентрування.

## 2.4 Характеристика біологічних об'єктів

Біологічними об'єктами препарату є активні компоненти – фаги *Kauvirus Sb1* (*Staphylococcus phage Sb-1*), *Streptococcus phage A25*, *Escherichia phage T4*.

Основним компонентом препарату, спрямованим против *Staphylococcus aureus*, є бактеріофаг *Sb1*. Цей вірус є одним із найбільш вивчених представників стафілококових фагів. Його первинна селекція та детальна характеристика були проведені в Інституті мікробіології, вірусології та бактеріофагії ім. Г. Еліави (Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, Грузія). Популярність *Sb1* у промисловому виробництві зумовлена його облігатно літичним циклом розвитку та повною відсутністю в геномі

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		30

генів вірулентності, токсигенності або антибіотикорезистентності, що було підтверджено методами повногеномного секвенування [24]. Це гарантує високий профіль безпеки при його застосуванні в антимікробній терапії.

Згідно з актуальною класифікацією Міжнародного комітету з таксономії вірусів (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), фаг *Sb1* належить до [45]:

Realm (Царство): *Duplodnaviria* (віруси з дволанцюговою ДНК (dsDNA))

Kingdom (Королівство): *Heunggongvirae* (від назва Гонконгу, де були ізольовані ранні зразки T4-подібних фагів, віруси з характерною морфологією, подібною до фага T4, з акцентом на бактеріофаги з лінійною ДНК)

Phylum (Тип): *Uroviricota* (хвостові dsDNA бактеріофаги, що інфікують прокаріотів)

Class (Клас): *Caudoviricetes* (хвостові бактеріофаги)

Family (Родина): *Herelleviridae* (родина хвостових фагів з скорочувальними хвостами (Myoviridae-подібні), що інфікують бактерії, з акцентом на терапевтичні фаги проти патогенів)

Subfamily (Підродина): *Twortvirinae* (фаги з довгими скорочувальними хвостами, подібні до фага Twort, з широким спектром проти грампозитивних бактерій)

Genus (Рід): *Kauvirus* (літичні фаги, що інфікують *Staphylococcus spp.*, названо на честь *Staphylococcus phage K*, одного з перших вивчених стафілококових фагів)

Вид: *Kauvirus Sb1* (історична назва, що відображає господаря, *Staphylococcus virus Sb-1*, *Sb* походить від *Staphylococcus bacteriophage*, а 1 – порядковий номер ізоляту)

Віріони *Sb-1* характеризуються типовою для *Kauvirus* морфологією, складаються з ізометричного ікосаедричного капсиду (головки) діаметром

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

близько 84–94 нм, що захищає щільно упаковану дволанцюгову ДНК. Хвостовий відросток має складну будову, типову для морфотипу Myoviridae (скорочувальний хвіст), довжиною близько 200 нм, який закінчується базальною пластинкою з шипами та короткими фібрилами (рис. 2.2), необхідними для специфічної адсорбції на рецепторах клітинної стінки стафілокока (переважно на тейхоевих кислотах).

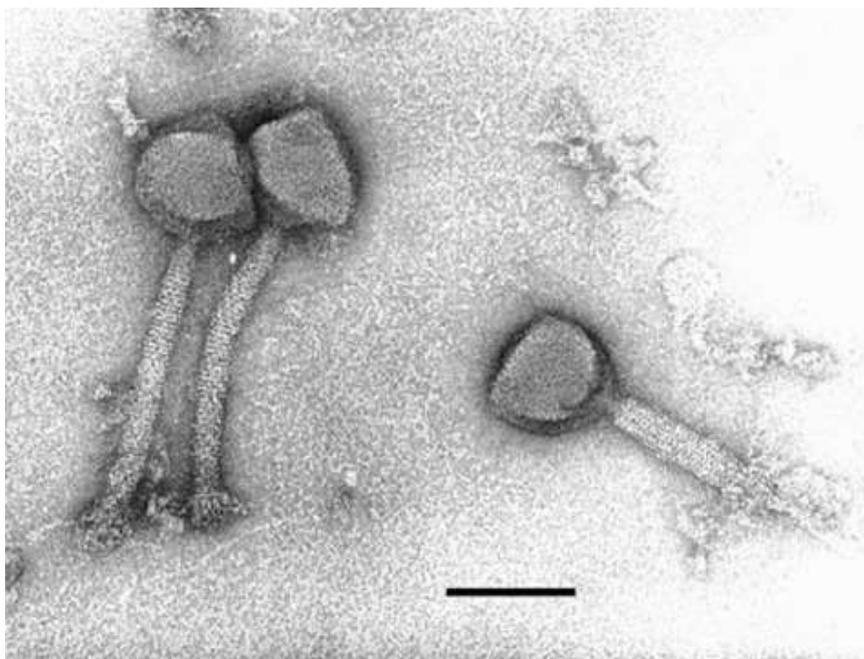


Рис. 2.2 - Електронна мікрофотографія *Sb 1* (масштабний відрізок = 100 нм) [28]

Електронна мікроскопія підтверджує подібність до фагів *K* та *SPO1* з *Bacillus subtilis*. Адсорбція відбувається з ефективністю >99% на чутливих штаммах, незалежно від рецепторів, і не залежить від наявності GATC-послідовностей у геномі фага, що дозволяє уникати рестрикції Sau3AI у багатьох штаммах *S. aureus* [28].

Фаг *Sb1* демонструє високу стійкість до факторів зовнішнього середовища: рН-стабільність (зберігає активність у діапазоні рН від 4,0 до 10,0, що важливо для виживання в різних біотопах організму людини (наприклад, у ранах або ШКТ), термостабільність (інактивується при

температурі вище 60°C, проте залишається стабільним при фізіологічних температурах), чутливість до реагентів (віріони не містять ліпідної оболонки, тому стійкі до дії хлороформу та ефіру), плавуча щільність у градієнті хлориду цезію становить близько 1,49 г/см<sup>3</sup>.

Геном *Sb1* представлений лінійною дволанцюговою ДНК розміром приблизно 127–138 тис. пар нуклеотидів (GenBank: HQ163896.1, MN336261–MN336263) [46], з GC-вмістом близько 30–35%, типовим для Twort-подібних фагів. Геном має термінальну надлишковість і не пермутований, з трьома основними інтергенними регіонами повторів (regions 1, 2, 3), де регіон 2 є гіперваріабельним (складається з тандемних та інвертованих повторів з ядром "ТАСТАСТАТТАС"), що пов'язано з розширенням хост-діапазону. Наукові дослідження вказують на наявність у геномі модульної організації (рис. 2.3) [24, 28]:

1. Модуль реплікації та регуляції відповідає за «захоплення» клітинного апарату бактерії, включаючи гени ДНК-полімерази та гелікази.

2. Структурний модуль кодує білки капсиду та хвоста, з мутаціями в ORF147, ORF149 та ORF82 у мутантних штаммах для адаптації.

3. Літичний модуль містить гени ендолізину та голінів, які забезпечують руйнування пептидоглікану клітинної стінки на фінальній стадії інфекції.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33



транскрипції.

Особливості фага Sb1: червоні прямокутники та мітки на блакитній лінії позначають гени, які є специфічними виключно для фага Sb-1 і відсутні у спорідненого фага K. Наявність модуля tRNA (ділянки 7-8 та 33.1) свідчить про адаптацію фага до трансляційного апарату господаря, що дозволяє йому ефективніше синтезувати власні білки, навіть якщо склад кодонів бактерії відрізняється. [28]

Генетична карта бактеріофага *Sb1* підтверджує модульну організацію геному, демонструє відсутність генів інтеграції (характерних для помірних фагів), що є доказом суворо літичної природи цього штаму та його безпечності для промислового виробництва лікарських засобів.

Сучасні дослідження демонструють унікальну здатність *Sb1* руйнувати бактеріальні біоплівки *S. aureus*. Фаг кодує специфічні деполімерази, які розщеплюють екзополісахаридний екстрацелюлярний матрикс біоплівки, відкриваючи доступ віріонам до глибоких шарів бактеріального угруповання. Це робить *Sb1* незамінним при лікуванні хронічних остеомієлітів та інфекцій, пов'язаних із протезуванням, з ефективністю до 73 % зменшення біомаси біоплівок при високих титрах, подібно до фагів *VL10* та *PYO*. Реплікація ДНК фага відбувається за механізмом «кільця, що котиться», що призводить до формування конкатемерів, які згодом пакуються в проголовки за механізмом «пакування до повного заповнення капсиду». Вихід фагових часток супроводжується повним лізисом клітини-господаря, з латентним періодом близько 35–40 хв та кількістю фагів близько 100–125 БУО/клітину, що забезпечує високий терапевтичний індекс препарату.

*Streptococcus phage A25* є добре вивченим літичним бактеріофагом з широким спектром дії, що робить його перспективним для включення в полівалентні препарати. Він був первинно ізолюваний з клінічних зразків *Streptococcus pyogenes* (група А стрептококів) у 1970-х роках і детально охарактеризований у подальших дослідженнях, включаючи геномне секвенування в 2018 році. *Phage A25* використовується як модель для

									Арк.
									35
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				

вивчення горизонтального генного трансферу та фаготерапії проти мультирезистентних стрептококів, і його широкий діапазон господарів підтверджений у численних дослідженнях [35].

Згідно з класифікацією ICTV, phage A25 належить до:

Клас: *Caudoviricetes* (хвостові бактеріофаги)

Родина: *Siphoviridae*

Підродина: Немає чіткої підродини, але групується з Sf121-like або T12-like фагами

Рід: *A25virus* (або *Brussowvirus* у деяких класифікаціях)

Вид: *Streptococcus phage A25*

Віріони A25 мають типову морфологію для *Siphoviridae* (рис. 2.4): ізометричний ікосаедричний капсид (головка) діаметром 58–60 нм, що захищає дволанцюгову ДНК, та довгий, гнучкий, неконтрактильний хвіст довжиною 180–190 нм і діаметром 10 нм. Хвіст складається з кільцевих субодиниць (8 нм) і закінчується поперечною пластиною з одним виступаючим шипом (20 нм), який забезпечує адсорбцію на рецепторах клітинної стінки, таких як пептидоглікан або тейхоєві кислоти.

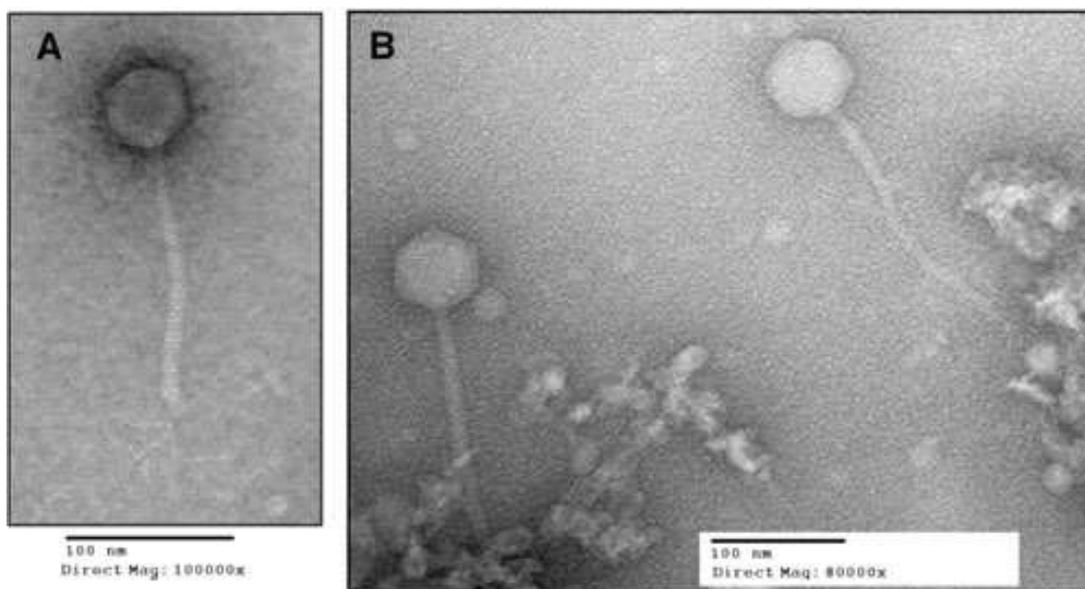


Рис. 2.4 - Електронні мікрофотографії віріонів профагів *SF370.1* (А) та *T12* (В), які після індукції вивільняють частки, типові для родини *Siphoviridae* (масштабний відрізок = 100 нм). Фаг *SF370.1*: діаметр головки (капсида)

становить приблизно 55 нм, а довжина хвостового відростка - 168 нм. Фаг T12 характеризується подібними морфометричними параметрами: діаметр головки становить близько 66 нм, а довжина хвоста - 196 нм. [35]

*Phage A25* демонструє високу адаптивність і стійкість, подібну до попереднього об'єкту. Частота резистентності господаря низька ( $10^{-6}$ ), з можливістю адаптації фага через мутації в модулях адгезії. A25 також ефективний проти біоплівки, кодуєчи лізин, активний проти груп А, С, G, Н стрептококів [29].

