

ОСОБЛИВОСТІ ВИРОБНИЦТВА ГЛІКОПЕПТИДНИХ АНТИБІОТИКІВ, ПРЕПАРАТІВ СУПРОВІДНОЇ АНТИБІОТИКОТЕРАПІЇ ІНФІКОВАНИХ ВОГНЕПАЛЬНИХ ПОРАНЕНЬ

Бучкевич І. Р., Домашовець А. О., Курка М. С.

ВСТУП

З 2014 року Україна потерпає від російської збройної агресії, яка принесла на нашу Батьківщину дуже багато страждань, болю, каліцтв та смертей. Війна стала викликом не лише для мужніх захисників, а й для медиків, які роблять все можливе і неможливе для відновлення здоров'я та реабілітації поранених.

Згідно зі статистикою 2016 року, в період ведення збройного конфлікту на Сході України, через масове використання ракетно-артилерійських систем у структурі санітарних уражень переважають осколкові поранення – 56,7%, а за анатомічною локалізацією переважають поранення кінцівок – 57,1%¹. При цьому від 50 до 75% ран ускладнюються гнійною інфекцією м'яких тканин, що зумовлює збільшення терміну стаціонарного перебування до 2,5 разів, кількості оперативних втручань (ампутацій), що призводить до збільшення глибокої інвалідазації на 5%, та випадків тимчасової трудової інвалідазації до 20%^{2,3}.

З початком повномасштабної війни в Україні у лютому 2022 року, коли кількість поранень сильно зросла перед українськими медиками постала гостра потреба в супровідній антибіотикотерапії та подолання резистентності. Адже лікування вогнепальних поранень, особливо ускладнених гнійними інфекціями часто супроводжується множинною

¹ Верба А.В. Стан та проблемні питання медичного забезпечення в зоні проведення антитерористичної операції в різні періоди. Медичне забезпечення антитерористичної операції: науково-організаційні та медикосоціальні аспекти: збірник наукових праць. За ред. акад. НАН України Цимбалюк В.І., Сердюк А.М. К: ДП «НВЦ «Пріоритети»; 2016: 15-27.

² Корольков О.І., Шевченко О.Г., Голубева І.В., Рикун М.Д. Інвалідність внаслідок порушення функції суглобів кінцівок у хворих з наслідками вогнепальних травм опорно-рухової системи. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні концепції лікування ортопедичної патології та наслідків травм опорно-рухової системи, присвяченій 20-річчю Українсько-німецької асоціації ортопедів-травматологів». II Український симпозіум з біомеханіки опорно-рухової системи. За ред. Лоскутова О.Є. Дніпро: «Ліра»; 2017: 66-7..

³ Заруцький Я.Л., Ткаченко А.Є. Особливості надання хірургічної допомоги під час антитерористичної операції. Військова медицина України. 2015 рік; 15(1): 35–40.

стійкістю до ряду антибіотиків⁴, крім того бактеріологія бойових поранень є специфічною та мінливою, а спектр резистентності постійно зростає. Окрему ланку становлять інфекції, пов'язані з протезуванням, які часто призводять до сепсису, бактеріємії та інших ускладнень.

Для подолання цих проблем доцільно ситуаційно застосовувати глікопептидні антибіотики, які вважаються антибіотиками останньої інстанції для лікування небезпечних для життя інфекцій.

З огляду на важливість даної проблематики особливістю нашого дослідження є вивчення хімічної структури глікопептидних антибіотиків (GPA), механізму дії, методики синтезу та вплив різних факторів на даний процес, спектру антибактеріальної активності, а також характеристика ринку глікопептидних антибіотиків в Україні.

1. Хімічна структура глікопептидних антибіотиків

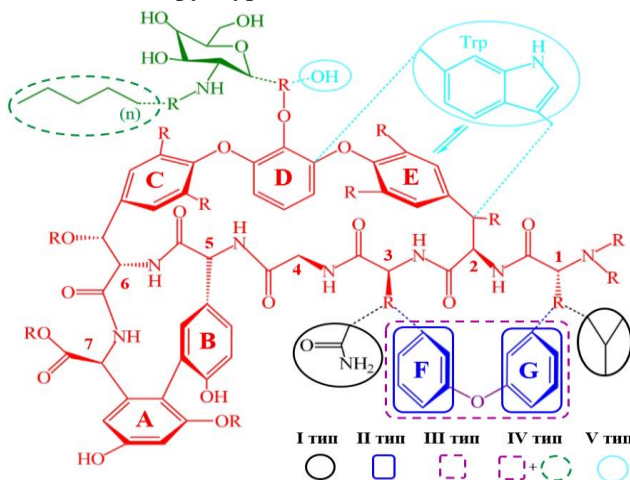


Рис. 1. Схематичне зображення GPA, згрупованих у п'ять (I – V) структурних підтипів

Глікопептидні антибіотики поділяються на п'ять окремих структурних підкласів (I–V) відповідно до замісників і типу залишків у положеннях 1 і 3

⁴ Кондратюк В. М. Мікробіологічна характеристика інфекційних ускладнень бойових поранень в різних збройних конфліктах. Український журнал медицини, біології та спорту – Том 3, № 7 (16), с. 219-226.

поліпептиду (рис. 1)⁵. GPA I типу, представлені ванкоміцином, містять 3 зшиті кільця бічного ланцюга, включаючи кільце АВ, кільце COD і кільце DOE. GPA II типу (на прикладі авопарцину) мають таку ж зшиту структуру, що й GPA типу I, на відміну від типу I, залишки AA₁ і AA₃ GPA типу II модифіковані ароматичними амінокислотами, а не аліфатичними групами. GPA III і IV типу включають додаткове зшите кільце FOG між ароматичними групами в залишках AA₁ і AA₃ порівняно з GPA типу I/II⁶. Різниця між GPA типу III і IV полягає в тому, що в структурному каркасі типу IV є замітник ацильного ланцюга, але його немає в типі III. GPA V типу містять типову триптофанову (Trp) частину, пов'язану з центральним залишком Hrg з утворенням консервативного мотиву Trp-Hrg-(m)Tyr, і зазвичай не глікозильовані⁷.

Таблиця 1

**Представники глікопептидних антибіотиків
відповідно до структурних підкласів (I–V)**

Тип GPA	Структурний мотив	Представник	Типовий мікроорганізм
I	Аліфатичні ланцюги в AA-1 і AA-3	Ванкоміцин	<i>Amycolatopsis orientalis</i>
		Хлореремоміцин	<i>Amycolatopsis orientalis</i>
		Балгіміцин	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM5908
II	Ароматичні ланцюги в AA-1 і AA-3	Авопарцин (LL-AV290)	<i>Streptomyces candidus</i> NRRL 8156
		Кератиніміцин А	<i>Amycolatopsis keratiniphila</i> NRRL B-24117
III	Тип II плюс кільце FOG	Ристоцетин А	<i>Amycolatopsis lurida</i>
		A47934	<i>Streptomyces toyocaensis</i> NRRL 15 009
IV	Тип II плюс аліфатичні бічні ланцюги цукру	Тейкопланін	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>
		A40926	<i>Nonomuraea gerenzanensis</i> ATCC 39727
V	Trp-Hrg-(m)Tyr зберіг центральний мотив	Корбоміцин	<i>Streptomyces thermotolerans</i>
		Комплестатин (хлоропептин I)	<i>Streptomyces lavendulae</i>
		Кістаміцин	<i>Nonomuraea sp.</i> ATCC 55076

⁵ Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance / Daina Zeng et al. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016 Dec 1;6(12):a026989. DOI: 10.1101/cshperspect.a026989

⁶ Elisa Binda, Flavia Marinelli, Giorgia Letizia Marcone. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance / Antibiotics (Basel). 2014, Nov 4;3(4):572-594. DOI: 10.3390/antibiotics3040572

⁷ Newest perspectives of glycopeptide antibiotics: biosynthetic cascades, novel derivatives, and new appealing antimicrobial applications / Li Tian Shi Shi Xiangmei Zhang Show et al. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023. 39(2):67. DOI: 10.1007/s11274-022-03512-0

Важливими представниками класу ГРА є ванкоміцин і ліпоглікопептид тейкопланін, а також напівсинтетичні похідні ліпоглікопептиду телаванцин, далбанцин і оритаванцин (рис. 2).

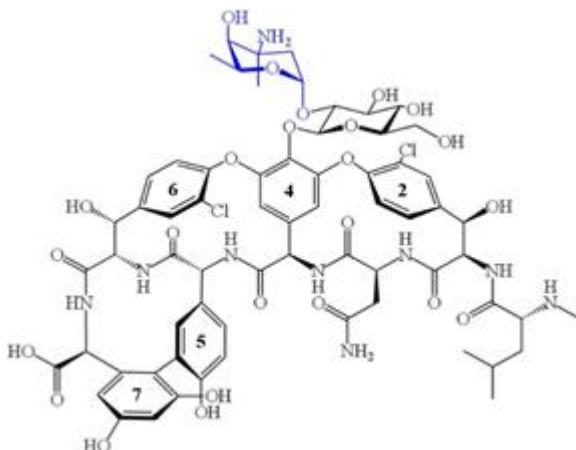


Рис. 2. Структурна формула ванкоміцину

Ванкоміцин містить два цукри і агліконовий фрагмент, утворений відносно висококонсервативним ядром гептапептиду, що містить два хлоридні замісники. Фракція аглікону відповідає за фармакологічну активність молекули, тоді як цукри регулюють його гідрофільність і схильність до утворення димерів. Завдяки своїм великим розмірам глікопептиди не здатні проникати через зовнішню мембрану грамотригативних бактерій⁸.

