

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**  
(повна назва інституту/факультету)

**Кафедра промислової біотехнології**  
(повна назва кафедри)

**Дипломний проект**

**на здобуття ступеня бакалавра**

з напрямку підготовки 6.051401 Біотехнологія  
(код і назва)

на тему: Технологія виробництва ландоміцину А. Дільниця біосинтезу продукту

Виконав: студент 4 курсу, групи БТ-21  
(шифр групи)

Д'якова Марія Олексіївна \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник к.т.н., доц. Тодосійчук Т.С. \_\_\_\_\_  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Консультант Розділ 5 доц., к.т.н. Ружинська Л.І. \_\_\_\_\_  
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали) (підпис)

Рецензент к.б.н., старший викладач Ситнік О.І. \_\_\_\_\_  
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

Київ – 2016 року

Протипухлинні антибіотики – це одна з груп лікарських препаратів, що застосовуються для лікування онкологічних захворювань, а саме препарати мікробіологічного походження, які пригнічують життєдіяльність еукаріотичних клітин за рахунок цитотоксичної дії. Серед протипухлинних антибіотиків найбільш відомі групи актиноміцинів, антрациклінів та відносно нова група ангуциклінів – полікетидних антибіотиків.

Більшість протипухлинних антибіотиків мають низьку вибірковість цитотоксичної дії, що призводить до серйозних побічних ефектів при їх використанні. Перевага ландоміцину А, що належить до групи ангуциклінів, полягає в тому, що ця сполука не інтеркалює у ДНК, маючи при цьому високу протипухлинну активність. За даними досліджень, ландоміцин А у мікромольних концентраціях має значно вищу активність, ніж клінічно використовувані на сьогодні протипухлинні антибіотики. Це визначає перспективи використання його у медицині та актуальність розробки біотехнології його виробництва.

Основною проблемою промислового виробництва протипухлинних антибіотиків, і ландоміцину А зокрема, є відносно низька антибіотична активність штамів-продуцентів та відповідно невеликий вихід цільової сполуки, що зумовлює високу собівартість готового продукту. Проте існують можливості для генетичного конструювання штамів-надпродуцентів. Іншим шляхом зниження вартості антибіотику є підбір поживних середовищ для його біосинтезу на основі більш дешевих компонентів (соевого борошна, кукурудзяного борошна тощо), оскільки існуючі лабораторні розробки передбачають використання готових високовартісних концентратів для приготування середовища.

Метою даної роботи є розробка технології отримання активного фармацевтичного інгредієнту протипухлинного антибіотику ландоміцину А.

Для реалізації поставленої мети вирішувалися наступні завдання: обґрунтування способу отримання штаму-надпродуценту, вибір та розрахунок ферментеру, підбір основного обладнання, розробка

технологічної та апаратурної схем виробництва з урахуванням особливостей продуцента.

Єдиним продуцентом, який здатний синтезувати та накопичувати ландоміцин А у достатніх для виділення кількостях є актиноміцетна культура *Streptomyces cyanogenus* S136. До особливостей цього штаму, які використовуються для отримання цільового продукту, належить можливість застосування методів генетичної інженерії для підвищення рівня продукції ландоміцину А і створення надпродуценту.

Дикий тип *Streptomyces cyanogenus* широко розповсюджений у ґрунтах, як і інші види стрептоміцетів. В ґрунті вони існують переважно у вигляді спор. Представники роду *Streptomyces*, як уже було зазначено, відносяться до групи актиноміцетів. Ці організми є грам-позитивними бактеріями, що ростуть у вигляді розгалужених нитчастих утворень гіфів, формуючи вегетативний міцелій. Вегетативний або субстратний міцелій утворюється при проростанні спор стрептоміцету на твердих поживних середовищах. Ріст продуценту відбувається при 25-30°C з оптимумом 28-30°C. Оптимальний діапазон значень рН для росту культури становить 6,5-8,0.

Виробничий біосинтез ландоміцину А в розробленій технології проводиться на модифікованому середовищі SG, особливість якого полягає у використанні екстракту соєвого борошна замість питної води у складі. Це дозволяє значно здешевити середовище, не використовуючи імпортований соєвий триптон. Екстракт соєвого борошна окрім основної маси азоту та вуглецю, містить також необхідні мікроелементи, іони металів у вигляді солей, вітаміни.

