

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Факультет біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(ім'я та прізвище)
«_08_» грудня 2025р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(ім'я та прізвище)
«_08_» грудня 2025р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

освітньо-професійної програми «Промислова та фармацевтична біотехнологія»

на тему: Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протипухлинних засобів

Виконав: здобувач II курсу, групи ПФБ-2-1М

ВЕРБІЯН Володимир Михайлович
(прізвище, ім'я, по-батькові повністю)

_____ (підпис)

Керівник СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна
(прізвище, ім'я, по-батькові повністю)

_____ (підпис)

Консультанти

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

_____ (прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент

Юрій КУТОВИЙ
(ім'я та прізвище)

_____ (підпис)

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

Здобувач _____ (підпис)

Київ - 2025 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова та фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНІКОВ

“01” жовтня 2025 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

ВЕРБІЯНА Володимира Михайловича

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протиракулинних засобів

керівник роботи СКРОЦЬКА Оксана Ігорівна, к.б.н., доцент,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 05.11.2025 року № 912-кв

2. Строк подання здобувачем роботи 26.11.2025 р.

3. Вихідні дані до роботи

Біологічний агент - *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Цільовий продукт біосинтезу – наносфери людського феритину

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Реферат, Вступ, Літературний огляд, Техніко-економічне обґрунтування, Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу, Опис технологічної схеми післяферментаційних стадій виробництва феритину, Технологічні особливості отримання готового продукту, Контроль виробництва, Проект заявки на корисну модель.

5. Перелік графічного матеріалу
Технологічна схема (формат А1, 1 аркуш), апаратурна схема (формат А1, 1 аркуш).

6. Консультанти розділів роботи

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

7. Дата видачі завдання 01 жовтня 2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Літературний огляд	01.10.25 – 12.10.25	
2	Техніко-економічне обґрунтування	13.10.25 – 26.10.25	
3	Обґрунтування вибору стадій технологічного процесу	13.10.25 – 26.10.25	
4	Опис технологічної схеми післяферментаційних стадій виробництва феритину	13.10.25 – 26.10.25	
5	Технологічні особливості отримання готового продукту	27.10.25 – 09.11.25	
6	Контроль виробництва	27.10.25 – 09.11.25	
7	Проект заявки на корисну модель	27.10.25 – 09.11.25	
8	Оформлення графічної частини	10.11.25 – 16.11.25	
9	Оформлення презентації	17.11.25 – 26.11.25	
10	Оформлення пояснювальної записки	17.11.25 – 26.11.25	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Володимир ВЕРБІЯН

(ім'я та прізвище)

Оксана СКРОЦЬКА

(ім'я та прізвище)

ABSTRACT

This work is devoted to the development of an antitumor drug based on recombinant human ferritin nanocages as a means of targeted delivery of chemotherapeutic agents in order to increase their effectiveness and reduce side effects. The work includes a literature review, which reviews information from actual scientific literature on the properties of ferritin nanocages, their possible producers and biosynthesis conditions, the potential for use as a means of targeted delivery of antitumor agents, as well as analogues of ferritin nanocages that can be used for target therapy of cancer diseases; design of an industrial production site for the isolation and purification of ferritin nanospheres, as well as the development of the final form of the drug and the design of its production processes based on the ferritin nanocages.

During the work, an antitumor ferritin-doxorubicin complex was developed, containing components in a ratio of 2 g of ferritin to 1 g of doxorubicin.

The work consists of 95 pages, 14 tables, 7 figures and 70 references.

Keywords: nanocages, ferritin, oncology, targeted delivery

РЕФЕРАТ

Дану роботу присвячено розробці протипухлинного препарату на основі наносфер рекомбінантного людського феритину в якості засобу цільової доставки хіміотерапевтичних речовин з метою підвищення їх ефективності та зниження побічної дії. Робота включає в себе літературний огляд, в якому розглядається інформація з сучасної наукової літератури щодо властивостей наносфер феритину, можливих його продуцентів та умов біосинтезу, потенціалу використання в якості засобу цільової доставки протипухлинних речовин, а також аналогів наносфер феритину, що можуть використовуватися для таргентної терапії онкологічних захворювань; проектування ділянки промислового виробництва для виділення та очищення наносфер феритину, а також розробку кінцевої форми лікарського засобу та проектування процесів її виробництва на основі отриманого цільового продукту.