⁸Françoise van Bambeke, Marie-Paule, Mingeot-Leclercq, Youri Glupczynski, Paul M. Tulkens. Mechanisms of Action. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, 2017. Vol. 2, P. 1162-1180. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00137-4

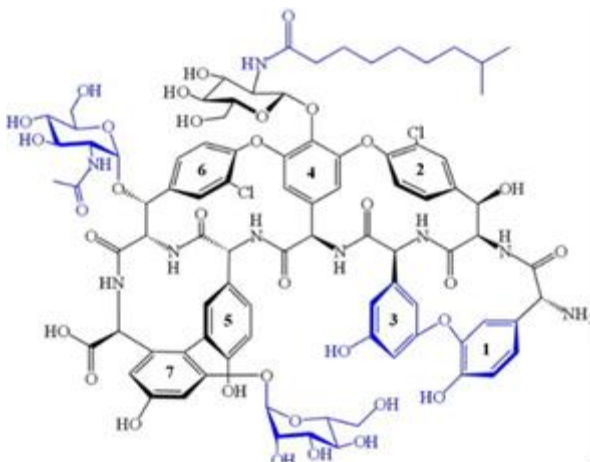


Рис. 3. Структурна формула тейкопланіну

Тейкопланін – лінійний гептапептид, що складається з трьох гідроксифенілгліцинів (ГФГ), двох дигідроксифенілгліцинів (ДГФГ) і двох тирозинів (Тир). Тейкопланін має додатковий довгий жирнокислотний ланцюг, приєднаний до цукру, приєданого до центрального 4-ГФГ. Тобто тейкопланін має типову довголанцюгову N-ацильну частину, в результаті чого тейкопланін є сумішшю п'яти споріднених похідних і не може утворювати нековалентні димери.

Оритаванцин – напівсинтетичний глікопептид, попередником якого є природний хлореремоміцин. Гептапептидні (агліконові) частини ванкоміцину, хлореремоміцину та оритаванцину ідентичні. У порівнянні з хлореремоміцином оритаванцин містить гідрофобний хлорбифенілметил бічний ланцюг, приєднаний до 4 кільцевої амінокислоти через N-заміщений аміноцукор (дисахарид).

Додавання 4'-хлорбифенілметилового замісника до дисахаридного цукру разом із додатковою моносахаридною частиною (4-епіванкозаміном), приєднаною до амінокислотного залишку на кільці 6, надає значно підвищену активність проти резистентних до ванкоміцину ентерококів, а також резистентних до ванкоміцину стафілококів.

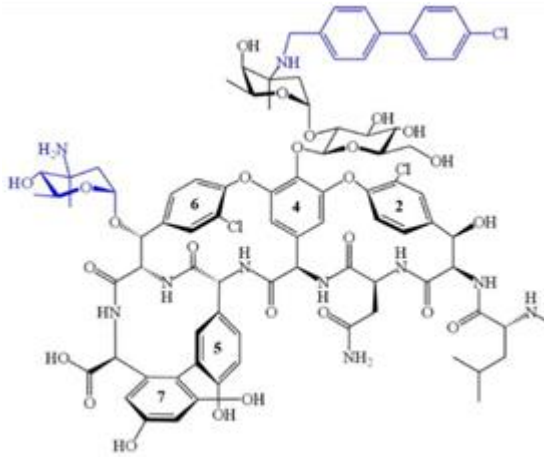


Рис. 4. Структурна формула оритаванцину

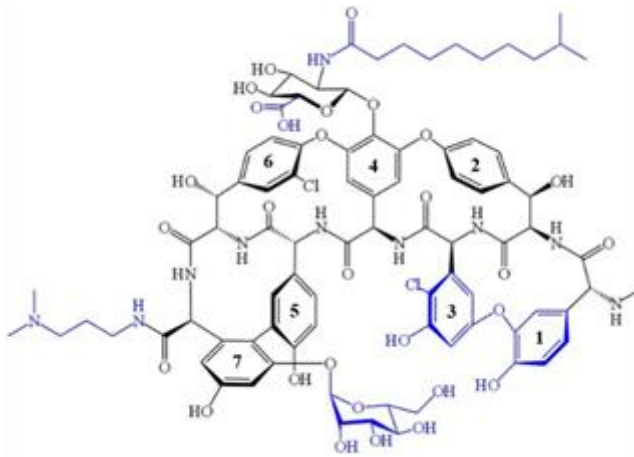


Рис. 5. Структурна формула далбаванцину

Далбаванцин – ліпоглікопептид, його хімічна структура подібна до тейкопланіну з деякими відмінностями⁹. Найважливішим доповненням

⁹ Current trends in the real-life use of dalbavancin: report of a study panel / Emanuele Durante-Mangoni et al. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020. Vol.56 (4). DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106107

до далбаванцину є розгалужений С9 ліпофільний бічний ланцюг, зв'язаний через глюкозаміновий цукор з 4 кільцевою амінокислотою. Такий бічний ланцюг дозволяє далбаванцину краще закріплюватися на мембрані бактеріальної клітини, підвищуючи його ефективність, подовжуючи його період напіврозпаду та дозволяючи збільшувати інтервали доз. Амідована карбоксильна бічна група посилює антистафілококову активність препарату¹⁰.

Телаванцин – ліпоглікопептид, отриманий з ванкоміцину шляхом додавання ліпофільного бічного ланцюга дециламінометилу та амінометилфосфонітної групи. Наявність гідрофільної [фосфометил]–амінометильної групи забезпечує сприятливий розподіл властивостей телаванцину¹¹.

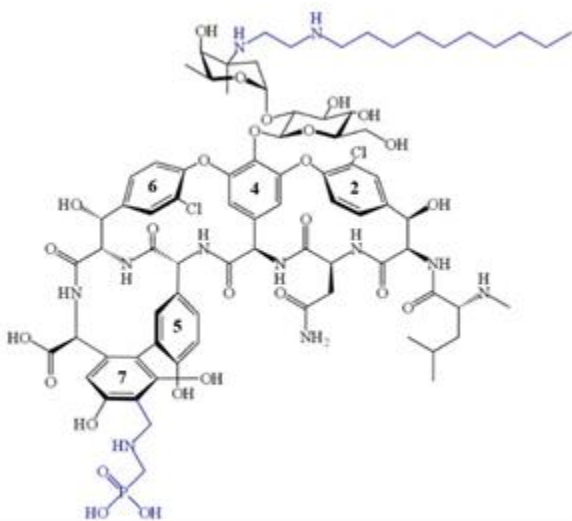


Рис. 6. Структурна формула телаванцину

Модифікація глікопептидних антибіотиків здійснюється шляхом глікозилювання, галогенування або ацилювання.

¹⁰ From Vancomycin to Oritavancin: The Discovery and Development of a Novel Lipoglycopeptide Antibiotic / *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 2012. Vol. 9 (1). P. 23-47. DOI: /10.2174/187152110790886745

¹¹ Valentin al Jalali & Markus Zeitlinger. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Telavancin Compared with the Other Glycopeptides / *Clinical Pharmacokinetics*, 2018. Vol. 57, P. 797-816. DOI: 10.1007/s40262-017-0623-4

Глікозилювання є однією з суттєвих модифікацій, які виконуються глікозилтрансферазами (ГТ) для підсилення антимікробної активності деяких GPA. Слід зазначити, що всі типи GPA модифікуються шляхом глікозилювання, за винятком GPA типу V і III типу A47934.

Зазвичай глікозилювана частина представлена звичайними цукрами, такими як D-глюкоза, D-маноза, D-арабіноза, N-ацетилглюкозамін і L-рамноза. Наприклад, GPA IV типу, включаючи тейкопланін і A40926, містять α -D-манозу. Рідше глікозилювана частина представлена такими залишками цукру, як L-ванкозамін, L-епіванкозамін, L-4-оксанкозамін, L-ристокзамін і L-актинозамін.

Галогенування також є важливою модифікацією для адаптації стабільності та активності природних GPA. Наприклад, дехлорований ванкомицин демонструє зниження антибактеріальної активності. Подібним чином, галогенування A47934 необхідне не тільки для підсилення антимікробної активності, але й для запобігання індукції механізмів резистентності у деяких патогенів. Хлорування є найпоширенішою модифікацією галогенування.

Ацилювання. Порівняно з GPA I-III типів, GPA IV типу включають модифікацію N-ліпідованого глюкозаміну, приєднаного до DO (рис. 1). Ця особливість дала початок розробки нових напівсинтетичних аналогів GPA з довгим аліфатичним ацильним бічним ланцюгом, таких як ориванцин і телаванцин.

2. Механізм дії глікопептидних антибіотиків

Глікопептиди пригнічують біосинтез пептидоглікану клітинної стінки бактерій, роблячи клітину вразливою до осмотичного тиску та автолізу. Оскільки в клітинах тварин та людей відсутній пептидоглікан, механізм дії має вибірковий цільовий характер¹².

На молекулярному рівні глікопептиди утворюють комплекс високої спорідненості з D-Ala-D-Ala шляхом встановлення водневих зв'язків через їхню агліконову частину. Міцність цього зв'язку значно посилюється при утворенні димерів або закріплення в мембрані (через замісник жирного ацильного ланцюга для тейкопланіну). Подальша стерична перешкода навколо кінців пентапептиду блокує утворення сітки з пептидоглікану шляхом інгібування активності трансглікозилас і транспептидаз. Бактерія виробляє надлишок попередників пептидоглікану, намагаючись відновити баланс утворення клітинної стінки, чим активує цикл зворотного зв'язку – утворення деградаційних

¹² Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects / Tanvir Mahtab Uddin et al. Journal of Infection and Public Health, 2021. Vol. 14, № 12. P. 1750-1766. DOI: 10.1016/j.jiph.2021.10.020

ферментів, які розщеплюють пептидоглікан¹³. Під час спроби поділу відсутність клітинної стінки призводить до того, що бактерія наповнюється рідиною з навколишнього середовища та, зрештою, руйнується¹⁴.