Геном A25 - лінійна dsDNA розміром 33,900 bp (GenBank: KT388093.1) [47] (рис. 2.5), з GC-вмістом 38,44% і рас-тип пакуванням з низькою специфічністю, що сприяє високій ефективності трансдукції. Геном має модульну структуру:

1. Модуль реплікації та регуляції. Включає гени для ендонуклеаз, пакування та регуляції; залишковий лізогенний модуль (cro-подібний антирепресор, без інтегрази).

2. Структурний модуль. Кодує білки капсиду, хвоста та морфогенезу; мозаїчна структура з модулями від фагів *S. pneumoniae* та *S. suis*.

3. Літичний модуль. Гени лізину (активний проти множинних груп стрептококів) та голінів для руйнування клітинної стінки; відсутній ген гіалуронідази.

Оскільки A25 не має механізму для переходу в стан профага (інтеграції), він діє як вірулентний фаг. A25 демонструє унікальну здатність до генералізованої трансдукції (ефективність  $10^{-6}$  трансдуктантів/БУО для антибіотиків), що сприяє горизонтальному генному трансферу між видами стрептококів. Реплікація за механізмом theta з формуванням конкатемерів; латентний період 30–45 хв, кількістю 12–30 БУО/клітину. У біоплівках A25 руйнує матрикс завдяки лізину, ефективний проти хронічних інфекцій.

									Арк.
									37
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				

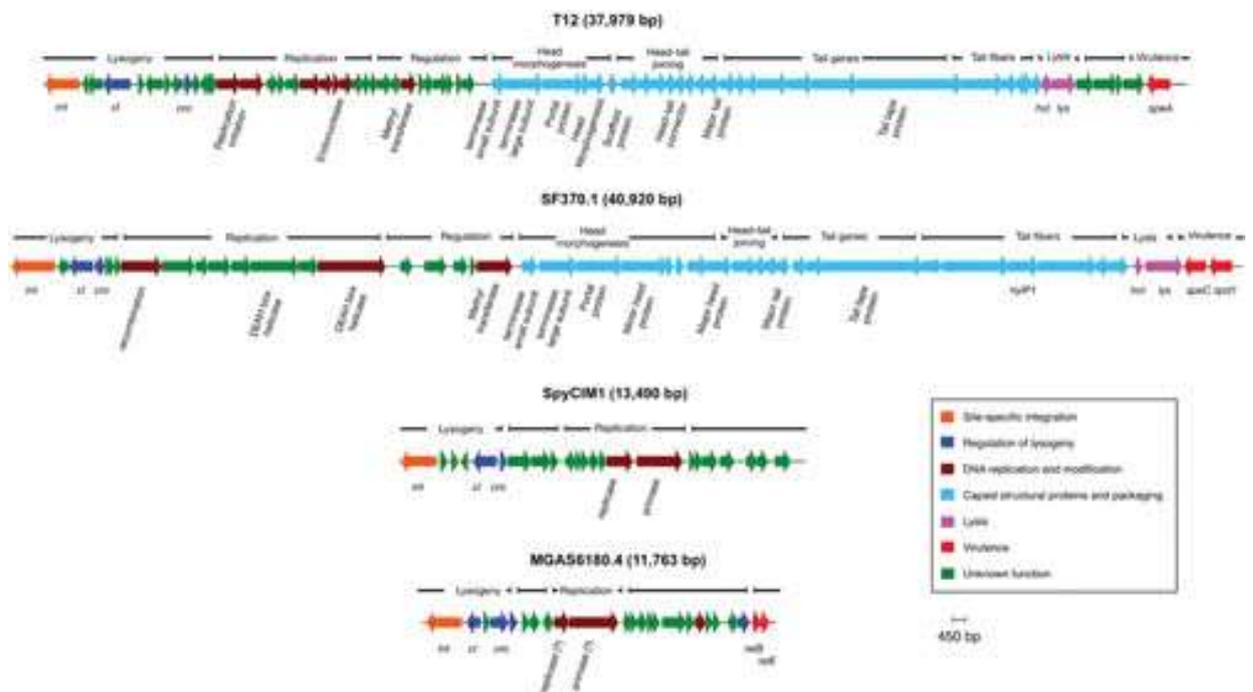


Рис. 2.5 - Генетична карта бактеріофага A25 (33 900 п.н.).  
 Геном фага A25 організований у типові функціональні модулі, позначені різними кольорами: регуляція (темно-червоний) - гени, що керують експресією інших генів фага, реплікація ДНК (рожевий) - модуль, відповідальний за копіювання генетичного матеріалу вірусу, ендонуклеази (темно-синій)- гени, що кодують ферменти для розщеплення нуклеїнових кислот, пакування геному (блакитний) - білки, що забезпечують завантаження ДНК у капсид, Структурні білки (зелений) - найбільший модуль, що кодує білки головки та хвоста (Head, Morphogenesis, Tails), лізис (жовтий) - гени, що забезпечують руйнування бактеріальної клітини для виходу нових віріонів.  
 «Втеча від лізогенії» - затінена сірим область на початку карти представляє регіон високої гомології з профагами інших штамів (наприклад, MGAS10270). На відміну від повних профагів-лізогенів, фаг A25 втратив ключові елементи, необхідні для інтеграції в геном бактерії - інтегразу та репресор.  
 На збільшеному фрагменті (Expanded view) показано, що A25 зберіг лише оператор та сго-подібний антирепресор. У той час як гомологічний профаг MGAS10270.2 має повний набір, включаючи сІ-подібний репресор, який забезпечує стан спокою (лізогенію).

[35]

*Phage A25* має широкий діапазон господарів - первинно інфікує *S. pyogenes* (група А, різні М-типи), адаптується до групи G після пасажу,

інфікує 48% штамів групи C, а також *S. pneumoniae*, *S. suis*, *S. dysgalactiae subsp. equisimilis*, *S. iniae* та *S. equi subsp. zooepidemicus*. Це досягається мозаїчним геномом з модулями від різних стрептококів, що дозволяє крос-інфекцію. Фаг є перспективний для фаготерапії хронічних стрептококових інфекцій (остеомієліт, шкірні ураження), з низьким ризиком резистентності та потенціалом комбінації з антибіотиками, крім цього відсутність токсинів робить його безпечним для терапії.

Компонентом полівалентного препарату, спрямованим проти ентеропатогенних штамів *Escherichia coli*, є бактеріофаг T4. Цей вірус є еталонним об'єктом молекулярної біології та одним із найбільш детально вивчених представників T-парних фагів. Популярність фага T4 у промисловій біотехнології та терапії зумовлена його облігатно літичним циклом розвитку. Генетична безпека штаму підтверджена відсутністю в його геномі генів, що відповідають за інтеграцію (лізогенію), токсигенність або перенесення маркерів резистентності до антибіотиків.

Згідно з актуальною таксономією ICTV, фаг T4 класифікується наступним чином:

Realm (Реалм): *Duplodnaviria* (віруси з dsDNA)

Kingdom (Царство): *Heunggongvirae*

Phylum (Тип): *Uroviricota*

Class (Клас): *Caudoviricetes* (хвостові бактеріофаги)

Family (Родина): *Straboviridae* (раніше класифікувалися як *Muoviridae* через наявність скорочувального хвоста)

Genus (Рід): *Tequatervirus* (раніше *T4virus*)

Вид: *Tequatrovirus T4* (*Escherichia phage T4*)

Віріони T4 мають складну морфологію, що включає видовжену ікосаедричну головку (капсид) розміром приблизно 120 × 86 нм та довгий скорочувальний хвіст (близько 100 нм) (рис. 2.6). Хвостовий відросток закінчується гексагональною базальною пластинкою з шістьма довгими та

									Арк.
									39
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				





(рядків), які разом складають повну кільцеву (циклічно пермутовану) послідовність ДНК. Числа під стрілками вказують на координати в парах нуклеотидів (від 1200 до 168 000). Стрілки позначають окремі гени (ORF), а їхній напрямок вказує, на якому ланцюгу ДНК ведеться зчитування інформації.

Функціональні модулі (колір стрілок) - групи генів, що виконують спільні завдання в життєвому циклі фага: жовті та коричневі стрілки- гени, відповідальні за реплікацію ДНК та метаболізм нуклеотидів, зокрема, тут розташовані гени ДНК-полімерази та допоміжних білків; сині та блакитні стрілки - структурний модуль, що кодує білки для побудови нових віріонів (гени 20–24 для головки, 6–12 для базальної пластинки та хвоста); фіолетові та червоні стрілки - регуляторні гени (наприклад, *rPA*, *rPB*), які керують взаємодією фага з клітиною-господарем та визначають швидкість лізису; зелені стрілки - гени, залучені до лізису бактерії (наприклад, ген *e*, що кодує лізоцим фага T4); білі стрілки - гіпотетичні або маловивчені ORF, функції яких досліджуються.

Регуляторні елементи: жовті кружечки (*ori*) позначають точки початку реплікації ДНК (*oriA*, *oriE*, *oriF*, *oriG*), наявність декількох точок старту забезпечує надзвичайно швидке копіювання геному в клітині *E. coli*; tRNA (70 800–73 200 bp) - на карті чітко видно кластер генів транспортних РНК, вони дозволяють фагу T4 бути незалежним від апарату трансляції бактерії та ефективно синтезувати власні білки, навіть якщо склад кодонів господаря відрізняється. [20]

На відміну від *Sb-1*, ДНК фага T4 містить модифіковану основу - 5-гідроксиметилцитозин, який глікозилюється для захисту геному від рестрикційних ендонуклеаз бактерії-господаря. Геном має модульну організацію:

1. Модуль реплікації та ранньої регуляції забезпечує миттєве пригнічення синтезу бактеріальних макромолекул та активацію власної ДНК-полімерази.

2. Структурний модуль кодує понад 50 білків, необхідних для збирання складних віріонів (головки, чохла хвоста, базальної пластинки).

3. Літичний модуль включає гени лізоциму (*e*-ген) та білків-голінів, що забезпечують вибуховий лізис клітини.

Реплікація відбувається за механізмом «кільця, що котиться» з

									Арк.
									42
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				

утворенням конкатемерів. Пакування ДНК реалізується за *rac-style* (*headful*) механізмом, що призводить до формування геномів з кінцевою надлишковістю та кільцевими пермутаціями. Латентний період становить близько 25–30 хв, а вихід фага досягає 100–150 часток на клітину, що гарантує високу ефективність полівалентного препарату [21].