В ході роботи було розроблено розчин для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу, що містить компоненти у співвідношенні 2 г феритину на 1 г доксорубіцину.

Робота складається з 95 сторінок, 14 таблиць, 7 рисунків і 70 літературних джерел.

Ключові слова: Наносфери, феритин, онкологія, цільова доставка

ЗМІСТ

ВСТУП	9
ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД. БІОСИНТЕЗ ФЕРИТИНУ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ЦІЛЬОВОЇ ДОСТАВКИ ПРОТИПУХЛИННИХ СПОЛУК	
РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ ФЕРИТИНУ	11
1.1. Природні продуценти феритину.....	11
1.2. Рекombінантні продуценти феритину.....	13
1.3. Обґрунтування вибору біологічного агента.....	16
1.4. Аналіз умов біосинтезу феритину	21
1.5. Аналіз умов виділення та очищення феритину	23
РОЗДІЛ 2. СТВОРЕННЯ ПРОТИПУХЛИННИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ФЕРИТИНУ	25
2.1. Принцип дії феритину як засобу цільової доставки протиракових речовин	25
2.2. Порівняння феритину з існуючими аналогами.....	26
2.3. Самозбирання, саморозбирання і перезбирання феритинових наносфер	29
2.4. Включення діючої речовини у феритинові наносфери	32
2.5. Протиракові речовини, що потенційно можуть бути включені в наносфери феритину	37

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Підп.</i>	<i>Дата</i>	<i>Рекombінантні феритини у нанобіотехнологіях протиракових засобів</i>			
<i>Розроб</i>	<i>Вербіан В.М.</i>				<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>	
<i>Перевірив</i>	<i>Скороцька О.І.</i>					6	95	
<i>Консульт.</i>					ЗМІСТ			<i>Кафедра БТМ</i>
<i>Н. контр</i>								
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	42
3.1. Характеристика біотехнологічного продукту	42
3.2. Потреба у цільовій продукції	43
3.3. Розрахунок річної потужності виробництва	46
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	49
4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання феритину	49
4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях	51
4.3. Специфікація обладнання	56
РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА ФЕРИТИНУ	60
РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ	65
6.1. Обґрунтування вибору кінцевої форми випуску та упаковки лікарського засобу	65
6.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу	66
6.3. Матеріальний розрахунок на серію виробництва розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу	68
6.4. Специфікація обладнання для одержання розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу	70

6.5. Опис технологічної схеми виробництва розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу	73
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	75
7.1. Методи контролю виробництва розчину наносфер феритину	75
7.2. Методи контролю розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу	76
РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ. СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФЕРИТИНУ З КЛІТИН БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА <i>ESCHERICHIA COLI</i>	79
8.1. Галузь і застосування корисної моделі	79
8.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки	79
8.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення	80
8.4. Опис запропонованого способу	80
8.5. Формула корисної моделі	81
8.6. Реферат	81
ВИСНОВКИ	82
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	83
ДОДАТКИ	93

ВСТУП

У сучасному світі однією з найбільших загроз життю та здоров'ю людини є онкологічні захворювання. За статистикою ВООЗ за 2022 рік виявлено близько 20 млн нових випадків раку, що став причиною 9,7 мільйонів смертей – третє місце серед причин смерті (World Health Organization). Згідно НКРУ (Національний канцер-реєстр України) у 2023 році кількість вперше зареєстрованих випадків захворювання на злоякісні новоутворення склала 122842 осіб, кількість зареєстрованих смертей 44523 осіб, перебуває на диспансерному обліку 1112748 осіб.