3. Біосинтез глікопептичних антибіотиків в лабораторних, пілотних та виробничих умовах

Ряд глікопептидних антибіотиків є продуктами біосинтезу відповідних мікроорганізмів. У результаті отримують природні антибіотики (ванкоміцин, тейкопланін) або у випадку їх подальшої модифікації – напівсинтетичні (телаванцин, далбанванцин, оригіванцин).

3.1. Виробництво ванкоміцину

Для промислового виробництва ванкоміцину використовується *Amycolatopsis orientalis* – спороутворююча мезофільна бактерія¹⁵, яку вирощують на поживних середовищах, що містять як джерело азоту аспарагін, пролін, тирозин, триамонію цитрат, гідролізат казеїну, соєву макуху, арахісове борошно, дріжджовий екстракт, паростки квасолі, сої чи гороху, відвар кукурудзи, пептони, нітрати натрію/калію/амонію (джерело макро– та мікроелементів) тощо^{16,17}; як джерело вуглецю використовують глюкозу, фруктозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, манозу, маніт, ксилозу, декстрин, крохмаль, адонітол, арабінозу, трегалозу, інозит, целобіозу, гліцерол, солодовий екстракт, мелясу, екстракт рисових чи пшеничних висівків, борошно Байра, ячмінне, рисове чи пшеничне борошно тощо¹⁸.

¹³ Scheffers D. J., Pinho M. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localizations studies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. Vol. 69(4), P. 585-607. DOI: 10.1128/membr.69.4.585-607.2005

¹⁴ Kohanski M. A., Dwyer D. J., Collins J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 2010. Vol. 8(6), P. 423-435. DOI: 10.1038/nrmicro2333

¹⁵ Database BacDive. *Amycolatopsis orientalis* M 43-05865. ID BacDive: 13215. URL: <https://bacdive.dsmz.de/strain/13215>

¹⁶ Vancomycin and method for its preparation: patent US3067099A United States: application filed 16.09.1955; application granted 04.12.1962. URL: <https://patents.google.com/patent/US3067099A/en>

¹⁷ Naga Padma, Janmejay Yadav, Adari Bhaskar Rao, Gopal Reddy. Optimization of Fermentation Conditions for Production of Glycopeptide Antibiotic Vancomycin by *Amycolatopsis orientalis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002. 102, 395-405. DOI: 10.1385/ABAB:102-103:1-6:395

¹⁸ Leman Tarhan, Hülya Ayar Kayali. Variations of vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis* depending on the glucose and glycerol concentrations as carbon sources. *Trakya Univ J Sci*, 2005. Vol. 6(2), P. 105-112. URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/213736>

Для забезпечення *Amycolatopsis orientalis* джерелами макро– та мікроелементів, а також для регулювання кислотності середовища, використовують мінеральні солі: хлорид натрію NaCl, нітрат натрію NaNO₃, сульфат амонію (NH₄)₂SO₄, сульфат магнію MgSO₄, карбонат кальцію CaCO₃, дигідрофосфат натрію NaH₂PO₄ тощо¹⁹.

При нестачі амінокислот та інших джерел азоту ріст біомаси буде обмежений, а концентрація ванкоміцину відчутно зросте лише після 48 годин в стані стаціонарної фази (рис. 7). При надлишку джерел азоту утворення ванкоміцину буде рівномірно зростати під час фази росту та досягне максимуму в стаціонарній фазі. Окрім цього, витрата фосфатів та глюкози збільшиться.

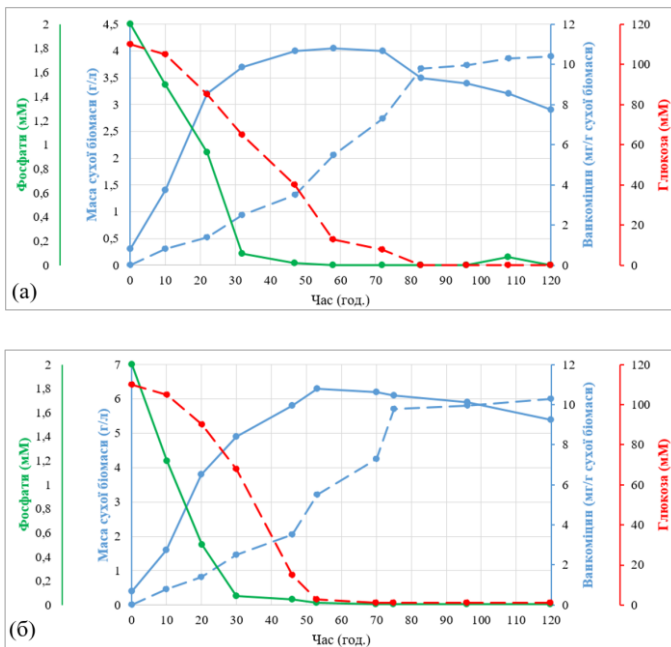


Рис. 7. Хід періоду культивування *A. orientalis* ATCC 19795 у ферментері в середовищі з амінокислотами як джерелами азоту:

(а) нестача і (б) надлишок.

**(—●—) Суха маса біомаси, (-.-●-.-) питома продукція ванкоміцину;
(—●—) концентрація фосфату; (—●—) концентрація глюкози.**

¹⁹ James J. McIntyre, Alan T. Bull, Alan W. Bunch. Vancomycin Production in Batch and Continuous Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996. Vol. 49(4), P. 412-420. DOI: 10.1002/(sici)1097-0290(19960220)49:4%3C412::aid-bit8%3E3.0.co;2-s

Оптимальна концентрація фосфату (до 2 мМ) стимулює утворення ванкоміцину та збільшення рівня біомаси. У культурах з подвоєною концентрацією амінокислот фосфати використовуються швидше. Збільшення концентрації фосфату у 2,5 рази (від 2 до 5 мМ) спричинить негативний ефект – продукування ванкоміцину припиниться.

Утворення антибіотика ванкоміцину сповільнюється порівняно з утворенням біомаси в культурі з обмеженим вмістом вуглецю та достатньою кількістю кисню ($2,0 V_{\text{пов.}}/V_{\text{серед.}}/\text{хв.}$), що відповідає типовій кінетиці виробництва вторинних метаболітів, яким є антибіотик.

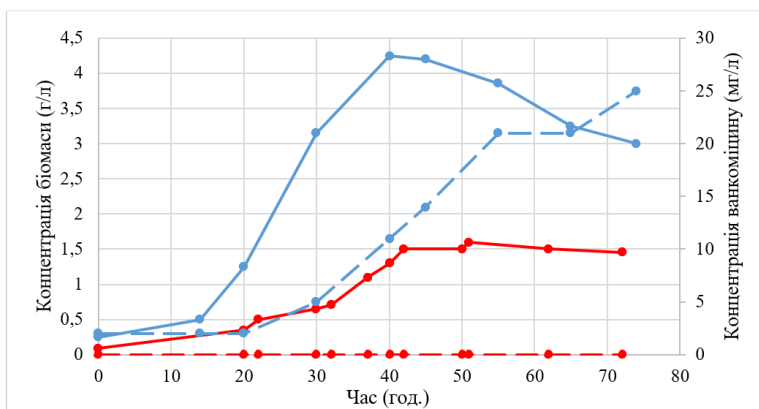


Рис. 8. Концентрація біомаси за достатньої кількості кисню (—●—) та за обмеження кількості кисню (---●---); концентрація ванкоміцину, що виробляє періодична біореакторна культура *A. orientalis*, в достатній кількості кисню (-.-●.-.) та з обмеженим вмістом кисню (-.-●.-.).

Критично важливою у виробництві антибіотика є аерація. При культивуванні *Amycolatopsis orientalis* з недостатньою аерацією ($0,5 V/V/\text{хв.}$) відбувається зниження вмісту розчиненого кисню і зниження концентрації біомаси. Ванкоміцин в таких умовах синтезуватись не буде²⁰ (рис. 8).

Для отримання максимально можливого виходу антибіотика досліджують та оптимізують умови культивування для конкретного продуцента та коригують склад поживного середовища. Після

²⁰ Gerald H. Dunstan, Claudio Avignone-Rossa, David Langley, Michael E. Bushell. The Vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen-limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000. Vol. 27(7), P. 502-510. DOI: 10.1016/s0141-0229(00)00238-6

визначення оптимальних умов процесу у лабораторії виробництво масштабують.

Amycolatopsis orientalis KCCM-10836P – мутантний штаб, отриманий з *A. orientalis* ATCC 19795 УФ-опроміненням, використовують для високопродуктивного виробництва ванкоміцину²¹.

Стадія I. Підготовка посівного матеріалу

Культури клітин зберігають в замороженому стані при – 70°C. Для приготування вегетативного посівного матеріалу використовують живильне середовище такого складу: глюкоза (17 г/л), бактопептон (11 г/л), дріжджовий екстракт (3 г/л), солодовий екстракт (3 г/л).

Спори *A. orientalis* висівають в колбу Ерленмейера об'ємом 500 мл, що містить 50 мл поживного середовища, і перемішують при 30°C протягом 48 годин.