Аналіз існуючих штамів-продуцентів сполук ландоміцинового ряду дав змогу обрати штам *Streptomyces cyanogenus* S136 MO19 для використання в технології виробництва ландоміцину А, так як саме він має достатньо високий рівень продукції цієї сполуки, що складає 70-140 мкг/мл культуральної рідини, залежно від складу поживного середовища.

Ландоміцин А – один з найбільш відомих представників ландоміцинів, що є кінцевим продуктом на шляху їхнього біосинтезу і являє собою систему бензантраценових кілець, до якої приєднаний гексасахаридний бічний ланцюг, у якому двічі повторюється трисахарид наступного складу: D-олівозо-4-1-D-олівозо-3-1-L-родіноза. Ландоміцин А має найвищу протипухлинну антибіотичну активність у групі через найдовший олігосахаридний ланцюг та масу 1087.163 Да. Молекулярна формула сполуки -  $C_{55}H_{74}O_{22}$ .

Початковою сполукою для реакцій біосинтезу ландоміцину А є вуглеводний компонент середовища, у даному випадку D-глюкоза, яка після проходження реакцій гліколізу, перетворюється на піруват. Наступні реакції біосинтезу ландоміцину А відносяться до групи реакцій полікетидного синтезу. Структурне різноманіття ландоміцинів постає з варіацій ферментних модулів на шляху біосинтезу, з результату стереохімічних перетворень при конденсації.

Кінцевий продукт виробництва – активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) ландоміцин А, що використовується для виробництва готових лікарських засобів, отриманий шляхом біосинтезу штамом *Streptomyces cyanogenus S136 MO19*. Ландоміцин А – кристалічний порошок червоно-бурого кольору. За компонентним складом кінцевий продукт містить ландоміцин А у кількості 95% та близько 5% домішок, серед яких: неорганічні залишки поживного середовища у кількості до 2% та до 3% ландоміцинів В, D.

Виходячи з сучасних тенденцій очистки антибіотичних речовин, а також використання саме цього методу в лабораторних умовах з отриманням препарату високого ступеня очистки, було обрано метод зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ЗФ ВЕРХ) для виділення ландоміцину А з отриманого екстракту. Це пояснюється і тим, що для відділення цільового продукту від фракції інших ландоміцинів, дуже споріднених за будовою, потрібна висока роздільна здатність процесу.

Основним висновком із огляду досліджень механізмів впливу цільового продукту на біохімічні процеси стало те, що ландоміцин А володіє протипухлинною активністю апоптозного характеру у мікромольних кількостях, в основному впливаючи на пухлинні клітини мезенхімального походження (клітини лейкемії), а також деякі клітини епітеліального походження.

Метод отримання високопродуктивного штаму *S. cyanogenus* S136 MO19, який є продуцентом ландоміцину А в розробленій технології, базується на введенні додаткових копій гена-активатора шляхом плазмідної трансформації. Як ген-активатор використовують ген *lanI* *S. cyanogenus* S136 у складі інтегративного вектора pIJ6902. У результаті використання методів генної інженерії відбуваються зміни у механізмах регуляції вторинного метаболізму штаму-продуценту, що призводить до переважного накопичення ландоміцину А та зниження рівня біосинтезу ландоміцинів В, D. Отриманий рекомбінантний штам продукує приблизно у 5 разів більше ландоміцину А, ніж вихідний – 70-140 мкг/мл ландоміцину А. Ці дані було використано як основу для створення технології, описаної у даній роботі.