На даний момент існують і активно застосовуються у медицині хіміотерапевтичні препарати на основі речовин, що мають протипухлинну дію, але їх ефективність поки що недостатня. Крім того, хіміотерапія також має значну негативну побічну дію на організм в цілому. Причина цього в тому, що хіміотерапевтичні препарати накопичуються не тільки раковими клітинами, а й здоровими клітинами організму, на які вони чинять цитотоксичну дію (Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022; Botlagunta et al., 2016; Kciuk et al., 2023; Meredith, & Dass, 2016). Тож, для підвищення ефективності та зниження побічної дії необхідна цільова доставка протипухлинних речовин до ракових клітин. На даний момент в якості носіїв для цільової доставки протипухлинних речовин науковцями розглядаються різні речовини, в тому числі феритин (Crich et al., 2015; Monti, Ferraro, & Merlino, 2019; Mohanty, Parida, Raut, & Behera, 2022; Buranrat, & Connor, 2015; Li et al., 2019; Turiel-Fernández et al., 2020; Deng et al., 2023).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Підп.</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>				<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протипухлинних засобів</i>	<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Скроцька О.І.</i>						9	95
<i>Консульт.</i>					ВСТУП	<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

На даний час зниження побічної дії протипухлинних речовин за рахунок цільової доставки наносферами феритину експериментально доведено на лабораторних тваринах. Так, при цільовій доставці наносферами феритину доксорубіцину побічна дія знижувалася в чотири рази відносно нативного доксорубіцину (Fan et al., 2018).

Актуальність даної роботи пов'язана зі значною поширеністю онкологічних захворювань та летальністю від них, недостатньою ефективністю та безпекою класичних хіміотерапевтичних методів їх лікування, а отже потребою в підвищенні ефективності та зниженні побічної дії протипухлинних препаратів.

Новизна даної роботи полягає в оптимізації процесів виділення та очищення феритину за рахунок використання тепла, яке виділяється під час дезінтеграції клітин продуцента для досягнення температури, необхідної для теплового шоку (осадження супутніх білків), що забезпечує більшу енергоефективність та економічну рентабельність виробництва.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД
БІОСИНТЕЗ ФЕРИТИНУ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЙОГО
ВИКОРИСТАННЯ ДЛЯ ЦІЛЬОВОЇ ДОСТАВКИ ПРОТИПУХЛИННИХ
СПОЛУК

РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ ФЕРИТИНУ

1.1. Природні продуценти феритину

Феритин належить до суперсімейства феритинових білків, що присутні у широкому спектрі організмів і виконують ключову роль у зберіганні заліза та захисті клітин від окисного стресу (Plays, Müller, & Rodriguez, 2021). У тварин, включно з людиною, класичні феритини (Ftn) складаються з важкого (H-chain) та легкого (L-chain) ланцюгів. Сироватковий феритин переважно походить із макрофагів і секретується некласичним шляхом (Li, Zhang, & Knez, 2016). Крім того, у людини існують спеціалізовані форми, такі як мітохондріальний феритин. У наукових дослідженнях поширеним джерелом є феритин селезінки коня (Mohanty, Parida, Raut, & Behera, 2022).

У рослин феритини також належать до класичних Ftn, проте мають низку унікальних ознак, зокрема транзитний пептид, що забезпечує їхнє транспортування до пластид, та розширювальний пептид, характерний для рослинних форм. Феритини були ідентифіковані у багатьох видів, серед яких *Arabidopsis thaliana* (чотири гени феритину), *Vigna unguiculata*, кукурудза, горох (*Pisum sativum*), люпин жовтий (*Lupinus luteus*), соя та тютюн (*Nicotiana tabaccum*). У багатьох із цих рослин синтез феритину регулюється рівнем заліза (Masuda et al., 2007).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пізн.</i>	<i>Дата</i>					
<i>Розроб</i>	<i>Верб'ян В.М.</i>				<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протиракових засобів</i>		<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Скроцька О.І.</i>								11
<i>Консульт.</i>					РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ ФЕРИТИНУ		<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>									
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>								

Серед прокариотів феритиноподібні білки також широко поширені. До суперсімейства належать класичні феритини (Ftn), бактеріоферитини (Bfr), що містять гем і зустрічаються виключно у прокариотів, а також білки Dps – ДНК-зв'язувальні білки клітин. Особливою групою є інкапсульовані феритини, нещодавно виявлені у бактерій та архей. Серед конкретних прикладів описано феритин А (EcFtnA) з *Escherichia coli* та феритин гіпертермофільних архей *Pyrococcus furiosus* (Sato, 2016; Mohanty, 2022).