Один мілілітр культури додають в 500-мл колбу з перегородкою, що містить 100 мл посівного середовища складу: декстрин (50 г/л), соєве борошно (5 г/л), картопляний білок (5 г/л) і культивують при 30°C і 250 об/хв протягом 60 годин. Так отримують посівний матеріал.

Стадія II. Біосинтез ванкоміцину

Посівну культуру переносять в колбу з перегородкою. Використовують середовище складу: декстрин (140 г/л), соєве борошно (30 г/л), картопляний білок (25 г/л), NaCl (1,2 г/л). 7-літровий ферментер (Kobiotech, Incheon, Корея) заповнюють 4 л середовища для біосинтезу. Температуру та рН контролюють: 34°C та 7,0 відповідно; швидкість перемішування – 500-900 об/хв, щоб концентрація розчиненого кисню (DOT) не перевищувала 20%. DOT контролюють за допомогою полярографічного електрода. Значення рН контролюють за допомогою рН-метра, використовуючи гідроксид амонію (30%). Швидкість аерації становить $1,0 V_{\text{пов.}}/V_{\text{серед.}}/\text{хв}$ під час бродіння.

Коли процес достатньо відпрацьований на лабораторному рівні, можна збільшувати масштаб синтезу антибіотика до виробничого, у даному випадку – 300-літровий та 5 000-літровий ферментер.

Для 300-літрового ферментера (KoBioTech) першу посівну культуру готують в 500-мл колбі з перегородкою таким же способом, як описано раніше. Для другої посівної культури перший посівний матеріал об'ємом 50 мл інокулюють в 7-літровій посудині, що містить 5 л середовища. Потім культуральний бульйон культивують протягом 60 годин при 30°C при 500 об/хв і $1,0 V/V/\text{хв}$. Посівний матеріал об'ємом 10 л, отриманий з двох 7-літрових ферментерів, переносять до 300-літрового ферментера,

²¹ Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis*. / Hyung-Moo et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. Vol. 77, P. 789–795. DOI: 10.1007/s00253-007-1221-4

що містить 200 л поживного середовища, з подальшим культивуванням протягом 120 годин при 34°C зі швидкістю перемішування 260–480 об/хв та 1,0 V/V/хв.

Для ферментера на 5 000 л (KoBioTech) першу та другу посівні культури готують таким самим способом, як описано вище. Для третьої посівної культури 5 л другого посіву додають до 300-л ферментера, що містить 100 л посівного середовища. Потім культуральний бульйон культивують протягом 36 год. при 30°C, при 200 об/хв і 1,0 V/V/хв. Третій посівний матеріал перенесуть у ферментер об'ємом 5000 л, що містить 2000 л середовища для виробництва, а потім культивують протягом 120 годин при 34°C зі швидкістю 130–240 обертів на хвилину з такою самою швидкістю наконечника робочого колеса до ферментатора об'ємом 7 л і 1,0 V/V/хв.

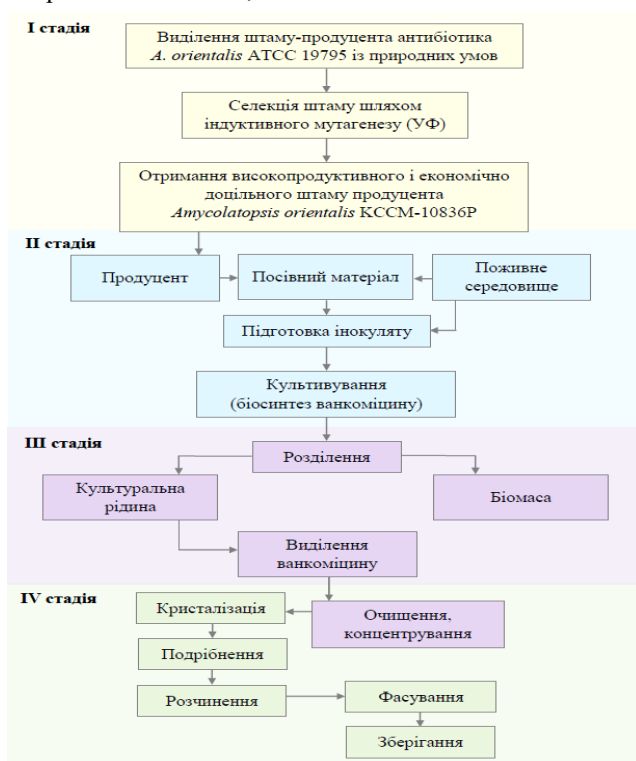


Рис. 10. Схема виробництва ванкоміцину в процесі мікробіологічного синтезу

Оціночні дані про масштабування виробництва ванкоміцину *A. orientalis* КССМ-10836Р наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Виробництво ванкоміцину в лабораторних та виробничих умовах

Ферментер	Маса сухих клітин (г/л)	Концентрація ванкоміцину (г/л)	Питомий вміст ванкоміцину (мг/г клітин продуцента)	Продуктив. утв. ванкоміцину (мг/л/год)
Лабораторний (7 л)	62.0±3.6	11.5±0.6	185.4±11.2	95.8±5.2
Пілотний (300 л)	63.5±2.9	11.2±0.5	176.3±10.8	93.3±4.9
Виробничий (5 000 л)	62.3±3.2	11.2±0.7	179.7±10.6	93.3±5.5

Стадія III та IV. Виділення антибіотика і виготовлення лікарського засобу.

Наприкінці періоду інкубації, протягом якого утворилася значна кількість антибіотика, міцелій видаляють із поживного середовища фільтрацією або центрифугуванням, а антибіотичні речовини потім виділяють із середовища шляхом адсорбції. Таким чином виділяють ванкоміцин та його органічні комплекси з солями. Очищення здійснюють екстракцією з використанням систем, що містять органічні розчинники.

3.2. Тейкопланін

Actinoplanes teichomyceticus – актинобактерія, утворює септований міцелій з довгими галузистими гіфами, утворює субстратний та повітряний міцелій. Субстратний міцелій забезпечує організм поживними речовинами, а повітряний міцелій утворює спори на спороносних гілках. Саме тут синтезуються вторинні метаболіти антибіотики²².

Для промислового виробництва тейкопланіну використовують поживні середовища, що містять різні джерела вуглецю та азоту, але дуже важливим є їх співвідношення. При використанні манози та дріжджового екстракту оптимальним співвідношенням між ними буде 6:1 (мас./мас.) з концентраціями 3% (мас./об.) і 0,5% (мас./об.) відповідно. Якщо використовувати як джерела вуглецю та азоту

²² Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives. / Jung, H.M., Jeya, M., Kim, S.Y. et al. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009, Vol. 84, P. 417–428. DOI: 10.1007/s00253-009-2107-4

мальтодекстрин (DE 14-20) та соєву макуху, співвідношення між ними повинно бути 3:1 (мас./мас.).

Дослідження кінетики процесу виробництва тейкопланіну, показало, що найкращим режимом роботи є безперервна рециркуляція клітин і низька концентрація глюкози, для запобігання інгібуючого ефекту.

Високі концентрації аміаку або фосфату знижують питому швидкість росту в першій експоненціальній фазі росту і, як наслідок, загальну продукцію тейкопланіну. Додавання каоліну (0,5% мас./об.) до середовища збільшує продукцію тейкопланіну. Подібним чином, у продуцента ванкоміцину *Amycolatopsis orientalis* обмежене використання фосфату підвищує продуктивність під час періодичної та безперервної ферментації.

Також позитивно на біосинтез тейкопланіну культурою *A. teichomyceticus* впливає додавання амінокислот – біосинтетичних попередників фрагментів жирних кислот з розгалуженим ланцюгом. Додавання 0,05% проліну збільшує вироблення тейкопланіну. L-валін покращує виробництво тейкопланіну A₂-2, а ізолеїцин або лейцин збільшують відносні виходи A₂-4 або A₂-5, відповідно. Утворення тейкопланіну A₂-1, що характеризується лінійним ацильним фрагментом C10:1, повністю залежить від присутності лінолеату в середовищі ферментації. Додавання до середовища ефірів олеїнової кислоти 2 г/л збільшує вихід A₂-3 приблизно в три рази.

A. teichomyceticus чутливий до свого власного антибіотика, що повністю пригнічує ріст мікроорганізму на ПС у концентрації 25 мг/л. *A. teichomyceticus* характеризується двома експоненціальними фазами росту, спричиненими інгібуванням росту накопиченим тейкопланіном. Якщо концентрація тейкопланіну збільшується повільно, бактерія адаптується до середовища, активуючи гени, що кодують стійкість до тейкопланіну. Якщо замість цього концентрація тейкопланіну збільшується швидко бактерії гинуть.

Стійкість культури до власного антибіотика можна регулювати за допомогою 2 підходів, що дозволяють подолати самогальмування та підвищити продуктивність під час біосинтезу тейкопланіну.

Перший підхід передбачає обробку бактеріальних клітин мутагенезом у присутності високої концентрації антибіотика, так що клітини стають толерантними до вищої концентрації ендogenous тейкопланіну. Це збільшує стійкість культури і запобігає інгібуванню росту та утворення тейкопланіну.

У другому підході тейкопланін захоплюється абсорбуючою смолою під час фази експоненціального росту, запобігаючи швидкому

накопиченню антибіотика. Це допомагає бактеріям увійти у другу фазу експоненціального росту без затримки або зменшення біомаси.

Аналіз особливостей процесу отримання тейкопланіну дозволяє оптимізувати його для *Actinoplanes teichomyceticus* BNG 2315.