					<i>162.01.02.00 000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		43

## 3 ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 3.1 Розрахунок матеріального балансу

Розрахуємо матеріальний баланс виробництва 1 серії полівалентного бактеріофага об'ємом 50 л з урахуванням технологічних втрат (налипання на стінки обладнання, залишки в системах трубопроводів тощо) та відбору контролів на кожній стадії.

Таблиця 3.1

Матеріальний баланс виробництва 50 л полівалентного бактеріофага

Використано	Кількість	Отримано	Кількість
Назва сировини й напівпродукту	кг / л / шт	Назва сировини й напівпродукту	кг / л / шт
<b>1. Підготовка деззасобів та приміщень</b>			
Спирт етиловий 96%	20,0 л	Спирт етиловий 76%	25,0 л
Перекис водню 50%	2,0 л	Перекис водню 1%	100,0 л
Вода очищена	250,0 л	Відпрацьовані розчини (відходи)	372,0 л
<b>2. Приготування поживних середовищ (разом для 3-х культур)</b>			
Сухий концентрат TSB (для <i>S. aureus</i> )	0,6 кг	Поживне середовище TSB	20,0 л
Сухий концентрат ТНВ (для <i>Streptococcus</i> )	0,6 кг	Поживне середовище ТНВ	20,0 л
Сухий концентрат LB (для <i>E. coli</i> )	0,5 кг	Поживне середовище LB	20,0 л
Вода очищена	58,3 л		
<b>3. Отримання посівного матеріалу та маточних фагів</b>			
Поживні середовища (сумарно)	15,0 л	Посівний матеріал (3 види)	6,0 л
Музейні штами (бактерії + фаги)	0,06 л	Маточні фаги (3 види)	6,0 л
		Відходи / Контроль	3,06 л
<b>4. Виробниче культивування (Ферментація)</b>			
Поживні середовища (сумарно)	45,0 л	Фаголізати (сумарно)	52,0 л

Посівний матеріал бактерій	6,0 л	Втрати (випаровування)	2,5 л
Маточні бактеріофаги	6,0 л	Контроль	2,5 л
5. Очистка, концентрування та змішування			
Фаголізати сумарні	52,0 л	Очищений полівалентний коктейль	50,0 л
NaCl (для стабілізації)	0,45 кг	Пермеат (відходи)	1,8 л
Хінозолін (консервант)	0,05 кг	Втрати на мембранах / Контроль	0,7 л
6. Підготовка упаковки та розлив			
Флакони скляні (20 мл)	2600 шт	Готова продукція (флакони)	2500 шт
Пробки гумові	2600 шт	Брак / Контроль флаконів	50 шт
Ковпачки алюмінієві	2600 шт	Залишки упаковки	50 шт
Вода очищена (для миття)	150,0 л	Відпрацьована вода	150,0 л
7. Стерилізуюча фільтрація та фініш			
Коктейль перед фільтрацією	50,0 л	Стерильний фаголізат	49,5 л
		Втрати на фільтрі	0,5 л
Використано	Кількість	Отримано	Кількість

Розрахунок кількості сухих компонентів, що потрібні для приготування живильних середовищ наведено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Розрахунок компонентів на живильні середовища

Компонент	Пропис (г/л)	Розрахунок на 20 л (г)	З урахуванням втрат (+5%)
Розрахунок компонентів для TSB-бульйону ( <i>S. aureus</i> )			
Панкреатичний гідролізат казеїну	17,0	340,0	357,0 г
Папаїновий гідролізат соєвого борошна	3,0	60,0	63,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	5,0	100,0	105,0 г
Дикалій гідрофосфат (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5	50,0	52,5 г
Глюкоза (декстроза)	2,5	50,0	52,5 г
Вода дистильована	до 1 л	20 л	21 л

Розрахунок компонентів для ТНВ-бульйону ( <i>Streptococcus spp.</i> )			
Рослинний пептон	20,0	400,0	420,0 г
Дріжджовий екстракт	3,0	60,0	63,0 г
Глюкоза (декстроза)	2,0	40,0	42,0 г
Гідрокарбонат натрію (NaHCO <sub>3</sub> )	2,0	40,0	42,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	2,0	40,0	42,0 г
Динатрій фосфат (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,4	8,0	8,4 г
Вода дистильована	до 1 л	20 л	21 л
Розрахунок компонентів для LB-бульйону ( <i>E. coli</i> )			
Триптон	10,0	200,0	210,0 г
Дріжджовий екстракт	5,0	100,0	105,0 г
Хлорид натрію (NaCl)	10,0	200,0	210,0 г
Вода дистильована	до 1 л	20 л	21 л

Зведена специфікація компонентів сировини на серію (60 л середовищ):

- Білкові гідролізати: Панкреатичний гідролізат казеїну (357 г), Рослинний пептон (420 г), Триптон (210 г), Соевий гідролізат (63 г).
- Вітамінна основа: Дріжджовий екстракт (168 г).
- Енергетичний субстрат: Глюкоза (94,5 г).
- Солі та буфери: NaCl (357 г), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (52,5 г), NaHCO<sub>3</sub> (42 г), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8,4 г).
- Розчинник: Вода дистильована (63 л).

### 3.2 Вибір обладнання

Розрахунок та вибір реакторів (Стадія 1). Згідно з матеріальним балансом, для кожної культури необхідно приготувати по 20 л специфічного середовища. Розрахунок параметрів проводиться для одного апарата (вони ідентичні).

									Арк.
									46
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				

Маса завантаження одного реактора 21 кг (з урахуванням 5% запасу на втрати компонентів та розчинника), густина розчину  $\rho = 1020 \text{ кг/м}^3$ .

Робочий об'єм апарата  $V_{\text{роб}} = 21 / 1020 = 0,0206 \text{ м}^3$  (20,6 л).

Повний об'єм апарата (з урахуванням коефіцієнта заповнення  $\eta = 0,7$  для забезпечення якісного перемішування та запобігання розбризкуванню):

$V_{\text{повн}} = 0,0206 / 0,7 = 0,0294 \text{ м}^3$ .

Обираємо три стандартні реактори об'ємом 30 л ( $0,03 \text{ м}^3$ ). Реактори типу ВЕЕ (вертикальні емальовані або сталеві). У нашому випадку - з нержавіючої сталі марки AISI 316L (внутрішній шар), що є критичним для виробництва бактеріофагів, оскільки вона стійка до хлоридів та не вимиває іони металів, які можуть інактивувати вірусні частки. Зовнішній шар (сорочка) - конструкційна сталь.

Для стералізації живильних середовищ об'ємом по 20 л раціональніше використовувати вертикальний автоклав об'ємом, де стерилізація проходить при 121С (20 хв).

*Розрахунок та вибір ферментерів (Стадія 3).* Оскільки культивування трьох штамів бактерій (*S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*) проводиться роздільно, необхідно використовувати три паралельні ферментери. Для кожного штаму ми готуємо по 20 л середовища.

Загальний об'єм з урахуванням коефіцієнта заповнення  $\eta=0,6$ :

$V_{\text{заг}} = V_{\text{роб}} / \eta = 20 / 0,6 = 33,3 \text{ л}$

Вибираємо три ферментери об'ємом 40 літрів (лабораторні біореактори з нержавіючої сталі AISI 316L фірми Sartorius). Необхідним є наявність сорочки для термостатування (37 °С), мішалки (150–200 об/хв), датчиків рН та DO (розчинений кисень).

Повітряний фільтр (стерилізація повітря). Коефіцієнт аерації 0,4 (об'єм повітря на об'єм КР на хвилину). Витрата повітря на один ферментер:  $20 \text{ л} \times 0,4 = 8 \text{ л/хв} = 0,000133 \text{ м}^3/\text{с}$ . Сумарна витрата для трьох ферментерів близько  $0,0005 \text{ м}^3/\text{с}$ . Враховуючи низьку витрату, обираємо картриджні фільтри з

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		47

PTFE-мембраною (0,22 мкм). Площа фільтрації 0,45 м<sup>2</sup>; достатньо стандартного картриджа типу "MidiCap".

*Обладнання для концентрування (Стадія 4).* Для ультрафільтрації використовується установка тангенціальної фільтрації (TFF system) з тримачем для PES-касет.

Площа фільтрації розраховується виходячи з потоку. Прийємо питомий потік  $J = 50 \text{ л}/(\text{м}^2 \times \text{год})$ . Потрібна площа:  $S = V / (J \times t) = 60 / (50 \times 2) = 0,6 \text{ м}^2$ . Для затримки фагів і пропускання низькомолекулярних білків розмір пор 100 кДа. Обираємо касету PES (100 кДа) площею 0,5–1,0 м<sup>2</sup>. Це забезпечує концентрування за 1,5–2 год.

*Реактор-змішувач для коктейлю (Стадія 5)* для об'єднання фаголізатів та внесення допоміжних речовин.

Об'єм суміші становить 50 л. Загальний об'єм:

$$V_{\text{заг}} = 50/0,8 = 62,5 \text{ л}$$

Обираємо реактор об'ємом 100 л з нержавіючої сталі AISI 316L (креслення наведено у Додатку), споряджений якірною мішалкою (60 об/хв) для асептичного змішування. Обладнання повинно мати порти для асептичного внесення компонентів (NaCl, консервант).

*Стерилізуюча фільтрація (Стадія 6).* Використовується установка для каскадної фільтрації під тиском з тримачем для капсульних або картриджних фільтрів. Конфігурація: 1. Попередній фільтр: 0,45 мкм, 2. Стерилізуючий фільтр: 0,22 мкм (матеріал PES, низька адсорбція білка). Джерело тиску - лінія стисненого азоту (тиск 0,5–1,0 бар).

*Лінія наповнення та закупорювання (Стадія 7).* Згідно з розрахунком, нам потрібно розлити 2500 флаконів по 20 мл у автоматичній лінії розливу в стерильному боксі (клас А) з вузлом закупорювання гумовими пробками та обкатки алюмінієвими ковпачками. Продуктивність: 500–1000 флаконів/год (для завершення розливу серії за 2,5–5 годин, що критично для стабільності фага).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		48

### 3.3 Опис технологічного процесу

Виробництво базується на принципах GMP та охоплює етапи підготовки, роздільного культивування фаголізатів та їх подальшого об'єднання в єдину лікарську форму. Перед стадіями технологічного процесу на підприємстві проводяться загальновиробничі стадії санітарної підготовки персоналу, приміщень, обладнання, підготовки води. Стерилізуюча фільтрація повітря забезпечує клас чистоти А в зонах наповнення та В у зонах культивування (фільтри (0,45 мкм та 0,22 мкм) та силіконові трубки стерилізуються при 121 °С (30 хв).

#### Стадія 1. Приготування живильних середовищ

Живильні середовища готуються окремо для кожного штаму, щоб врахувати їхні метаболічні потреби та максимізувати вихід фагів.

##### 1.1 Приготування TSB-бульйону

Для *S. aureus* використовується триптон-соевий бульйон (Tryptic Soy Broth, TSB) з додаванням 0,5% глюкози для посилення росту. TSB базується на поєднанні двох гідролізатів, що забезпечують мікроорганізми необхідним азотом та вітамінами. Склад (г/л):

Компонент	Кількість (г/л)	Роль у середовищі
Панкреатичний гідролізат казеїну	17,0	Джерело азоту, вітамінів та амінокислот
Папаїновий гідролізат соєвого борошна	3,0	Джерело складних вуглеводів та стимулятор росту
Хлорид натрію (NaCl)	5,0	Підтримка осмотичного тиску
Дикалій гідрофосфат (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5	Фосфатний буфер для стабілізації рН
Глюкоза (декстроза)	2,5	Легкозасвоюване джерело енергії
Дистильована вода	до 1000 мл	Розчинник



ферментації глюкози, зовнішній вигляд готового середовища: прозорий розчин солом'яного (світло-бурштинового) кольору без осаду.