Узагальнені дані щодо природних джерел феритину наведені у табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Природні джерела феритину

Джерело феритину	Тип феритину (субодиниці)	Використання	Джерело
Людина			
Людина	H-феритин (HF _n / HuHF) та L-феритин (FL / FTL)	HF _n має внутрішню спорідненість до TfR-1 (рецептор трансферину 1); високі рівні експресії в багатьох пухлинних клітинах	Liu et al., 2024
Сироватка крові	Феритин (Serum ferritin)	Використовується як маркер запальних захворювань	Plays, Müller, & Rodriguez, 2021
Тварини			
Кінь	Апоферитин селезінки коня	Інкапсуляція протиракових препаратів на основі платини	Mohanty, Parida, Raut, & Behera, 2022
Щур	HF _n (Rat HF _n)	Використовується в наноносіях (фотосенсибілізатори ZnF16pc)	Deng et al., 2023
Миша	H- та L-феритин	Вивчення експресії H- та L-феритину	Fan et al., 2018
Рослини			
Соя	H- та L-субодиниці (soybean ferritin subunits)	Регуляція транскрипції генів феритину залізом у клітинних культурах сої	Masuda et al., 2007
Горох	Феритин	Дослідження накопичення та деградації феритину	
Кукурудза	Феритин	Регуляція генів	
Тютюн	Феритин	Накопичення заліза	
Прокариоти			
<i>Escherichia coli</i>	EcFtnA (Ferritin A)	EcFtnA формує кліткоподібну структуру з 24 субодиниць	Sato et al., 2016
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Бактеріоферитин (Bfr)	Депонування та детоксикація заліза	Mohanty, Jena, & Behera, 2021
<i>Listeria innocua</i>	Додекамерний феритин	Захист ДНК від оксидативного пошкодження	
Гіпертермофільні архей <i>Pyrococcus furiosus</i>	Archaea Ftn	Зберігає іони заліза у мінералізованій формі всередині білкової капсули	Mohanty, Parida, Raut, & Behera, 2022

Отже, феритини є універсальними біологічними наноконтейнерами, присутніми у трьох доменах життя – тварин, рослин та прокаріотів. Їхня фундаментальна функція полягає у накопиченні заліза та забезпеченні антиоксидантного захисту, що робить їх невід’ємним компонентом клітинного метаболізму і гомеостазу. Але масова частка феритину у нормальній прокаріотичній клітині не перевищує 0,1% від сумарного білка, в еукаріотичній – ці значення ще нижчі (Plays, Müller, & Rodriguez, 2021).

З цього випливає, що отримання феритину за допомогою нерекомбінантного продуцента не є раціональним, тож необхідним є використання рекомбінантних біологічних агентів, що мали б економічно рентабельні показники синтезу феритину.

1.2. Рекомбінантні продуценти феритину

Феритин може бути отриманий за допомогою різних рекомбінантних біологічних агентів: зокрема науковцями створено рекомбінантні штами бактерії *Escherichia coli*, здатні синтезувати людський легколанцюговий (L-chain) (Zou et al., A, 2016), людський важколанцюговий (H-chain) (Zou et al., B, 2016), а також штами, здатні синтезувати соєвий феритин (Dong et al., 2008).

Існують різні різновиди феритину, які потенційно можуть бути застосовані в медицині як носій лікарських речовин. Людський феритин буває легколанцюговим (L-chain) і важколанцюговим (H-chain), крім того потенційно у фармації можуть використовуватись бактеріальний феритин, соєвий феритин та дріжджовий феритин.

У дослідженні (Zou et al., A, 2016) науковці створили рекомбінантний штами *Escherichia coli* BL21(DE3), шляхом введення в клітину даної бактерії рекомбінантної плазмиди pET-28a-rLF, що сконструйована інтеграцією в бактеріальну плазмиду pET-28a гену, виділеного з культури людських клітин легеневої аденокарциноми (A549), що відповідає за синтез легколанцюгового

феритину. В результаті рекомбінантний штам синтезував 10 мг/л легколанцюгового людського феритину.

У дослідженні (Zou et al., В, 2016) вчені створили рекомбінантний штам *Escherichia coli* BL21(DE3) шляхом введення в клітину даної бактерії рекомбінантної плазмиди рЕТ-28а-rHF, яка була сконструйована інтеграцією в бактеріальну плазмиду рЕТ-28а гену, виділеного з культури людських клітин легеневої аденокарциноми (A549), що відповідає за синтез важколанцюгового феритину. В результаті рекомбінантний штам синтезував 15 мг/л важколанцюгового людського феритину.