Actinoplanes teichomyceticus BNG 2315 – мутантний штам; культура здатна виробляти тейкопланін більш, ніж у 60 разів ефективніше, ніж *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. ATCC 31121²³.

Стадія I. Підготовка посівного матеріалу.

A. teichomyceticus BNG 2315 вирощують в аеробних умовах у водному живильному середовищі складу: глюкоза (20 г/л), дріжджовий екстракт (4 г/л), пептон (4 г/л), KH_2PO_4 (2 г/л), K_2HPO_4 (4 г/л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 г/л). рН середовища намагаються підтримувати на рівні 7,0. Температура – 32°C. Культуру в колбі перемішують протягом 24-48 годин і далі використовують для інокуляції з кінцевою концентрацією 5-10%.

Інокулят становить 3~15%, переважно – 5%. Ферментацію проводять в аеробних умовах з перемішуванням 900 об/хв і з аерацією, що підтримується на рівні вище 30% повітряного насичення. Температуру підтримують переважно на рівні 32°C, і рН не контролюють, хоча він змінюється під час бродіння.

Для великомасштабної ферментації (5 000 л) попередні культури *Actinoplanes teichomyceticus* BNG2315 інокулюють у ферментери для посівного матеріалу (500 л), що містять 300 л стерилізованого середовища наступного складу: глюкоза (30 г/л), дріжджовий екстракт (2,5 г/л), соєве борошно (9 г/л), макуха ріпакова (9 г/л), NaCl (1,2 г/л), CaCl_2 (0,1 г/л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 г/л), CaCO_3 (5 г/л). Інкубують при 30°C протягом 48 годин, в аеробних умовах.

Стадія II. Біосинтез тейкопланіну.

Посівну культуру (300 л) інокулюють до головних ферментерів (5000 л), що містять 3000 л виробничого середовища складу: глюкоза (20 г/л), декстрин (60 г/л), дріжджовий екстракт (5 г/л), соєве борошно (18 г/л), макуха ріпакова (18 г/л), NaCl (1,2 г/л), CaCl_2 (0,1 г/л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 г/л), CaCO_3 (5 г/л).

Основну ферментацію проводять в аеробних умовах із перемішуванням 80~150 об/хв та аерацією (50~200(об/об))% об'єму середовища).

Тривалість бродіння в масштабі 5000 л відображено на рис. 11. Синтез тейкопланіну починається після завершення фази росту і вмісту

²³ Process for the production of teicoplanin: patent US7432080B2 United States: application US11/013,736 events: application granted 07.10.2008. URL: <https://patents.google.com/patent/US7432080B2/en>

залишкового загального цукру менше 30 г/л. Споживання глюкози завершується через 36 годин під час логарифмічної фази росту, а потім декстрин витрачається на ріст і синтез тейкопланіну.

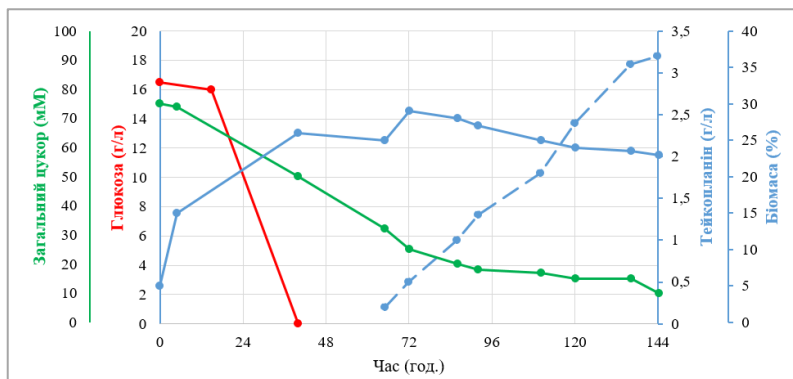


Рис. 11. Тривалість ферментації з використанням *Actinoplanes teichomyceticus* BNG 2315 в масштабі 5000 л: концентрація біомаси (—●—), тейкопланіну (-.-●-.-), загального цукру (—●—) та глюкози (—●—)

Рівень рН середовища знижується під час фази росту до рН 6,5, а потім піднімається до рН 8,0 під час продукування антибіотика. Синтез тейкопланіну продовжується лінійно до 140 годин. Максимальна концентрація тейкопланіну, продукованого мутантним штамом *A. teichomyceticus* BNG 2315 – 3,2 г/л.

3.3. Далбаванцин

Далбаванцин – напівсинтетичний антибіотик, отриманий з А40926.

Bordetella actinomycetes ATCC 39727 – продуцент А40926, аеробний нерухомий актиноміцет, який може утворювати розгалужений субстрат і повітряний міцелій^{24,25}.

Стадія I. Підготовка посівного матеріалу.

Враховуючи всі потреби культури *Bordetella actinomycetes* ATCC 39727 для отримання посівного матеріалу готують середовище

²⁴ Fermentation technique of A40926: patent CN103060405A China: application CN201110324632XA events; application granted 24.04.2013. URL: <https://patents.google.com/patent/CN103060405A/en>

²⁵ Classification of *Nonomuraea* sp. ATCC 39727, an actinomycete that produces the glycopeptide antibiotic A40926, as *Nonomuraea gerenzanensis* sp. nov. / Claudia Dalmastrri et al. International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology, 2016. Vol. 66(2). DOI: 10.1099/ijsem.0.000810

наступного складу (1 л): екстракт карнісу (0,5 %), казеїн харчовий (0,3 %), вівсяне борошно (3 %), CaCO_3 (0,4 %). Для росту культури підтримують рН 7,0 та температуру – 30°C, швидкість перемішування – 240 об./хв. Процес триває 75 год.

Тоді 5% інокуляту переносять у більшу колбу для отримання посівного матеріалу. Склад середовища залишається тим самим, проте змінюються умови: температура – нижче 28°C, швидкість перемішування – 240 об./хв. Процес триває 72 год.

Стадія II. Біосинтез A40926.

Отриманий посівний матеріал (5 % від об'єму середовища) переносять у ферментер на 50 л, що заповнений 28 л поживного середовища наступного складу (на 1 л): W-Gum (4 %), глюкоза (1 %), сахароза (2 %), соєва макуха (3 %), пептон рибного борошна (1 %), казеїн харчовий (0,4 %), валін (0,12 %), CaCO_3 (0,6 %).

Для утворення антибіотика підтримують такі параметри: температура 26°C, рН 7,0, швидкість перемішування – 240 об./хв., тиск у ферментері – 0,05 МПа, насичення розчиненим киснем (DOT) 1:1 V/V/хв. Процес триває 240 годин. Через 96 год. від її початку для кращого виходу антибіотика необхідно додати такі сполуки (на 1 л): глюкоза (1 %), пептон рибного борошна (0,5 %), валін (0,12 %).

За описаних умов концентрація антибіотика A40926, утвореного *Bordetella actinomycetes* ATCC 39727, після завершення процесу в культуральній рідині становитиме 720 мг/л.

Стадія хімічної модифікації

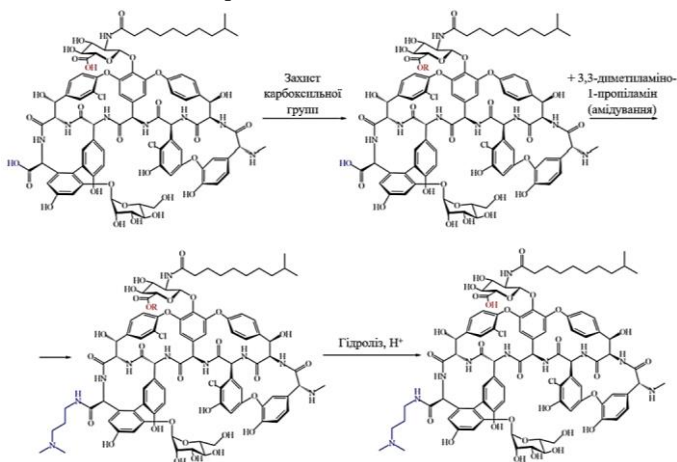


Рис. 12. Схема синтезу далбаванцину з A40926

Після виділення А40926 з культуральної рідини для отримання далбаванцину антибіотик піддають хімічним модифікаціям за схемою, описаною на рис. 12.

Отриманий синтетичною обробкою далбаванцин виділяють та додатково очищають²⁶.

3.4. Оритаванцин

Оритаванцин – напівсинтетичний антибіотик, похідний природного антибіотика хлореремоміцину (А82846В). Продуцент – *Nocardia orientalis*²⁷.

Для промислового виробництва хлореремоміцину в основному використовують *N. orientalis* NRRL 18098, NRRL 18099 і NRRL 18100.

Слід зазначити, що інокуляція великих резервуарів споровою формою мікроорганізму спричиняє затримку виробництва, тому краще використовувати вегетативний інокулят.

Стадія I. Підготовка посівного матеріалу.

Культуру *Nocardia orientalis* NRRL 18098 у вигляді ліофілізованої гранули або суспензії, витриманої в рідкому азоті, використовують для інокуляції посівного середовища наступного складу (на 1 л): глюкоза (1 %), крохмаль (2 %), дріжджовий екстракт (0,5 %), гідролізат казеїну (0,5 %), CaCO₃ (0,1 %), рН середовища доводять до 7,5 за допомогою NaOH до стерилізації. Інокуляційну культуру вирощують на агаризованому середовищі (2,5% агару) в чашках або на скошених середовищах. Інкубація проходить при 30°C протягом 10-14 днів. Зрілу скошену культуру зішкрябають стерильним інструментом та використовують для інокуляції 10 мл посівного середовища першої стадії. Отриманий інокулят вносять у 40 мл середовища, культивують при температурі 30°C протягом 24-48 годин, швидкість перемішування – 250 об/хв. Для отримання посівного матеріалу 40 мл отриманої культуральної рідини переносять в 1 л поживного середовища такого ж складу (30°C, 48 год., 250 об/хв).