### 1.3 Приготування LB-бульйону

Для *E. coli* використовують бульйон Лурія-Бертані (Luria-Bertani, LB) з 1% триптон, 0,5% дріжджового екстракту та 1% NaCl. Автоклавування при 121°C на 15–20 хв; контроль на відсутність контамінації шляхом посіву на агар. Склад:

Компонент	Кількість (г/л)	Роль у середовищі
Триптон	10,0	Джерело пептидів та амінокислот (панкреатичний гідролізат казеїну)
Дріжджовий екстракт	5,0	Джерело вітамінів групи В, вуглеводів та факторів росту
Хлорид натрію (NaCl)	10,0	Підтримка осмотичного тиску та натрієвий обмін
Дистильована вода	до 1000 мл	Розчинник

Автоклавування при 121°C на 15–20 хв; контроль на відсутність контамінації шляхом посіву на агар. Кінцевий рН: 7,0 при температурі 25°C, , зовнішній вигляд готового середовища: прозорий розчин солом'яного (світло-бурштинового) кольору без осаду.

### Стадія 2. Підготовка посівного матеріалу та маточних фагів

Для полівалентного коктейлю підготовка ведеться паралельно за трьома напрямками в окремих зонах для уникнення крос-контамінації. Використовуються сертифіковані банки клітин (Master Cell Bank) та фагів (Master Phage Bank), як рекомендовано регуляторними органами.

2.1-2.3 Отримання посівного матеріалу культур господаря (посів у колби)

Музейні штами *S. aureus* (ATCC 29213), *Streptococcus spp.* (ATCC 19615), *E. coli* (ATCC 25922) висівають на відповідні середовища (TSB для *S. aureus*, ТНВ для *Streptococcus*, LB для *E. coli*) у колбах та інкубують при 37°C на 18–24 год з аерацією (150–200 об/хв). Контроль: оптична густина (ОГ<sub>600</sub> =

0,5–1,0), життєздатність ( $>10^8$  КУО/мл). Посівний матеріал культур у колбах використовується для отримання маточних бактеріофагів та для виробничої ферментації кожної культури господаря.

#### 2.4-2.6 Отримання маточних бактеріофагів

Проводять пасажування (2-3 пасажи) специфічних фагів (*Kayvirus Sb1* (*Staphylococcus phage Sb-1*), *Streptococcus phage A25*, *Escherichia phage T4*) на відповідних культурах-господарях у колбах до досягнення титру не менше  $10^8$  БУО/мл. Контроль активності здійснюють методом Апельмана. Додатково - геномне секвенування фагів для підтвердження відсутності токсинів.

#### Стадія 3. Виробнича ферментація

Процес реалізується у ферментерах з контролем рН, температури та DO (розчиненого кисню) роздільно для кожної культури.

#### 3.1-3.3 Накопичення біомаси культур господарів

Культивування бактерій-господарів проводиться у відповідних середовищах (TSB для *S. aureus*, ТНВ для *Streptococcus*, LB для *E. coli*) при інтенсивній аерації (150-200 об/хв) до досягнення оптичної густини  $OG_{600}=0,8-1,0$  (логарифмічна фаза для оптимальної фагової інфекції). Тривалість: 18-24 год.

#### 3.4-3.6 Виробничий фаговий лізис

У ферментери вносять маточні культури відповідних фагів (MOI – multiplicity of infection 0,1–0,2, тобто 1 віріон на 5–10 клітин, для ефективного лізису). Культивування припиняють при повному просвітленні суспензії ( $OG_{600}=0,05-0,1$ ) або після 8–12 год. Контроль: моніторинг титру фагів (періодичні зразки).

#### Стадія 4. Очистка та отримання концентратів

Кожен фаголізат обробляється окремо для збереження специфічності.

4.1-4.3. Попередня фільтрація фаголізатів. Отриманні фаголізати перекачуються з ферментерів на фільтри попередньої очистки - скловолоконні

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		52

або глибинні фільтри (1,0–5,0 мкм) для видалення клітинного дебрису, з подальшим центрифугуванням (5000–10000 g, 30 хв) для осадження залишків.

4.4-4.6. Ультрафільтрація фаголізатів. Отриманні фільтрати направляють на TFF (тангенціальна фільтрація) з використанням PES-касет (поліефірсульфону) з порами 100–300 кДа для концентрування фагових часток (збільшення титру до 10<sup>10</sup>–10<sup>12</sup> БУО/мл) та очищення від низькомолекулярних домішок (білки, метаболіти). При такому типі фільтрації потік рідини спрямовується паралельно (тангенціально) до поверхні мембрани, велика частина рідини циркулює вздовж мембрани, "змиваючи" з неї осад, лише частина рідини (пермеат) проходить крізь пори. Це дозволяє обробляти великі об'єми фаголізату без швидкого засмічення фільтра. Додатково: хроматографія (аніонно-обмінна) для видалення ендотоксинів (<5 Од/мл). Навіть після TFF у розчині залишаються ендотоксини (ЛПС - ліпополісахариди стінок бактерій). Оскільки ендотоксини мають негативний заряд, аніонообмінна колонка «притягує» їх до себе, пропускаючи чисті фаги далі. Це дозволяє досягти фармакопейного рівня чистоти (<5 Од/мл). Контроль: SDS-PAGE (електрофорез у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію) для перевірки чистоти білкового складу, TEM (трансмісійна електронна мікроскопія) для морфології фагів.

Стадія 5. Приготування полівалентного коктейлю та внесення ексципієнтів

У реактор-змішувач перекачують очищені концентрати стафілококового, стрептококового та ешерихіозного фагів у розрахованих пропорціях (1:1:1) для досягнення цільового титру (не менше 10<sup>8</sup> БУО/мл кожного). При постійному перемішуванні (150-200 об/хв) до суміші додають 0,9% розчин NaCl для стабілізації осмотичного тиску, хінозолін 0,1 % як консервант. Перемішування триває 30–60 хв до повного розчинення при кімнатній температурі. Контроль: тест на стабільність (інкубація при 4°C на 7 днів).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		53

## Стадія 6. Стерилізуюча фільтрація полівалентного коктейлю

Із реактора полівалентний коктейль подається на каскад фільтрів під тиском (0,5–1 бар): предфільтр 0,45–0,8 мкм для видалення агрегатів, фінішний фільтр 0,22 мкм (PES-мембрана) для стерилізації. Профільтрований стерильний розчин збирається у стерильну ємність, з'єднану з лінією розливу. Контроль: перевірка цілісності фільтра, стерильність (USP <71>, мембранною фільтрацією).

## Стадія 7. Отримання готової форми полівалентного бактеріофага

7.1 Розлив полівалентного бактеріофага. Здійснюється у приміщеннях класу чистоти А (зона наповнення) в стерильні флакони за допомогою автоматичних ліній.

7.2 Закупорювання флаконів. Флакони герметизуються стерильними гумовими пробками та обтискаються алюмінієвими ковпачками на автоматичній лінії.

7.3. Маркування флаконів. Кожен флакон інспектується на відсутність механічних домішок (автоматична візуальна інспекція), маркується (серійний номер, дата, склад) та пакується у картонну пачку з інструкцією. Контроль: випускний контроль (титр, рН, осмолярність).

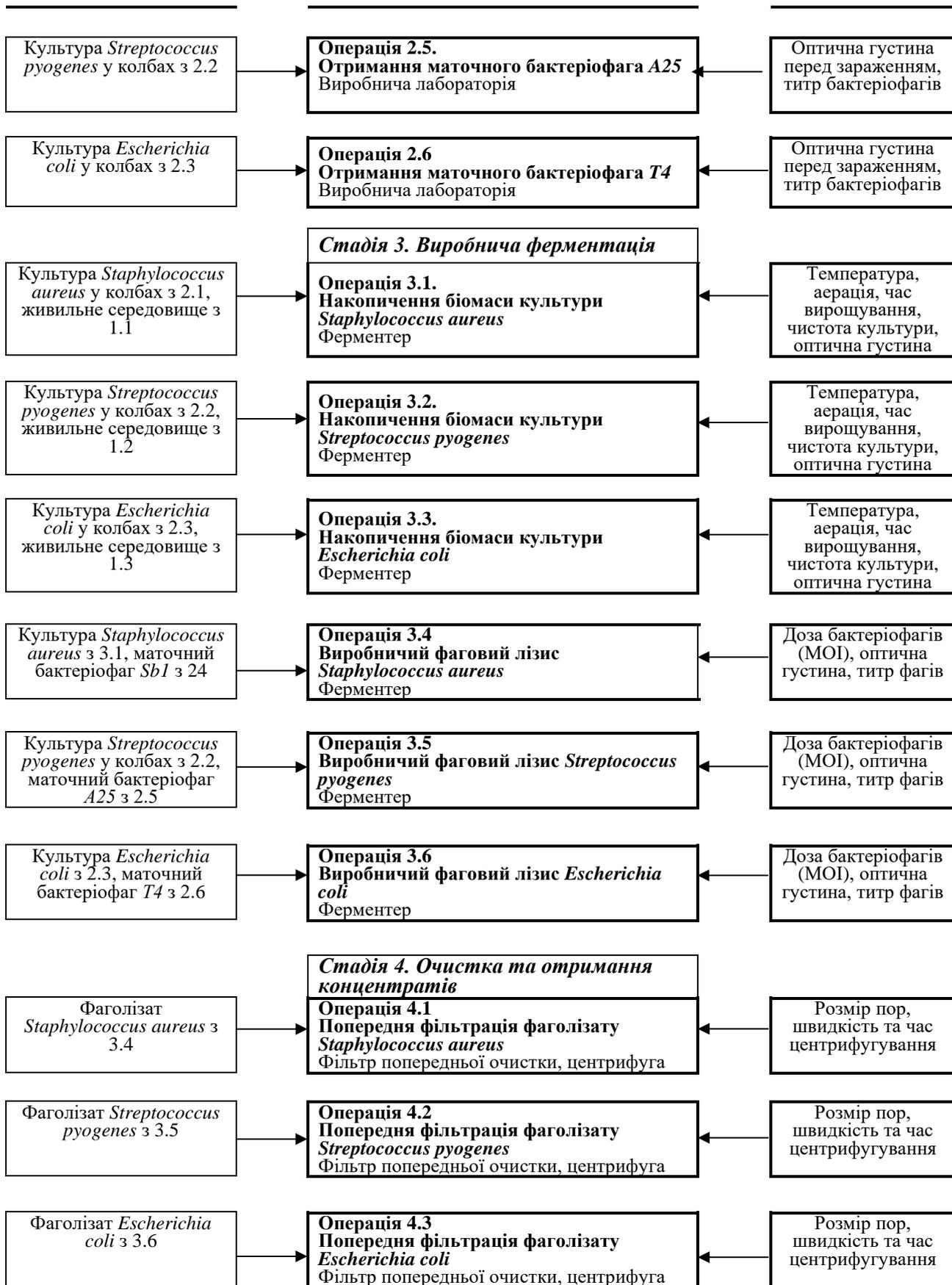
## Стадія 8. Утилізація та контроль готового продукту

8.1 Утилізація. Всі відпрацьовані культури, фільтри та відходи підлягають автоклавуванню при 121°C (40–60 хв) або хімічній інактивації (1% гіпохлорит натрію) перед утилізацією, що гарантує біологічну безпеку виробництва. Додатково проводять моніторинг навколишнього середовища (повітря, поверхні) на контамінацію.