Також на даний час створено рекомбінантні штами дріжджів, що потенційно можуть бути використані для промислового виробництва феритину, такі як рекомбінантний штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, здатний синтезувати соєвий феритин (De Llanos et al., 2016) завдяки інтеграції в його геном векторів р416ADH, р416TEF, р416GPD, SFerH2, р413ADH, р413TEF, р413GPD, виділених з геному сої (*Glycine max*) і рекомбінантний штам дріжджів *Pichia pastoris* – надсинтетик природного для даного біологічного агента дріжджового феритину (Duman-Özdamar, & Binay, 2021).

Крім того, за допомогою перенесення генно-модифікованим бацикловірусом гену бактерії *Helicobacter pylori*, відповідального за синтез феритину, створено рекомбінантну культуру клітин комах *Spodoptera frugiperda* (Sf9) – продуцента бактеріального феритину (Qu et al., 2020; Masuda et al., 2007). Для підвищення ефективності синтезу феритину був виділений негемовий залізовмісний ген феритину з бактерії *Helicobacter pylori* (реєстраційний номер GenBank NP_223316) з точковою мутацією (N19Q), що забезпечує надсинтез феритину. В результаті генно-модифіковані клітини комах *Spodoptera frugiperda* (Sf9) синтезували 11,25 мг/л феритину (Qu et al., 2020).

Враховуючи той факт, що біологічні агенти, які можуть бути використані як продуценти феритину, мають різну ефективність синтезу феритину та умови

культивування, для промислового біосинтезу необхідно обрати такий біологічний агент, який би синтезував максимальну кількість феритину за найменший час культивування, на максимально недорогому середовищі.

Порівняння умов культивування, способу генетичної модифікації та продуктивності біосинтезу феритину різних біологічних агентів наведено у табл. 1.2.

Таблиця 1.2.

Порівняння умов культивування та продуктивності біосинтезу феритину різних біологічних агентів

Біологічний агент	Генетична модифікація	Продукт	Умови культивування	Кінцева концентрація феритину	Джерело
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)*	Рекомбінантна плазмідна рЕТ-28a-rLF, сконструйована інтеграцією в бактеріальну плазмідну рЕТ-28a гену виділеного з культури людських клітин легеневої аденокарциноми (A549), що відповідає за синтез L-chain феритину.	Людський L-chain феритин	Середовище – LB, культивують 16 год при t=37 °C. При OD=6 вносять тетрациклін для активації шаперонів, а через 30 хв вносять IPTG, після чого культивують 5 год при t=37 °C.	10 мг/л	Zou et al., A, 2016
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)*	Рекомбінантна плазмідна рЕТ28a-rHF, сконструйована інтеграцією в бактеріальну плазмідну рЕТ-28a гену виділеного з людських культури клітин легеневої аденокарциноми (A549), що відповідає за синтез H-chain феритину.	Людський H-chain феритин	Середовище – LB, культивують 16 год при t=37 °C. При OD=6 вносять тетрациклін для активації шаперонів, а через 30 хв вносять IPTG, після чого культивують 5 год при t=37 °C.	15 мг/л	Zou et al., B, 2016

Біологічний агент	Генетична модифікація	Продукт	Умови культивування	Кінцева концентрація феритину	Джерело
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) insect cells*	Негемовий залізовмісний ген феритину виділений з бактерії <i>Helicobacter pylori</i> (реєстраційний номер GenBank NP_223316) з точковою мутацією (N19Q), що забезпечує надсинтез феритину був вірізаний ендонуклеазою і вставлений в генوم бацикловірусу, яким інфікували клітин комах <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9).	Феритин бактерій	72 год на Sf-900™ III SFM-середовищі при t=27 °C	11,25 мг/л	Qu et al., 2020
<i>Pichia pastoris</i> *	Надсинтез феритину	Дріжджовий феритин	t=35°C	9,5 мг/л	Duman-Özdamar, & Binay, 2021
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	Вектори p416ADH, p416TEF, p416GPD, SFerH2, p413ADH, p413TEF, p413GPD виділені з геному сої (<i>Glycine max</i>) інтегрували в геном <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Соевий феритин	t=30°C на SC середовищі	9,58 мг/л	De Llanos et al., 2016