Стадія II. Біосинтез А82846.

1 л отриманого посівного матеріалу переносять у 100 л стерильного виробничого середовища наступного складу (рН 7,5): глюкоза (2,5 %), соєве борошно (1,5 %), картопляний декстрин (3,0 %), CaCO₃ (0,25 %), меляса (0,3 %), гідролізат казеїну (0,5 %). До середовища додають

²⁶ A kind of preparation method of Dalbavancin: patent CN109467592A China; application CN201811219413.3A events, application granted 15.03.2019. URL: <https://patents.google.com/patent/CN109467592A/en>

²⁷ Vancomycin and method for its preparation: patent US3067099A United States; application US534666A events; application granted 04.12.1962. URL: <https://patents.google.com/patent/US5312738A/en>

піногасник Р-2000 (0,3 г/л). Виробниче середовище залишають для бродіння у ферментері (165-л) з перемішуванням протягом 90-100 годин при температурі 30°C. Рівень розчиненого кисню – більше 50% насичення, контролюють за допомогою перемішування (80 об/хв).

Стадія III. Виділення антибіотика.

A82846 виділяють з відфільтрованого бульйону різними методами. Методика передбачає доведення відфільтрованого бульйону до рН 7 і його адсорбування на катіонообмінній смолі (наприклад Dowex XF5-43278, Dowex-50 або Amberlite IR-120). Активний матеріал елюють зі смоли відповідним розчинником (наприклад, розбавлений розчин NH₄OH). Потім активну фракцію концентрують у вакуумі, адсорбують на макроретикулярній смолі (наприклад Diaion HP-20 і Amberlite XAD-4) та елюють відповідним розчинником (вода:ізопропанол (95:5), що містить 1% оцтової кислоти)²⁸.

Стадія хімічної модифікації

Після виділення A82846В з культуральної рідини та відокремлення його від домішок для отримання оритаванцину антибіотик піддають хімічній модифікації. Оритаванцин синтезується шляхом додавання 4-(4-хлорфеніл)бензильної групи до хлореремоміцину шляхом відновного алкілювання²⁹.

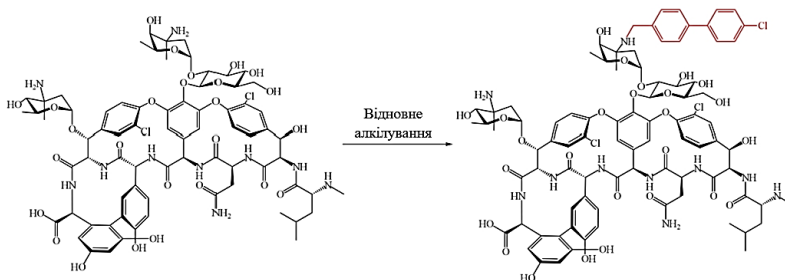


Рис. 13. Схема синтезу оритаванцину з A82846В

3.5. Телаванцин

Телаванцин – напівсинтетичний антибіотик, що є похідним ванкомицину. Дециламіноетильний бічний ланцюг забезпечує покращену афінність зв'язування з проміжними продуктами

²⁸ Enhancement of A82846B yield and proportion by overexpressing the halogenase gene in *Amycolatopsis orientalis* SIP118099. / Wei-Yan Wang et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018. Vol. 102, P. 5635–5643. DOI: 10.1007/s00253-018-8983-8

²⁹ Process for preparing glycopeptide phosphonate derivatives: patent US20080227963A1 United States; application US11/977,436 events; application granted 18.09.2008. URL: <https://patents.google.com/patent/US20080227963>

пептидоглікану, що містять D-Ala-D-Ala, а негативно заряджена частина фосфонової кислоти збільшує екскрецію цієї сполуки з сечею³⁰.

Телаванцин отримують з *N*-дециламіноетилванкоміцину шляхом регіоселективного відновного алкілювання азоту ванкозаміну³¹.

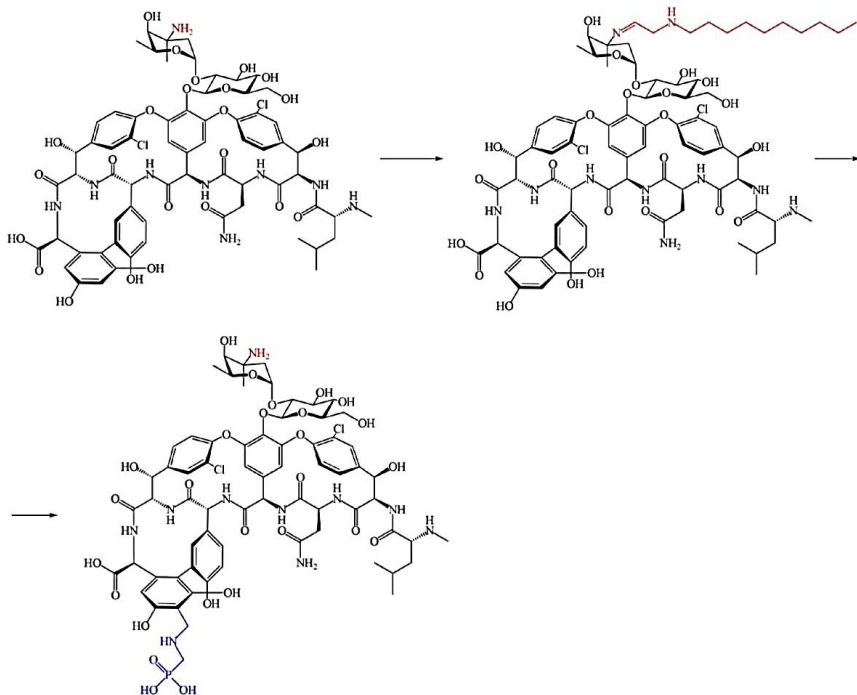


Рис. 14. Схема синтезу телаванцину

³⁰ Stefano Biondi, Elena Chugunova, Mauro Panunzio. Chapter 8 – From Natural Products to Drugs: Glyco- and Lipoglycopeptides, a New Generation of Potent Cell Wall Biosynthesis Inhibitors, 2016. Vol. 50, P. 249-397. DOI: 10.1016/B978-0-444-63749-9.00008-6

³¹ Process for the synthesis of telavancin, its pharmaceutically acceptable salts as well as an *n*-protected imine-derivative of telavancin: patent W020013034676A1 WIPO (PCT); application PCT/EP2012/067491 events; application granted URL: 14.03.2013. <https://patents.google.com/patent/WO2013034676A1/en>

Таблиця 3

**Умови біосинтезу природніх антибіотиків
та їх напівсинтетичних похідних**

	Ванкоміцин	Тейкопланін	Далбаванцин	Оритаванцин	Телаванцин
Антибіотик	Природний	Природний	Напівсинтетич.	Напівсинтетич.	Напівсинтетич.
Попередник	–	–	A40926	A82846	ванкоміцин
Продуцент	<i>Amycolatopsis orientalis</i> KCCM-10836P	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i> BNG 2315	<i>Bordetella actinomycetes</i> ATCC 39727	<i>Amycolatopsis orientalis</i> NRRL 18098	<i>Amycolatopsis orientalis</i> KCCM-10836P
Середовище	декстрин, соєве борошно, картопляний білок, NaCl	глюкоза, декстрин, дріжджовий екстракт, соєве борошно, макуха ріпакова, NaCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , CaCO ₃	глюкоза, сахароза, соєва макуха, пептон, казеїн, валін, CaCO ₃	глюкоза, крохмаль, дріжджовий екстракт, гідролізат казеїну, CaCO ₃	декстрин, соєве борошно, картопляний білок, NaCl
Культурал. умови	34°C, pH 7,0 500-900 об./хв. DOT 20-30% 1:1 V/V/хв.	34°C, pH 7,0 DOT 20-30%	26°C, pH 7,0 240 об./хв. 1:1,2 V/V/хв.	30°C, pH~7,0 250 об./хв.	34°C, pH 7,0 500-900 об./хв. DOT 20-30% 1:1 V/V/хв.
Фактори впливу на вихід продукту	Фосфати, низький рівень аерації – негативно	Додавання L-валіну – позитивно. Фосфати, висока концентрація продукту – негативно	Додавання поживних речовин (через 96 год.) – позитивно	-	Фосфати, низький рівень аерації – негативно

4. Спектр антибактеріальної активності

Глікопептиди вважаються антибіотиками останньої інстанції для лікування небезпечних для життя інфекцій, спричинених відповідними грампозитивними мікроорганізмами. Ванкоміцин і тейкопланін представляють перше покоління клінічно важливих GPA. Вони є натуральними продуктами.

Бактерицидна активність ванкоміцину проти клінічно значущих патогенів *Staphylococcus*, *Streptococcus* та *Enterococcus*, а також багатьох дрібніших видів призвела до збільшення поширеності його використання, але разом з цим сприяла набуттю резистентності.