Одним з перших основних технологічних процесів виробництва ландоміцину А є стадія виробничого біосинтезу. Так як продуцент *S. cyanogenus* S136 є облигатним аеробом, процес проходить при інтенсивному перемішуванні та аерації, що повинно відобразитися на конструкції використовуваного обладнання. Тому було обрано виробничий ферментер об'ємом 6,3 м<sup>3</sup> із коефіцієнтом заповнення 0,6, що оснащений механічним перемішувачем – відкритою турбінною мішалкою із частотою обертання 3,33 с<sup>-1</sup>, яка підходить для перемішування культуральної рідини середньої густини, що містить міцелій стрептоміцету. Аерація культури в обраному апараті здійснюється за допомогою вторинного диспергуючого пристрою барботеру, що створює інтенсивний масо- та теплообмін, розміщеного під мішалкою, до якого через штуцер подається очищене технологічне повітря. Так як біосинтез ландоміцину А проходить при 28°C,

конструкція ферментеру передбачає наявність сорочки, в яку подається теплоносії (вода), що забезпечує підтримання сталої температури в апараті.

На стадії виділення антибіотику також існує ряд технологічних особливостей, зумовлених продуцентом. З їх урахуванням було обрано спосіб виділення антибіотику із культуральної рідини разом із біомасою методом екстракції. У якості екстрагенту обрано етилацетат – органічний розчинник, що є легкозаймистою та вибухонебезпечною речовиною. Це зумовлює необхідність контролю повної герметичності апаратів при проведенні процесів екстракції та подальшої очистки екстракту. Подальше ж розділення екстракційної суміші на легку та важку фази доцільно проводити у надцентрифузі (рідинному сепараторі), бо цей апарат широко використовують при роботі з аналогічними небезпечними речовинами.

Кінцевий продукт виробництва ландоміцину А – це нестерильний кристалічний порошок буро-червоного кольору, гігроскопічний та погано розчинний у воді. Згідно з Державною Фармакопеею України, кінцевий продукт відноситься до речовин для виробництва готових лікарських засобів, що піддаються стерилізації, до яких наведено відповідні вимоги щодо мікробіологічної чистоти.

Фасування кінцевого продукту відбувається на автоматичній лінії у скляні флакони об'ємом 100 мл по 20 г порошку у кожний. Метод укупорювання – резинова пробка з алюмінієвим ковпачком.

Технологія виробництва ландоміцину А складається із наступних принципів стадій: підготовка посівного матеріалу; виробничий біосинтез; виділення та очистка антибіотику. Дані процеси представлені у графічній частині дипломної роботи на технологічній схемі виробництва ландоміцину А шляхом мікробного синтезу культурою *S.cyanogenus S136 MO19*. Апаратурне оформлення процесів представлено у графічній частині дипломної роботи на апаратурній схемі виробництва ландоміцину А.

У роботі на основі аналізу шкідливих та небезпечних виробничих факторів передбачено заходи і засоби щодо створення на даному підприємстві безпечних умов праці та пожежної безпеки.

У результаті вирішення завдань дипломного проекту, сформульовано наступні висновки:

1. Для виробництва протипухлинного антибіотику ландоміцину А обрано штам-продуцент *Streptomyces cyanogenus* S136 MO19 із біосинтетичною активністю 80-100 мкг/мл культуральної рідини та визначено культуральні, біохімічні та морфолого-фізіологічні особливості обраного штаму.

2. Наведено схему отримання промислового штаму продуценту з підвищеною біосинтетичною активністю, що базується на введенні додаткових копій гена-активатора шляхом плазмідної трансформації.

3. Встановлено особливості біохімічних процесів у клітинах продуценту, що призводять до утворення цільового продукту виробництва та проведено аналіз специфічності його дії на організм людини, що виявляється у протипухлинній активності апоптозного характеру по відношенню до клітин злоякісних пухлин.

4. На основі встановлених фізіолого-біохімічних характеристик продуценту визначені склад поживного середовища для виробничого біосинтезу цільового продукту глибинним способом та режим проведення цього процесу: температура  $28\pm^{\circ}\text{C}$ , перемішування при 200 об/хв, тривалість 48 год, аерація  $1 V_{\text{пов}}/V_{\text{ПС}} \cdot \text{хв}$ .

5. Для забезпечення належних умов виробничого біосинтезу продукту обрано та розраховано конструкцію ферментеру об'ємом  $6,3 \text{ м}^3$ , оснащеного сорочкою, відкритою турбінною мішалкою та барботером.

6. У відповідності до вимог до якості готового продукту та особливостей обраного продуценту, розроблено апаратурну та технологічну схеми виробництва протипухлинного антибіотику ландоміцину А.