8.2 Фінальний контроль якості. Тестування на чистоту (ендотоксини <5 Од/мл), діапазон господарів, стабільність (прискорені тести при 25°C/60% вологість). Зберігання готового продукту при 4°C, термін придатності 24 місяці.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		54





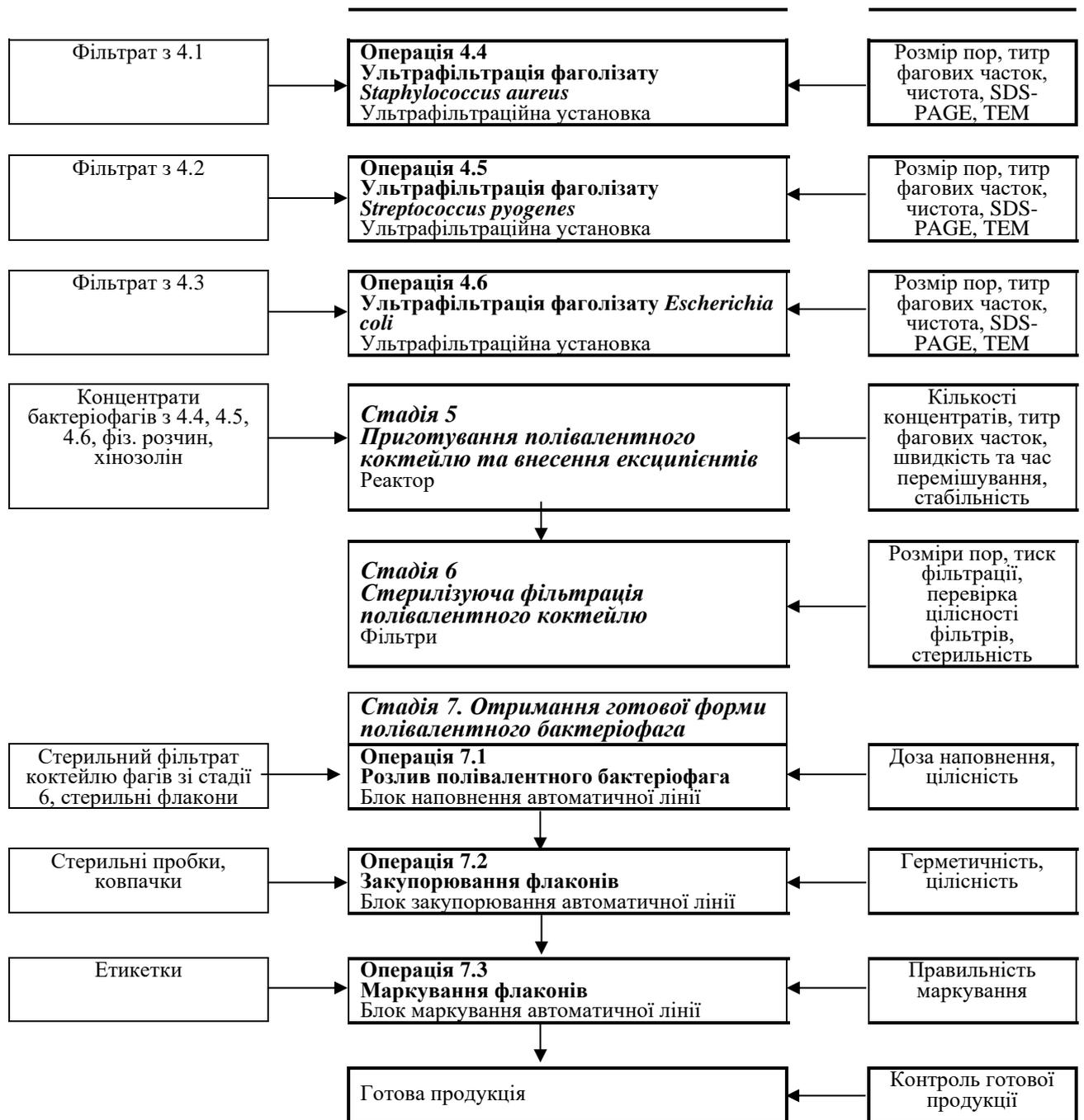


Рис. 3.1 – Технологічна схема виробництва полівалентного бактеріофага

Апаратурна схема виробництва полівалентного бактеріофага наведено на рис. 3.2, креслення апаратурної схеми - у додатку.

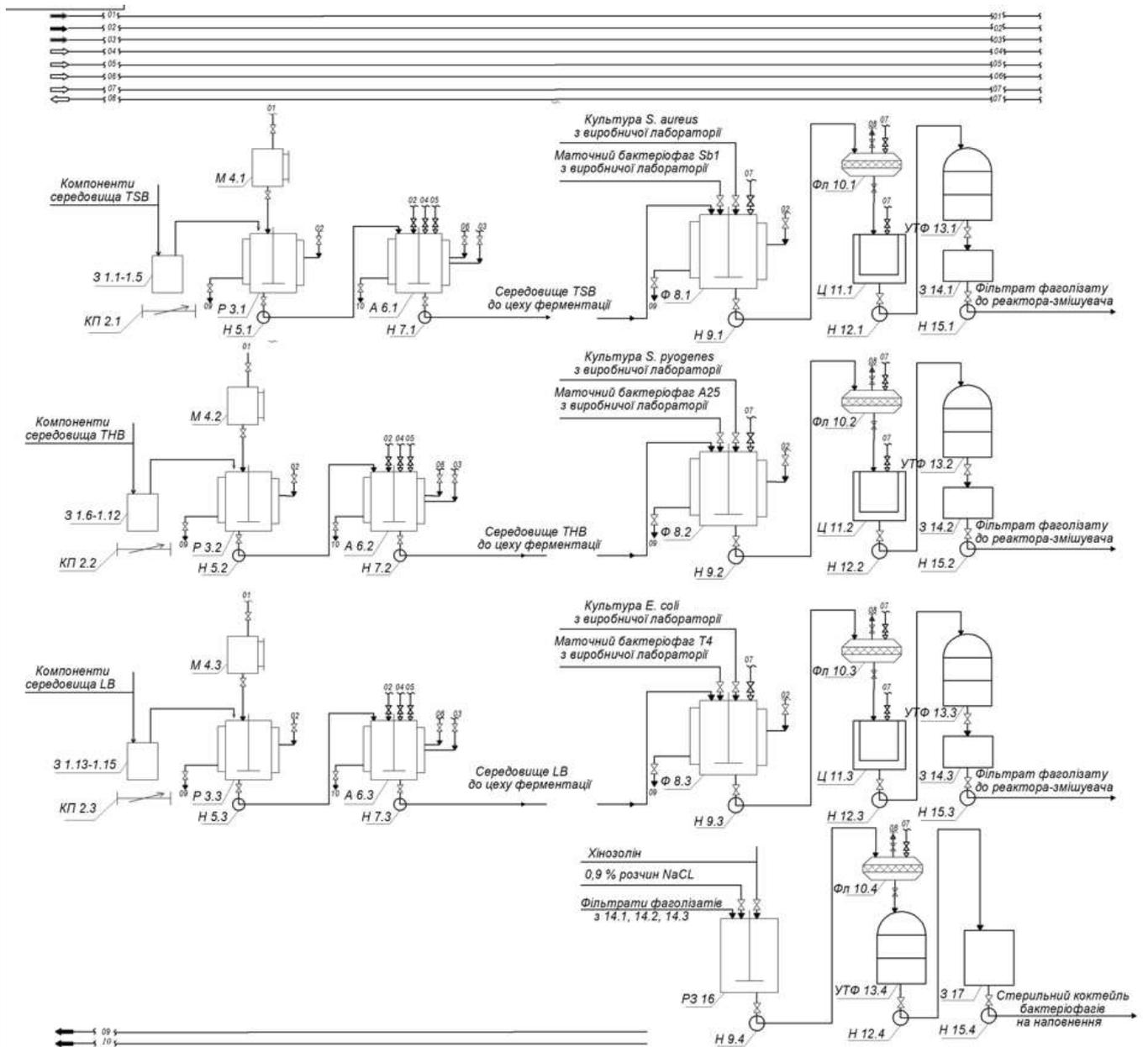


Рис. 3.2 – Апаратурна схема виробництва полівалентного бактеріофага

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата





### 3.5 Контроль виробництва

Система контролю якості виробництва полівалентного бактеріофага побудована на принципах Належної виробничої практики (GMP) і охоплює всі етапи: від підготовки виробничого середовища до фінальної атестації готової лікарської форми.

#### 1. Вхідний та загальновиробничий контроль

На дотехнологічному етапі особлива увага приділяється санітарній підготовці. Контроль ефективності обробки приміщень та обладнання здійснюється шляхом регулярного відбору змивів з поверхонь для перевірки на мікробіологічну чистоту. Параметри стерилізації допоміжних матеріалів (фільтрів та силіконових трубок) контролюються в процесі автоклавування при температурі 121 С протягом 30 хв із використанням хімічних та біологічних індикаторів для верифікації режиму.

Підтримка регламентованого класу чистоти забезпечується постійним моніторингом повітряного середовища. У зонах культивування (клас В) та наповнення (клас А) проводиться підрахунок часток за допомогою лазерних лічильників, а також оцінка седиментації мікроорганізмів на агарові пластини.

#### 2. Контроль приготування поживних середовищ

Якість середовищ TSB, THB та LB оцінюється за трьома критичними показниками:

1. Стерильність: проводиться шляхом інкубації зразків середовища при 37 С протягом 48 год; відсутність помутніння є критерієм успішного автоклавування.

2. Фізико-хімічні та органолептичні властивості: здійснюється візуальний контроль прозорості та кольору розчинів (солом'яно-бурштиновий), а також прецизійна рН-метрія при 25 С (цільові значення: 7,3 для TSB; 7,8 для THB; 7,0 для LB).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

3. Біологічна активність: виконується тестовий посів контрольних штамів для підтвердження ростових властивостей кожної партії середовища.

### 3. Моніторинг культивування та фагового лізису

Процес накопичення біомаси та подальшої деструкції клітин бактеріями-господарями контролюється спектрофотометрично за зміною оптичної густини ( $OD_{600}$ ). Оптимальним вікном для інфікування є логарифмічна фаза росту бактерій ( $OD_{600} = 0,5-1,0$ ), тоді як завершення лізису фіксується при падінні показника до  $0,05-0,1$ , що свідчить про повне просвітлення суспензії.

Паралельно оцінюється життєздатність бактерій (не менше  $10^8$  КУО/мл) та активність фагів за методом Апельмана. Останній дозволяє визначити титр фага за максимальним розведенням, що викликає повний лізис субстрату. Для забезпечення біологічної безпеки маточні фаги піддаються геномному секвенуванню з метою виключення наявності генів бактеріальних токсинів або факторів антибіотикорезистентності.

### 4. Контроль стадій очищення та концентрування

Після тангенціальної фільтрації (TFF) проводиться верифікація чистоти та концентрації фагових часток. Титрування здійснюється методом двошарового агару (за Грація), де цільовий рівень концентрату має становити  $10^{10}-10^{12}$  БУО/мл.

Для оцінки ефективності видалення білків бактерії-господаря застосовується електрофорез у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE). Морфологічна цілісність віріонів (наявність капсидів та відростків) і відсутність їх агрегації підтверджується методом трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Рівень бактеріальних ендотоксинів після аніонообмінної хроматографії контролюється за допомогою LAL-тесту і не повинен перевищувати 5 Од/мл.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		62

## 5. Валідація фінальних стадій та стерилізуючої фільтрації

Перед наповненням проводиться попередній тест на стабільність коктейлю (інкубація при 4С протягом 7 діб). Критичним етапом є стерилізуюча фільтрація через мембрану 0,22 мкм, цілісність якої обов'язково перевіряється тестом на «точку пухирця». Остаточна стерильність продукту підтверджується згідно з вимогами USP <71> шляхом 14-денної інкубації у середовищах FTM та TSB.