Крім того, ванкоміцин є достатньо токсичним, що заважає його використанню для лікування хворих у тяжкому стані. Як альтернативу ванкоміцину використовують тейкопланін. Перевагою тейкопланіну в порівнянні із ванкоміцином – є міцний зв'язок з білками сироватки крові (більше 70%) та має досить тривалий період напіврозпаду в сироватці (понад 50 год). Тейкопланін застосовується у боротьбі проти важких інфекцій, що викликають *Staphylococcus spp.*, включаючи метицилін-стійкі штами, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Peptostreptococcus spp.*, *Corynebacterium jeikeium*, *Propionibacterium acnes*, *Clostridium spp.*, *C. difficile*.

Телаванцин (vibativ) відрізняється від ванкоміцину додаванням гідрофобної та гідрофільної групи до структури ванкоміцину. Гідрофільні властивості фосфонатної групи покращують адсорбцію, розподіл, метаболізм і профіль виведення сполуки. Фармакологічні дослідження показують, що посилена активність телаванцину у порівнянні з ванкоміцином щодо *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (меншою мірою) і ентерококів є результатом складного механізму дії, який включає порушення синтезу ліпідів і, можливо, руйнування мембрани.

Оритаванцин (oribactiv) має загальний спектр активності, який можна порівняти з спектром ванкоміцину, але він має значні переваги щодо внутрішньої активності (особливо проти стрептококів) і залишається нечутливим до розвитку механізмів резистентності стафілококів і ентерококів; він також активний проти *Clostridium difficile*. Підвищена активність проти грампозитивних патогенів, у тому числі резистентних до ванкоміцину, зумовлена механізмом подвійної дії, який або пригнічує біосинтез клітинної стінки, або впливає на цілісність мембрани.

Далбаванцин (dalvance) демонструє підвищену активність *in vitro* порівняно з ванкоміцином щодо більшості грампозитивних патогенних бактерій, а також надзвичайно довгий період напіврозпаду, що дозволяє вводити його внутрішньовенно раз на тиждень. Він використовується для лікування таких небезпечних інфекцій, як метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA) і метицилінрезистентний *S. epidermidis* (MRSE). На даний момент клінічні дослідження показують, що далбаванцин є одним із антибіотиків, які мають найсильнішу активність проти MRSA та MRSE і не спричиняють значної небажаної реакції, що обмежує дозу.

5. Аналіз ринку глікопептидних антибіотиків в Україні та в світі

Таблиця 4

Препарати глікопептидних антибіотиків в Україні та світі

Препарат	Склад	Лікарська форма	Ефективність	Виробник	Ціна/ флакон	
Ванкоміцин-Фармекс	Ванкоміцину гідрохлорид, NaOH/HCl	Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 500 мг	Особливо ефективний відносно: – стафілококів, включаючи <i>S. aureus</i> та <i>S. epidermidis</i> (включаючи метицилінрезистентні штами); – стрептококів, включаючи <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. bovis</i> , групи гемолітичних стрептококів, <i>S. pneumoniae</i> (включаючи пеніцилінрезистентні штами); – <i>C. difficile</i> (у тому числі токсигенних штамів – збудників псевдомембранозного ентероколіту); – дифтеріодів. До ванкоміцину <i>in vitro</i> чутливі <i>Listeria monocytogenes</i> , види <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Clostridium</i> та <i>Bacillus</i> . Ванкоміцин неактивний <i>in vitro</i> відносно грамнегативних бактерій, грибів та мікобактерій.	Фармекс Груп ТОВ (Україна)	149-179 грн.	
Ванкоміцин-Віста		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 1000 мг		– стафілококів, включаючи <i>S. aureus</i> та <i>S. epidermidis</i> (включаючи метицилінрезистентні штами);	Vefa Ilac Sanayi Ve Ticaret (Туреччина)	267-328 грн.
Ванкоміцин-Віста		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 500 мг		– стрептококів, включаючи <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. bovis</i> , групи гемолітичних стрептококів, <i>S. pneumoniae</i> (включаючи пеніцилінрезистентні штами);	Тева (Угорщина)	143-237 грн.
Ванкоміцин-Тева		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 1000 мг		– <i>C. difficile</i> (у тому числі токсигенних штамів – збудників псевдомембранозного ентероколіту);	Тева (Угорщина)	275-345 грн.
Ванкоміцин-Тева		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 500 мг		– дифтеріодів.	Тева (Угорщина)	179-182 грн.
Ванкоміцин-Тева		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 1000 мг		До ванкоміцину <i>in vitro</i> чутливі <i>Listeria monocytogenes</i> , види <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Clostridium</i> та <i>Bacillus</i> . Ванкоміцин неактивний <i>in vitro</i> відносно грамнегативних бактерій, грибів та мікобактерій.	Анфарм Хелас (Греція)	299 грн.
Ванкоміцин-Вокате		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 500 мг		До ванкоміцину <i>in vitro</i> чутливі <i>Listeria monocytogenes</i> , види <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Clostridium</i> та <i>Bacillus</i> . Ванкоміцин неактивний <i>in vitro</i> відносно грамнегативних бактерій, грибів та мікобактерій.	ВЕМ ІЛІАЧ САН ВЕ ТІК А.С. (Туреччина)	178 грн.
Ванкован		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 1000мг			580-626 грн.	
Тейкопланін-Фармекс	Тейкопланін, NaCl	Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 400 мг	Зазвичай чутливі види мікроорганізмів: – аеробні грампозитивні бактерії <i>C. jejuni</i> ; – <i>E. faecalis</i> ; – <i>S. aureus</i> (включаючи метицилінрезистентні штами); – <i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> підвид <i>equisimilis</i> ; – стрептококи групи C & G, <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , стрептококи групи <i>viridans</i> , <i>C. difficile</i> ; – бактерії роду пептострептококів. Тейкопланін неактивний проти грамнегативних бактерій, кламідій, мікоплем.	Фармекс Груп ТОВ (Україна)	446-511 грн.	
Таргоцид®		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 400 мг		– аеробні грампозитивні бактерії <i>C. jejuni</i> ;	Санофі-Авенгіс (Україна)	від 669 грн.
Гіптейк		Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 400 мг		– <i>E. faecalis</i> ; – <i>S. aureus</i> (включаючи метицилінрезистентні штами); – <i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> підвид <i>equisimilis</i> ; – стрептококи групи C & G, <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , стрептококи групи <i>viridans</i> , <i>C. difficile</i> ; – бактерії роду пептострептококів. Тейкопланін неактивний проти грамнегативних бактерій, кламідій, мікоплем.	ARTERIUM (Україна)	445-509 грн.
Dalvance®	Далванацин гідрохлорид, моногідрат лактози, маніт, NaOH/HCl	Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 500 мг	Чутливі грампозитивні мікроорганізми: – <i>S. aureus</i> (включаючи MSSA та MRSA); – <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> ; – група <i>S. anginosus</i> (включаючи <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i>) і <i>E. faecalis</i> (штами, чутливі до ванкоміцину).	Actavis Group (Ісландія)	\$1828-5479	
ORVASTIV®	Оритаванцин, 200 мг манітолу, фосфорна к-та.	Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 400 мг	Активний проти грампозитивних бактерій: – <i>S. aureus</i> (включаючи MRSA); – <i>S. agalactiae</i> , група <i>S. anginosus</i> (включає <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> і <i>S. constellatus</i>), <i>S. dysgalactiae</i> ; – <i>S. pyogenes</i> , <i>E. faecalis</i> (тільки ізоляти, чутливі до ванкоміцину); У серійних дослідженнях резистентність до оригванацину спостерігалася в ізолятах <i>S. aureus</i> і <i>E. faecalis</i> . У клінічних дослідженнях резистентності до оригванацину не спостерігалася.	Melinta Therapeutics, LLC (США)	\$3569-6980	
VIBATIV®	Телаванцину гідрохлорид, гідроксипро-палабгедекс, манітол	Ліоф. д/р-ну д/інф. фл. 750 мг	До телаванцину чутливі: – стафілококи, такі як <i>S. aureus</i> (MSSA та MRSA), <i>S. epidermidis</i> , стрептококи, включаючи <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. constellatus</i> , – ентєрококи, які чутливі до ванкоміцину: <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , – зварєробні грампозитивні бактерії <i>Clostridium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Propionibacterium</i>	Hospira inc (США)	\$601-643	

ВИСНОВКИ

Ряд глікопептидних антибіотиків є продуктами біосинтезу відповідних мікроорганізмів. У результаті отримують природні антибіотики (ванкоміцин, тейкопланін) або у випадку їх подальшої модифікації – напівсинтетичні (телаванцин, далбаванцин, оритаванцин).

Для промислового виробництва важливим завданням є оптимізація усіх параметрів процесу: склад поживного середовища, температура, рН, швидкість перемішування, аерація. Середовища для культивування підбирають індивідуально для кожного продуцента. Вони повинні містити в собі джерела вуглецю, азоту, а також різні мікро- і макроелементи. Важливим завданням є інтеграція лабораторного процесу в промисловий. Коли процес достатньо відпрацьований на лабораторному рівні, можна збільшувати масштаб синтезу антибіотика до виробничого, слід зазначити, що інокуляція великих резервуарів споровою формою мікроорганізму спричиняє затримку виробництва, тому краще використовувати вегетативний інокулят.

Ванкоміцин і тейкопланін представляють перше покоління клінічно важливих GPA. Вони є натуральними продуктами. Оритаванцин і телаванцин є напівсинтетичними GPA другого покоління, що належать до сімейства ванкоміцинів. Далбаванцин є напівсинтетичним похідним тейкопланіноподібного A40926.

В Україні ринок глікопептидних антибіотиків представлений різноманітними препаратами ванкоміцину та тейкопланіну: Ванкоміцин-Фармекс, Ванкоміцин-Віста, Ванкоміцин-Тева, Ванкоміцин-Фокате, Ванкован та Тейкопланін-Фармекс, Таргоцид, Глітейк відповідно. Антибіотики таких виробників, як Фармекс Груп ТОВ (Україна), Vefa Ilac Sanayi Ve Ticaret (Туреччина) та ARTERIUM (Україна) достатньо поширені на українському ринку. Далбаванцин, оритаванцин та телаванцин, на жаль, на ринку України не представлені.

АНОТАЦІЯ

В умовах війни в Україні лікування вогнепальних поранень, особливо ускладнених гнійними інфекціями стало рутинним завданням медиків, процес ускладнюється множинною стійкістю до ряду антибіотиків, а також специфічною та мінливою бактеріологією бойових поранень. Окрему ланку становлять інфекції, пов'язані з протезуванням, які часто призводять до сепсису, бактеріємії та інших ускладнень. Для подолання цих проблем доцільно ситуаційно застосовувати глікопептидні антибіотики, які вважаються антибіотиками останньої інстанції для лікування небезпечних для життя інфекцій.

З огляду на важливість даної проблематики особливістю нашого дослідження є вивчення хімічної структури глікопептидних антибіотиків (GRA), механізму їх дії, біосинтезу в лабораторних, пілотних та виробничих умовах та впливу супровідних факторів на процеси їх культивування.

Наведено етапи виробництва основних представників даного класу антибіотиків: ванкоміцин, тейкопланін, далбаванцин, оритаванцин та телаванцин. Представлено аналіз та характеристику ринку глікопептидних антибіотиків в Україні.

Література

1. Верба А.В. Стан та проблемні питання медичного забезпечення в зоні проведення антитерористичної операції в різні періоди. Медичне забезпечення антитерористичної операції: науково-організаційні та медикосоціальні аспекти: збірник наукових праць. За ред. акад. НАН України Цимбалюк В.І., Сердюк А.М. К: ДП «НВЦ «Пріоритети»; 2016: 15-27.

2. Корольков О.І., Шевченко О.Г., Голубева І.В., Рикун М.Д. Інвалідність внаслідок порушення функції суглобів кінцівок у хворих з наслідками вогнепальних травм опорно-рухової системи. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні концепції лікування ортопедичної патології та наслідків травм опорнорухової системи, присвяченій 20-річчю Українсько-німецької асоціації ортопедів-травматологів». II Український симпозіум з біомеханіки опорно-рухової системи. За ред. Лоскутова О.Є. Дніпро: «Ліра»; 2017: 66-7.

3. Заруцький Я.Л., Ткаченко А.Є. Особливості надання хірургічної допомоги під час антитерористичної операції. Військова медицина України. 2015 рік; 15(1): 35–40.

4. Кондратюк В. М. Мікробіологічна характеристика інфекційних ускладнень бойових поранень в різних збройних конфліктах. Український журнал медицини, біології та спорту – Том 3, № 7 (16), с. 219-226

5. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance / Daina Zeng et al. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016 Dec 1;6(12):a026989. DOI: 10.1101/cshperspect.a026989

6. Elisa Binda, Flavia Marinelli, Giorgia Letizia Marcone. Old and New Glycopeptide Antibiotics: Action and Resistance / Antibiotics (Basel). 2014, Nov 4;3(4):572-594. DOI: 10.3390/antibiotics3040572

7. Newest perspectives of glycopeptide antibiotics: biosynthetic cascades, novel derivatives, and new appealing antimicrobial applications / Li Tian Shi

Shi Xiangmei Zhang Show et al. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023. 39(2):67. DOI: 10.1007/s11274-022-03512-0

8. Françoise van Bambeke, Marie-Paule, Mingeot-Leclercq, Youri Glupczynski, Paul M. Tulkens. Mechanisms of Action. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, 2017. Vol. 2, P. 1162-1180. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00137-4

9. Current trends in the real-life use of dalbavancin: report of a study panel / Emanuele Durante-Mangoni et al. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020. Vol.56 (4). DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106107

10. From Vancomycin to Oritavancin: The Discovery and Development of a Novel Lipoglycopeptide Antibiotic / Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 2012. Vol. 9 (1). P. 23-47. DOI: /10.2174/187152110790886745

11. Valentin al Jalali & Markus Zeitlinger. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Telavancin Compared with the Other Glycopeptides / Clinical Pharmacokinetics, 2018. Vol. 57, P. 797-816. DOI: 10.1007/s40262-017-0623-4

12. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects / Tanvir Mahtab Uddin et al. *Journal of Infection and Public Health*, 2021. Vol. 14, № 12. P. 1750-1766. DOI: 10.1016/j.jiph.2021.10.020

13. Scheffers D. J., Pinho M. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localizations studies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005. Vol. 69(4), P. 585-607. DOI: 10.1128/mmbr.69.4.585-607.2005

14. Kohanski M. A., Dwyer D. J., Collins J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*, 2010. Vol. 8(6), P. 423-435. DOI: 10.1038/nrmicro2333

15. Database BacDive. *Amycolatopsis orientalis* M 43-05865. ID BacDive: 13215. URL: <https://bacdive.dsmz.de/strain/13215>

16. Vancomycin and method for its preparation: patent US3067099A United States: application filed 16.09.1955; application granted 04.12.1962. URL: <https://patents.google.com/patent/US3067099A/en>

17. Naga Padma, Janmejy Yadav, Adari Bhaskar Rao, Gopal Reddy. Optimization of Fermentation Conditions for Production of Glycopeptide Antibiotic Vancomycin by *Amycolatopsis orientalis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002. 102, 395-405. DOI: 10.1385/ABAB:102-103:1-6:395

18. Leman Tarhan, Hülya Ayar Kayali. Variations of vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis* depending on the glucose and glycerol concentrations as carbon sources. *Trakya Univ J Sci*, 2005. Vol. 6(2), P. 105-112. URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/213736>

19. James J. McIntyre, Alan T. Bull, Alan W. Bunch. Vancomycin Production in Batch and Continuous Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 1996. Vol. 49(4), P. 412-420. DOI: 10.1002/(sici)1097-0290(19960220)49:4%3C412::aid-bit8%3E3.0.co;2-s
20. Gerald H. Dunstan, Claudio Avignone-Rossa, David Langley, Michael E. Bushell. The Vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen-limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000. Vol. 27(7), P. 502-510. DOI: 10.1016/s0141-0229(00)00238-6
21. Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis*. / Hyung-Moo et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. Vol. 77, P. 789-795. DOI: 10.1007/s00253-007-1221-4
22. Biosynthesis, biotechnological production, and application of teicoplanin: current state and perspectives. / Jung, HM., Jeya, M., Kim, SY. et al. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009, Vol. 84, P. 417-428. DOI: 10.1007/s00253-009-2107-4
23. Process for the production of teicoplanin: patent US7432080B2 United States; application US11/013,736 events; application granted 07.10.2008. URL: <https://patents.google.com/patent/US7432080B2/en>
24. Fermentation technique of A40926: patent CN103060405A China; application CN201110324632XA events; application granted 24.04.2013. URL: <https://patents.google.com/patent/CN103060405A/en>
25. Classification of *Nonomuraea sp.* ATCC 39727, an actinomycete that produces the glycopeptide antibiotic A40926, as *Nonomuraea gerenzanensis sp. nov.* / Claudia Dalmasi et al. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 2016. Vol. 66(2). DOI: 10.1099/ijsem.0.000810
26. A kind of preparation method of Dalbavancin: patent CN109467592A China; application CN201811219413.3A events, application granted 15.03.2019. URL: <https://patents.google.com/patent/CN109467592A/en>
27. Vancomycin and method for its preparation: patent US3067099A United States; application US534666A events; application granted 04.12.1962. URL: <https://patents.google.com/patent/US5312738A/en>
28. Enhancement of A82846B yield and proportion by overexpressing the halogenase gene in *Amycolatopsis orientalis* SIPI18099. / Wei-Yan Wang et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018. Vol. 102, P. 5635-5643. DOI: 10.1007/s00253-018-8983-8
29. Process for preparing glycopeptide phosphonate derivatives: patent US20080227963A1 United States; application US11/977,436 events;

application granted 18.09.2008. URL: <https://patents.google.com/patent/US20080227963>

30. Stefano Biondi, Elena Chugunova, Mauro Panunzio. Chapter 8 – From Natural Products to Drugs: Glyco– and Lipoglycopeptides, a New Generation of Potent Cell Wall Biosynthesis Inhibitors, 2016. Vol. 50, P. 249-397. DOI: 10.1016/B978-0-444-63749-9.00008-6

31. Process for the synthesis of telavancin, its pharmaceutically acceptable salts as well as an n-protected imine-derivative of telavancin: patent WO20013034676A1 WIPO (PCT); application PCT/EP2012/067491 events; application granted URL: 14.03.2013. <https://patents.google.com/patent/WO2013034676A1/en>

Information about authors:

Buchkevych Iryna Romanivna,

Candidate of Chemical Sciences,

Associate Professor at the Department of Technology of Biologically
Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

Lviv Polytechnic National University

12, S. Bandery Str., Lviv, 79013, Ukraine

Domashovets Anhelina Oleksandrivna,

Student of the Specialty «Biotechnology and bioengineering»

Lviv Polytechnic National University

12, S. Bandery Str., Lviv, 79013, Ukraine

Kurka Mariia Severynivna,

Candidate of Chemical Sciences,

Associate Professor at the Department of Technology of Biologically
Active Substances, Pharmacy and Biotechnology

Lviv Polytechnic National University

12, S. Bandery Str., Lviv, 79013, Ukraine