## 6. Випускний контроль готової лікарської форми

Фінальна атестація кожної серії препарату включає перевірку специфічної активності (титр кожного фага не менше  $10^8$  БУО/мл) та визначення спектра дії на панелі клінічних ізолятів. Фізико-хімічний блок контролю включає перевірку осмолярності (забезпечується 0,9% NaCl), стабільності рН та відсутності механічних включень шляхом автоматичної візуальної інспекції.

Прогноз терміну придатності (24 місяці) підтверджується прискореними випробуваннями на стабільність при температурі 25С та вологості 60%. Завершальним етапом є екологічний моніторинг зон утилізації відходів, що гарантує повну біологічну інактивацію відпрацьованого матеріалу.

Критичні параметри виробництва полівалентного бактеріофага наведено у табл. 3.2.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

## Контроль критичних параметрів

Номер	Критичні точки (стадії, операції)	Критичні параметри і характеристики якості	Одиниця виміру	Критерій прийнятності
1	2	3	4	5
K1.1-K1.3	<i>Стадія 1 Приготування середовищ (TSB, THB, LB)</i>	- температура стерилізації - час стерилізації - рН готового середовища (TSB / THB / LB) - стерильність	°C хв од. рН -	121 ± 1 15–20 7,3 / 7,8 / 7,0 ± 0,2 відсутність росту (48 год)
K2.1-K2.3	<i>Стадія 2 Підготовка посівного матеріалу (колби)</i>	- температура інкубації - час інкубації - оберти мішалки - оптична густина (OD600) - титр бактерій	°C год об/хв од. ОГ КУО/мл	37 ± 1 18–24 150–200 0,5–1,0 не менше 10 <sup>8</sup>
K3.1-K3.6	<i>Стадія 3 Виробнича ферментація та фаговий лізис</i>	- час накопичення біомаси - ОГ перед зараженням фагом - МОІ (інфікуюча доза) - час лізису (після внесення фага) - ОГ наприкінці лізису	год од. ОГ віріон/кл год од. ОГ	18–24 0,8–1,0 0,1–0,2 8–12 0,05–0,1 (просвітлення)
K4.1-K4.6	<i>Стадія 4 Очистка та ультрафільтрація (TFF)</i>	- пори мембран TFF - титр концентрату фагів	кДа БУО/мл	100–300 10 <sup>10</sup> – 10 <sup>12</sup>

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

		- вміст ендотоксинів	Од/мл	< 5
		- морфологія (ТЕМ)	-	типова, без деструкції
K5.1	<i>Стадія 5 Приготування коктейлю</i>	- співвідношення фагів (Staph:Strep:E.coli)	пропорція	1:1:1
		- концентрація NaCl	%	0,9
		- час перемішування	хв	30–60
K6.1-K6.2	<i>Стадія 6 Стерилізуюча фільтрація</i>	- тиск фільтрації	бар	0,5–1,0
		- розмір пор фінішного фільтра	мкм	0,22
		- цілісність мембрани (тест пухирців)	бар	згідно паспорту (>3,2)
		- стерильність (USP <71>)	-	стерильно (14 діб)
K8.1-K8.2	<i>Стадія 8 Фінальний контроль продукту</i>	- титр кожного фага в коктейлі	БУО/мл	не менше 10 <sup>8</sup>
		- вміст ендотоксинів	Од/мл	< 5
		- термін придатності	міс.	24 (при 4 С)

1. Метод Апельмана (Визначення активності фагів) використовується на Стадіях 2 та 3 для швидкої оцінки титру фага в рідкому середовищі.

Проведення:

1. Готують ряд з 10 пробірок із відповідним бульйоном (TSB, ТНВ або LB) по 4,5 мл у кожній.
2. У першу пробірку вносять 0,5 мл фаголізату (отримують розведення 10<sup>-1</sup>).
3. Шляхом послідовного перенесення 0,5 мл з попередньої пробірки в наступну готують розведення до 10<sup>-10</sup>.
4. У кожен пробірку додають по 0,1 мл "молодої" (18-годинної) культури бактерії-господаря.

									Арк.
									65
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				

5. Одна пробірка залишається без фага (контроль росту бактерій).

6. Інкують 18–24 години при 37 С.

Оцінка: активність визначається за останньою пробіркою, де розчин залишився прозорим (повний лізис). Якщо контроль каламутний, а пробірка  $10^{-8}$  прозора - титр фага становить  $10^8$ .

2. Метод подвійного агарового шару (за Грація) використовується на Стадії 4 для точного підрахунку БУО/мл (бляшкоутворюючих одиниць).

Проведення:

1. Нижній шар: У чашку Петрі заливають щільний (1,5%) м'ясо-пептонний агар.

2. Верхній шар: Готують "напіврідкий" агар (0,7%), розливають по 3 мл у пробірки та тримають на водяній бані при 45 С (щоб не застиг і не вбив бактерії).

3. У пробірку з напіврідким агаром додають 0,1 мл культури бактерій та 0,1 мл розведення фага.

4. Вміст пробірки швидко перемішують і виливають поверх нижнього шару агару.

5. Після застигання чашки інкують 12–18 годин.

Оцінка: На суцільному "газоні" росту бактерій з'являються прозорі зони (стерильні плями або "бляшки"). Підраховують кількість плям і множать на коефіцієнт розведення.

3. SDS-PAGE (Електрофорез білків) використовується на Стадії 4 для перевірки чистоти від бактеріальних білків.

Проведення:

1. Підготовка зразка: Фаголізат змішують з буфером, що містить SDS (руйнує вторинну структуру білків) та меркаптоетанол, і нагрівають при 95 С.

2. Заливка гелю: Готують поліакриламідний гель (розділяючий та фокусуєчий).

					<i>162.01.02.00 000 ПЗ</i>	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

3. Електрофорез: Зразки вносять у лунки гелю. Подають електричний струм. Білки рухаються до анода; швидкість залежить тільки від маси.

4. Фарбування: Гель забарвлюють (наприклад, Coomassie Blue або сріблом).

Оцінка: На гелі мають бути чіткі смуги, що відповідають структурним білкам фага. Наявність сторонніх "розмитих" смуг свідчить про залишки білків бактерій.

4. LAL-тест (Контроль ендотоксинів) використовується на Стадіях 4 та 8 для безпеки.

Проведення:

1. Використовують реактив - лізат клітин крові краба *Limulus polyphemus*.

2. Зразок фага змішують з LAL-реактивом у безпірогенній пробірці.

3. Інкують 1 год при 37 С.

Оцінка: Якщо утворюється твердий гель, який не руйнується при перевертанні пробірки - тест позитивний (ендотоксини є). Для точного значення використовують кінетичний турбідиметричний метод (вимірювання швидкості помутніння на приладі).

5. Тест «Точка пухирця» проводиться на Стадії 6 після стерилізуючої фільтрації.

Проведення:

1. Змочують використаний фільтр (0,22 мкм) водою або буфером.

2. Поступово підвищують тиск повітря на вході фільтра.

3. Вихідний патрубок занурюють у воду.

Оцінка: Фіксують тиск, при якому з'являється стійкий потік бульбашок. Якщо цей тиск нижче паспортного значення (зазвичай >3,2 бар для PES 0,22 мкм), фільтр вважається пошкодженим, а серія - нестерильною.

6. Тест на діапазон господарів проводиться на Стадії 8 для перевірки потужності бактеріофагів.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		67

Проведення:

1. Готують панель із 20–50 різних штамів бактерій (клінічні ізоляти з лікарень).

2. На кожний "газон" бактерій на чашці наносять краплю фагового коктейлю (титр  $10^8$ ).

Оцінка: Підраховують відсоток штамів, які були лізовані фагом. Висока якість коктейлю - це лізис  $>80-90\%$  тестованих штамів.

7. Стерильність (за USP  $<71>$ ) проводиться на Стадії 8 (випускний контроль).

Проведення:

1. Використовують метод мембранної фільтрації: препарат фільтрують крізь закриту систему з двома мембранами.

2. Одну мембрану промивають і заливають середовищем TSB (для грибів та аеробів, інкубація 20-25 C).

3. Другу мембрану заливають тіогліколевим середовищем (для анаеробів, інкубація 30-35 C).

4. Витримують 14 діб.

Оцінка: Відсутність будь-якого візуального росту протягом усього терміну підтверджує стерильність серії.

### 3.6 Екологічні аспекти виробництва

Виробництво полівалентного бактеріофага на основі *Staphylococcus phage Sb-1*, *Streptococcus phage A25* та *Escherichia phage T4* на вітчизняному підприємстві, наприклад ТОВ «БІОЛІК ФАРМА» (м. Харків), є біотехнологічним процесом з відносно низьким екологічним навантаженням завдяки використанню біодеградабельних компонентів і закритих систем (ферментери, фільтраційні установки) [13]. Згідно з матеріальним балансом на

									Арк.
									68
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ				

серію 50 л готового продукту (з урахуванням втрат на налипання, випаровування та контрольні відбори), технологічним процесом (8 стадій, включаючи приготування середовищ на 60 л з 5% запасом) та обладнанням (реактори 30 л, ферментери 40 л, TFF-установки, автоклави), аналіз екологічних аспектів фокусується на мінімізації впливу на довкілля, що регулюється Законом України «Про охорону навколишнього природного середовища» № 1264-ХІІ від 25.06.1991 р., Наказом МОЗ № 502 від 15.12.2003 р. (GMP) та ДСТУ ISO 14001:2015. При аналізі екологічних ризиків слід враховувати викиди та відходи, що утворюються протягом виробництва. На стадії підготовки підприємства та приготування середовищ утворюються стоки від миття, при ферментації - газові викиди від аерації, при фільтрації - пермеат і осади, втрати на мембранах. Згідно з матеріальним балансом сумарне водоспоживання досягає 700–800 л на серію, з втратами 10–15% (випаровування 2,5 л, пермеат 1,8 л, фільтраційні втрати 0,5 л), що вимагає ефективного рециклінгу.

Відходи класифікуються за ДСТУ 4462.3.01:2006 та СанПіН 2.2.4-171-10 (біологічна небезпека класу 3–4). З матеріального балансу на 50 л серії (середовища 60 л з втратами) утворюється близько 400–500 л стоків, 20–30 кг твердих відходів і мінімальні газові викиди.

Газоповітряні викиди утворюються під час аерації в ферментерах (витрата повітря 0,0005 м<sup>3</sup>/с для трьох 40 л ферментерів, коефіцієнт аерації 0,4). Склад газоповітряних викидів – CO<sub>2</sub> (від метаболізму бактерій, 0,2–0,5 кг/цикл), леткі органічні сполуки (побічні продукти розщеплення вуглеводів (глюкози), амінокислот та ліпідів, що містяться в живильних середовищах TSB/ТНВ/LB, <0,05 мг/м<sup>3</sup>), аерозолі з фагами та бактеріями (контрольовані РТФЕ-фільтрами 0,22 мкм), випаровування додає водяну пару.

Стічні води утворюються на стадіях підготовки (відпрацьовані розчини від дезінфекції спиртом та перекисом), приготування середовищ, миття обладнання, пермеат від ультрафільтрації. Склад стічних вод - залишки

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
						69
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

середовищ (білки з триптон, пептон, солі NaCl/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, глюкоза), бактеріальні фрагменти, фагові частки, дезінфектанти (спирт 76%, перекис 1%). БСК (біологічне споживання кисню) на рівні 800–2500 мг/л, ХСК (хімічне споживання кисню) - 1500–4000 мг/л, рН 6–8. Об'єм стічних вод становить близько 70–80% від водоспоживання.

Тверді відходи утворюються від фільтрації (PES-касети 100 кДа площею 0,6 м<sup>2</sup>, скловолокно 1–5 мкм, осади з центрифугування 0,3–0,5 кг/цикл), упаковки (брак флаконів, пробок, ковпачків), лабораторних матеріалів (для контролю). Склад твердих відходів – пластик та гума (60–70%), біологічні залишки (30–40%, контаміновані фагами та бактеріями). Об'єм складає 15–20 кг/серія (10–15% від маси сировини, як сухі концентрати 1,7 кг).

На підприємстві, що здійснює виробництво полівалентного бактеріофагу, передбачено очищення, знешкодження, утилізацію відходів. Враховуючи роботу з культурами клітин господарів, поводження з відходами на підприємстві здійснюється за рівнем біобезпеки BSL-2. Для кожного етапу та виду відходів передбачено наступні заходи з очищення, знешкодження, утилізації:

1. Газоповітряні викиди. Очищення здійснюється через PTFE/HEPA-фільтри (99,97% ефективність для 0,3 мкм) та УФ-стерилізацію в вентиляції ферментерів. Відпрацьоване повітря проходить крізь каскадний блок очищення, що включає PTFE/HEPA-фільтри та систему УФ-стерилізації у вихідній магістралі вентиляції. Інактивація аерозолів здійснюється автоклавуванням.

2. Стічні води. Для очищення стічних вод на підприємстві передбачено попереднє очищення - фільтрація (0,45 мкм) та центрифугування (5000–10 000 g) для осадження фрагментів клітин з подальшим знешкодженням автоклавуванням (121°C, 30–60 хв) та утилізацією на біологічних очисних спорудах (активованій мул для зниження БСК <300 мг/л), скиданням в каналізацію після нейтралізації рН (6,5–8,5).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		70

3. Тверді відходи. Контаміновані матеріали (фільтри, осади) підлягають автоклавуванню з наступною передачею на інсинерацію (спалювання при 800–1000°C). Чистий пластик та скло передаються на рециклінг спеціалізованим фірмам.

Для мінімізації впливу на довкілля та підвищення екологічної ефективності пропонуються наступні заходи [5]:

1. Впровадження системи рециклінгу води. Використання технології зворотного осмосу для очищення пермеату після ультрафільтрації дозволить повернути до 60–70% води в технічний цикл (для миття обладнання або поливу територій).

2. Енергозбереження. Використання теплоти відпрацьованої пари після стерилізації середовищ для попереднього підігріву води в системі гарячого водопостачання для забезпечення побутових і технологічних потреб підприємства.

3. Екологічний моніторинг. Щомісячний аудит обсягів утворення відходів та контроль показників БСК та ХСК на виході з підприємства згідно з ДСТУ ISO 14001:2015.

4. Утилізація біомаси. Оскільки бактеріальний осад після інактивації є багатим на азот та фосфор, він може бути використаний як сировина для анаеробного зброджування з отриманням біогазу або як компонент для органічних добрив.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		71

## ВИСНОВОК

У кваліфікаційній роботі вирішено актуальне науково-технічне завдання з обґрунтування та розробки технології промислового виробництва полівалентного бактеріофага, призначеного для боротьби з мультирезистентними штамами *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* та *Escherichia coli*.

1. Проведено комплексний аналіз наукової літератури, який підтвердив високу актуальність фаготерапії в умовах глобальної кризи антибіотикорезистентності. Визначено, що найбільш перспективним є використання коктейлів літичних бактеріофагів, які забезпечують швидку деструкцію патогенів без ризику горизонтального перенесення генів вірулентності.

2. Обґрунтовано вибір біологічних об'єктів препарату: *Staphylococcus phage Sb-1* та *Escherichia phage T4* – як класичних представників вірусів із суворо літичним циклом та надійним механізмом пакування ДНК та *Streptococcus phage A25* – як специфічного вірусу-«втікача від лізогенії», що втратив здатність до інтеграції в геном господаря, ставши функціонально вірулентним. Показано, що відсутність у геномах обраних фагів інтеграз та бактеріальних токсинів гарантує високий профіль біологічної безпеки препарату.

3. Обґрунтовано склад живильних середовищ для вирощування культур клітин господарів (на основі TSB, THB та LB) та параметри технологічного режиму культивування. Встановлено, що підтримання температури 37°C та рН у діапазоні 7,2–7,5 у поєднанні з активною аерацією (0,4 об/об·хв) дозволяє досягти цільового титру фаголізатів не менше 10<sup>9</sup> БУО/мл.

4. Виконано розрахунок матеріального балансу на пілотну серію об'ємом 50 л готового продукту.

5. Складено технологічну та апаратурну схеми виробництва для умов

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		72

ТОВ «БІОЛІК ФАРМА». Впровадження методу тангенціальної ультрафільтрації (ТФФ) на касетах PES (100 кДа) дозволяє ефективно очистити препарат від залишків клітин-господарів та сконцентрувати віріони без втрати їхньої біологічної активності.

6. Визначено критичні точки контролю (ККТ) згідно з принципами GMP, зокрема, контроль стерильності живильних середовищ, моніторинг повноти лізису та фінішну стерилізуючу фільтрацію. Це забезпечує стабільність якості та мікробіологічну чистоту кожної серії препарату.

7. Здійснено екологічну оцінку технології, яка довела її безпечність при дотриманні протоколів знешкодження. Запропоновано заходи з рекуперації тепла відпрацьованої пари для системи гарячого водопостачання та використання інактивованого бактеріального осаду як біодобрива, що підвищує енергоефективність виробництва та відповідає принципам сталого розвитку та стандарту ISO 14001:2015.

Практична реалізація запропонованого проекту дозволить розширити асортимент вітчизняних антибактеріальних засобів та забезпечити пацієнтів доступним препаратом для лікування складних гнійно-запальних інфекцій.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		73

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бактеріофаги. *ПрімаВак*. URL: <https://primavac.com.ua/bakteriofagi> (дата звернення: 10.11.2025).
2. Бактеріофаги. Сучасна постановка проблеми та її історичні інтерпретації / І. І. Торянник та ін. *Annals of Mechnikov Institute*. 2023. № 1. DOI: 10.5281/zenodo.7721892.
3. Бактеріофаги: теорія і практика : монографія / А. В. Харіна та ін. Київ : Компринт, 2024. 277 с.
4. Деркач С. А. Бактеріофаги: актуальні питання випуску препаратів-фагів та оцінка їх активності. *Інфекційні хвороби*. 2022. № 1(10). С. 5–10. DOI 10.11603/1681-2727.2022.1.13014.
5. Екологічна біотехнологія : навч. посіб. : у 2 кн. / О. В. Швед та ін. Львів : Львів. політехніка, 2018. Т. 1. 424 с.
6. Поточилова В. В. Мікробіологічне обґрунтування ефективності комплексного застосування антибіотиків та полівалентного піобактеріофагу за гострого некротичного панкреатиту : дис. ... канд. біологічних наук. Київ, 2021. 177 с.
7. Продукція. *Enzim Biotech Pharm*. URL: <https://pharma.enzim.ua/?lng=uk#product> (дата звернення: 10.11.2025).
8. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. I. Ферментація. Львів : Львів. політехніка, 2004. 240 с.
9. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі. Ч. II. Обробка культуральних рідин. Львів : Львів. політехніка, 2004. 296 с.
10. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості. Технологічні розрахунки. Приклади і задачі.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		74

Ч. III. Основи проектування мікробіологічних виробництв. Львів : Львів. політехніка, 2004. 252 с.

11. Технологічне обладнання біотехнологічної і фармацевтичної промисловості : підруч. для вищ. навч. закл. / М. В. Стасевич та ін. Львів : Новий Світ–2000, 2018. 410 с.

12. A deep dive into the regulatory framework for Phage Medicinal Products: Voisin Consulting Life Science. URL: <https://voisinconsulting.com/blog/a-deep-dive-into-the-regulatory-framework-for-phage-medicinal-products/> (Date of access: 10.11.2025).

13. Addressing challenges in microbial manufacturing: Systematic microbial biotechnology / L. Liu et al. *The Innovation*. 2025. Vol. 6(6). DOI: 10.1016/j.xinn.2025.100871

14. Advances in the production, purification, and concentration of bacteriophage bionanoparticles for biomedical applications / Xin Gao et al. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2026. Volume 347. P. 103693. DOI: 10.1016/j.cis.2025.103693.

15. Altamirano F. L. G., Barr J. J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *ASM Journals*. Vol. 32(2). DOI: 10.1128/cmr.00066-18.

16. Bacteriophages and their use in combating antimicrobial resistance: World Health Organization. URL: <https://www.who.int/europe/news-room/factsheets/item/bacteriophages-and-their-use-in-combating-antimicrobial-resistance> (Date of access: 10.12.2025).

17. Bacteriophages: Eliava Biopreparations. URL: <https://phage.ge/en/products> (Date of access: 10.11.2025).

18. Bacteriophage Production in Compliance with Regulatory Requirements / J.-P. Pirnay et al. *Methods in molecular biology*. 2024. Vol. 2734. P. 89–115. DOI: 10.1007/978-1-0716-3523-0\_6.

19. Bacteriophage T4 adsorbed to Escherichia coli Ultra-low landing voltage SEM image SEI / Beam deceleration (BD) : JEOL. URL:

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		75

<https://www.jeol.com/solutions/applications/nano/details/20240917.php> (Date of access: 05.01.2026).

20. Bacteriophage T4 Genome / E. S. Miller et al. *Microbiology and molecular biology reviews*. Vol. 67(1). P. 86-156. DOI:10.1128/MMBR.67.1.86-156.2003.

21. Bacteriophage T4 Infection of Stationary Phase E. coli: Life after Log from a Phage Perspective / D. Bryan et al. *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 16. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01391.

22. Bacteriophage therapy for multidrug-resistant infections: current technologies and therapeutic approaches / M. K. Kim et al. *The Journal of Clinical Investigation*. 2025. Vol. 135(5). P. e187996. DOI: 10.1172/JCI187996.

23. Considerations and perspectives on phage therapy from the transatlantic taskforce on antimicrobial resistance / K. Moon et al. *Nature Communications*. 2025. Vol. 16(1). P. 10883. DOI: 10.1038/s41467-025-64608-3.

24. Correlation of Host Range Expansion of Therapeutic Bacteriophage Sb-1 with Allele State at a Hypervariable Repeat Locus / K. V. Sergueev et al. *ASM Journals*. 2019. Vol. 85(22). DOI: 10.1128/AEM.01209-19

25. Draft guideline on quality aspects of phage therapy medicinal products: FDCELL. URL: <https://www.fdcell.com/news/draft-guideline-on-quality-aspects-of-phage-therapy-medicinal-products.html> (Date of access: 10.11.2025).

26. Elahi Y., Nowroozi J., Fard R. M. N. Isolation and characterization of bacteriophages from wastewater sources on *Enterococcus* spp. isolated from clinical samples. *Iran J Microbiol.* 2021. Vol. 13(5). P. 671–677. DOI: 10.18502/ijm.v13i5.7434.

27. *Escherichia* phage T4, complete genome: National Library of Medicine. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF158101> (Date of access: 18.11.2025).

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		76

28. Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage Sb-1 against freshly isolated clinical pathogens / L. Kvachadze et al. *Microb Biotechnol.* 2011. Vol. 4(5). P. 643–650. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00259.x.

29. Genomic Sequencing of High-Efficiency Transducing Streptococcal Bacteriophage A25: Consequences of Escape from Lysogeny / K. McCullor et al. *J Bacteriol.* 2018. Vol. 200 (23). 00358-18. DOI: 10.1128/JB.00358-18.

30. Guideline on quality aspects of phage therapy medicinal products: European Medicines Agency. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-aspects-phage-therapy-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-quality-aspects-phage-therapy-medicinal-products_en.pdf) (Date of access: 10.11.2025).

31. Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Active against Clinical Strains of E. coli and Development of a Phage Antimicrobial Cocktail / P. Alexyuk et al. *Viruses.* 2022. Vol. 14(11), 2381. DOI: 10.3390/v14112381.

32. Isolation and Preliminary Characterization of Staphylococcus aureus Lytic Phages from Wastewater Environment in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, West Africa / K. Gnada et al. *Advances in Microbiology.* 2025. Vol. 15(1). DOI: 10.4236/aim.2025.151004.

33. Isolation of phages infecting the zoonotic pathogen Streptococcus suis reveals novel structural and genomic characteristics / E. K. Osei et al. *Microbiological Research.* 2025. Vol. 296, 128147. DOI: 10.1016/j.micres.2025.128147.

34. Manufacturing of bacteriophages for therapeutic applications / J. João et al. *Biotechnology Advances.* 2021. Vol. 49. P. 107758. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107758.

35. McShan W. M., McCullor K. A., Nguyen S. V. The Bacteriophages of Streptococcus pyogenes. *ASM Journals.* 2019. Vol. 7(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0059-2018

										Арк.
										77
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	162.01.02.00 000 ПЗ					

36. Molecular Basis of Lysis-Lysogeny Decisions in Gram-Positive Phages / A. Brady et al. In *Annual Review of Microbiology*, Gottesman S., Ed.; Annual Reviews. 2021. Vol. 75, P. 563–581.

37. Niazi S. K. Bacteriophage Therapy: Discovery, Development, and FDA Approval Pathways. *Pharmaceuticals*. 2025. Vol. 18(8). P. 1115. DOI: 10.3390/ph18081115.

38. One Health : World Organisation for Animal Health. URL: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/> (Date of access: 10.11.2025).

39. Phage therapy medicinal products. *European pharmacopoeia* / eleventh ed. suppl. 11.6. URL: <https://www.edqm.eu/documents/52006/277566/European%20Pharmacopoeia%20-%20Phage%20therapy%20medicinal%20products%20%285.31%29.pdf/d9da2e01-e002-32c9-b2eb-8a9360439c05?t=1727862827906> (Date of access: 10.11.2025).

40. Regulatory considerations for developing phage therapy medicinal products for the treatment of antimicrobial resistant bacterial infections / Ai Fukaya-Shiba et al. *Front. Pharmacol.* 2025. Vol. 16. P. 1713471. DOI: 10.3389/fphar.2025.1713471.

41. Regulatory considerations for therapeutic use of bacteriophages in the UK. URL: [https://assets.publishing.service.gov.uk/media/6908ce9c5e080b12248981a2/regulatory\\_considerations\\_for\\_therapeutic\\_use\\_of\\_bacteriophages\\_in\\_the\\_UK.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/media/6908ce9c5e080b12248981a2/regulatory_considerations_for_therapeutic_use_of_bacteriophages_in_the_UK.pdf) (Date of access: 10.11.2025).

42. Regulation of phage therapy medicinal products: developments, challenges, and opportunities / M. Fuerst-Wilmes et al. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2025. Vol. 15. DOI: 10.3389/fcimb.2025.1631359.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78

43. Sandle T. Phages As A Pharmaceutical: New EMA Guidance On Antimicrobial Drug Development. URL: <https://www.clinicalleader.com/doc/phages-as-a-pharmaceutical-new-ema-guidance-on-antimicrobial-drug-development-0001> (Date of access: 10.11.2025).

44. Smrekar F. GMP Phage Production for Clinical Trials. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-gmp-phage-production-clinical-trials-frenk-smrekar\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-gmp-phage-production-clinical-trials-frenk-smrekar_en.pdf) (Date of access: 10.11.2025).

45. Species List: Herelleviridae : ICTV. <https://ictv.global/report/chapter/herelleviridae/taxonomy/herelleviridae>. (Date of access: 15.11.2025).

46. Staphylococcus phage Sb-1, complete genome : National Library of Medicine. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ163896> (Date of access: 15.10.2025).

47. Streptococcus phage A25, complete genome: National Library of Medicine. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT388093.1> (Date of access: 25.12.2025).

48. The Role of Quorum Sensing in Phage Lifecycle Decision: A Switch Between Lytic and Lysogenic Pathways / Junjie Shang et al. *Viruses*. 2025. Vol. 17( 3). 10.3390/v17030317.

					162.01.02.00 000 ПЗ	Арк.
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		79

## **ДОДАТКИ**



Міністерство  
охорони здоров'я  
України

Національний  
фармацевтичний  
університет



СЕРТИФІКАТ

Цим засвідчується, що

**Kosenko V.O.**

**Scientific supervisor:  
Kaliuzhnaia O.S.**

брав(ла) участь у роботі VI Всеукраїнської  
науково-практичної конференції  
з міжнародною участю

**YOUTH  
PHARMACY  
SCIENCE**

Ректор НФаУ,  
д. фарм. н., проф.



**Олександр КУХТЕНКО**

10-11 грудня 2025 р.  
м. Харків  
Україна

Додаткові технології покращення включають мутагенез (фізичний та хімічний) для підвищення синтезу в штаммах *S. marcescens*, а також іммобілізацію ферменту (біокон'югація з наночастинками оксиду титану) для підвищення стабільності та антибактеріальної активності.

**Висновки.** На основі проведеного аналізу сучасної наукової літератури можна зробити висновок, що традиційне виробництво серратіопептидази з використанням природного штаму *Serratia marcescens* стикається з суттєвими обмеженнями, пов'язаними з патогенністю, стабільністю врожайності та масштабуванням, що робить актуальним перехід до альтернативних біотехнологічних методів. Пошук нових штамів з екологічно безпечних джерел (грунти, морські відкладення, відходи) дозволяє ідентифікувати високопродуктивні ізоляти. Оптимізація ферментації, включаючи глибинну ферментацію з підживленням та підбір середовищ та умов забезпечує зростання врожаю, роблячи процес економічно вигідним. Особливо перспективним є рекомбінантне виробництво. Ці технології відкривають можливості для локалізації виробництва в Україні, де відсутнє власне виробництво субстанції, а ринок залежить від імпорту. Адаптація на базі вітчизняних підприємств сприятиме зменшенню імпортозалежності, посиленню стійкості ланцюгів постачань у контексті геополітичних ризиків, створенню робочих місць та економічному внеску в ВВП, забезпечуючи доступність препаратів для населення.

### PHAGE THERAPY AS A RESPONSE TO THE ANTIBIOTIC RESISTANCE CRISIS

Kosenko V.O.

Scientific supervisor: Kaliuzhnaia O.S.

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

kalyuzhnayao.s@gmail.com

**Introduction.** Phage therapy is a timely response to the global antibiotic resistance crisis, where traditional antibiotics are losing effectiveness against multidrug-resistant bacteria such as ESKAPE pathogens (ESKAPE is an acronym for the six most dangerous and antibiotic-resistant bacterial pathogens: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter spp.*, which are a major cause of hospital-acquired infections worldwide). Clinical and preclinical studies demonstrate the role of phage therapy in restoring bacterial susceptibility to antibiotics, destroying biofilms, and modulating the immune response. For example, phages can sensitize resistant bacteria to  $\beta$ -lactams, reducing the minimum inhibitory concentration (MIC) and increasing susceptibility, as well as penetrating biofilms where antibiotics are often ineffective. In clinical settings, phage therapy leads to a reduction in bacterial load, improvement in clinical indicators, and a decrease in side effects, especially in patients with severe infections, thus facilitating combined therapy with antibiotics.

**Aim.** To analyze current trends in phage therapy as a response to the antibiotic resistance crisis for the further development of strategies for implementation at domestic enterprises.

**Materials and methods.** Analysis and systematization of scientific publications from open sources, company-manufacturer websites, and patents.

**Research results.** Given the global epidemic of antibiotic resistance and the growing interest in phage therapy, the topic has high potential for innovation in medicine, veterinary science, and the food industry. Global companies such as Intralytix (USA), Locus Biosciences (USA), BiomX (Israel), PhageLab (Chile), Armata Pharmaceuticals (USA), Adaptive Phage Therapeutics (USA), and Phagos

(France) are developing phage products, with the market estimated at \$1.34 billion USD in 2025 and projected to reach \$2.03 billion USD by 2032.

For instance, the company Intralytix focuses on producing phages to combat bacterial infections in food products and food processing facilities. Their portfolio includes the following products: ListShield™ (*Listeria monocytogenes* bacteriophage), SalmoFresh™ (bacteriophage for the most common and pathogenic *Salmonella* strains), ShigaShield™ (*Shigella* bacteriophage, including *S. flexneri*, *S. sonnei*, and *S. dysenteriae*), EcoShield™ PX (*Escherichia coli* bacteriophage, specifically Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC), including O157:H7 STEC), CampyShield™ (*Campylobacter* spp. bacteriophage, specifically *Campylobacter jejuni*). They also produce products for pet food (Ecolicide®, SalmoLyse®, ListPhage™, PetShield), skin and urogenital tract infections in animals (Ecolicide® PX, SuperBiotix™ UTS), and human dietary supplements (SuperBiotix™ UTS – cranberry extract and lytic *E. coli* bacteriophages for healthy gut and urinary tract microflora; StaphLyse™ – mixture of lytic staphylococcal bacteriophages, Revitalyse® StaphLyse™ – used for skin care; PhageBiotix™ TRiP – traveler's tablet, a mixture of phages against *Shigella* and *Campylobacter*).

Many companies select combinations of bacteriophages that are most effective against bacteria isolated from specific sources of infection. For example, PhageLab collaborates with livestock and poultry producers to develop bacteriophage-based solutions by collecting samples and identifying bacterial pathogens.

A large number of manufacturers are engaged in the development of bioengineered phages. Locus Biosciences, a pharmaceutical company specializing in bacteriophage therapy enhanced by CRISPR-Cas3 technology (the «crPhage» platform), is one such example. The company's leading drug candidate, LBP-EC01, is a combination (cocktail) of phages that causes bacterial lysis by destroying their DNA. In addition to LBP-EC01, Locus is also actively developing programs aimed at treating infections caused by other critically important pathogens: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*.

Another pharmaceutical company creating bioengineered phages for phage therapy is Armata Pharmaceuticals. The company's candidates target key antibiotic-resistant bacteria, with the leading product candidate AP-SA01 targeting *Staphylococcus aureus*, including multidrug-resistant strains. The company is also developing and refining a portfolio of patented synthetic phage candidates, including a synthetic phage for *Pseudomonas aeruginosa*.

In Ukraine, bacteriophages are currently produced by the company ENZIM BIOTECH PHARM (Escherichiosis-Enterococcal, Klebsiella-Proteus, Multivalent, Pseudomonas, Staphylococcal, Strepto-Staphylococcal), as well as by some domestic companies under contract for foreign companies, for example, Pharmex Group manufactures Polyvalent Bacteriophage (Pyophage, Intestiphage) for NeoProbioCareUkraine (Canada).

**Conclusions.** The production of polyvalent bacteriophages, particularly in combination with other agents, has high potential for treating antibiotic-resistant infections and ensuring food safety. The further active implementation of their production at domestic enterprises is a promising opportunity, considering the growing global phage therapy market and the existing capacities of Ukrainian enterprises.