Примітки:

* - штамп, на основі якого створено рекомбінантний штамп - продуцент феритину

IPTG - Ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид, індуктор синтезу білка

1.3. Обґрунтування вибору біологічного агента

Як показують дані, наведені у табл. 1.3, *Escherichia coli* BL21(DE3) та клітини комах *Spodoptera frugiperda* (Sf9) мають співвідносні показники синтезу, тож, для вибору найбільш економічно вигідного біологічного агента необхідно порівняти вартість поживних середовищ, на яких ростуть продуценти феритину, і, відповідно, умовну вартість 1 мг феритину.

Особливості біосинтезу феритину різними продуцентами

Біологічний агент	Склад поживного середовища	Тривалість культивування, год	Кінцева концентрація феритину, мг/л	Джерело
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pET-28a-rLF	Триптон - 10 г/л, Натрій хлорид (NaCl) - 10 г/л Дріжджовий екстракт - 5 г/л Магній сульфат – 1 г/л Глюкоза – 10 г/л	21	10	Zou et al., A, 2016
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) pET28a-rHF	Триптон - 10 г/л, Натрій хлорид (NaCl) - 10 г/л Дріжджовий екстракт - 5 г/л Магній сульфат – 1 г/л Глюкоза – 10 г/л	21	15	Zou et al., B, 2016
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) insect cells	Sf-900™ III SFM	72	11.25	Qu et al., 2020
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-аргініну моногідрохлорид - 0,02 г/л L-аспарагінової кислоти мононатрій гідрат - 0,1 г/л L-глутамінової кислоти моногідрат натрію - 0,1 г/л L-Ізолейцин - 0,03 г/л L-лізину монохлорид - 0,03 г/л L-фенілаланін - 0,05 г/л L-серин - 0,375 г/л L-треонін - 0,2 г/л L-тирозин - 0,03 г/л L-Валін - 0,15 г/л бурштинова кислота (C ₄ H ₆ O ₄) – 10 г/л гідроксид натрію (NaOH) – 6 г/л сульфат амонію (NH ₄) ₂ SO ₄ – 5 г/л	72	9.58	De Llanos et al., 2016

Як показують дані, наведені у табл. 1.4, середовище LB (MacWilliams, & Liao, 2006; Pioli, 2019), на якому росте *Escherichia coli* BL21(DE3), значно дешевше, ніж середовище Sf-900™ III SFM, яке необхідне для культивування клітин *Spodoptera frugiperda* (Sf9).

Таблиця 1.4.

Вартість поживних середовищ для культивування продуцентів феритину

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація компонента, г/л	Ціна компонента, грн/г	Вартість компонента, грн/л	Джерело інформації*
<i>Escherichia coli</i> <i>BL21(DE3)</i>	Триптон	10	3,3	33	1
	Натрій хлорид	10	0,013	0,13	2
	Дріжджовий екстракт	5	0,994	4,97	3
	Магній сульфат	1	0,01	0,01	4
	Глюкоза	10	0,082	0,82	5
Вартість 1л середовища – 38,93 грн					
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) insect cells	Sf-900™ III SFM		2920,70 грн		6
Вартість 1л середовища – 2920,70 грн					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-аргініну моногідрохлорид	0,02	78,54	1,57	7
	L-аспарагінової кислоти моонатрій гідрат	0,1	0,88	0,09	8
	L-глутамінової кислоти моногідрат натрію	0,1	0,099	0,01	9
	L-Ізолейцин	0,03	130,76	3,92	10
	L-лізину монохлорид	0,03	56,97	1,71	11
	L-фенілаланін	0,05	59,28	2,96	12
	L-серин	0,375	83,60	31,35	13
	L-треонін	0,2	101,96	20,39	14
	L-тирозин	0,03	50,25	1,51	15
	L-Валін	0,15	109,79	16,47	16
	бурштинова кислота	10	0,143	1,43	17
	гідроксид натрію	6	0,175	1,05	18
	сульфат амонію	5	0,052	0,26	19
	Вартість 1л середовища – 82,72 грн				

Примітка. * - ціни наведено станом на 2025 р

- 1) https://agrovektor.com/physical_product/684884-pepton-fermentativnyy-rm1892-himedia-500-g.html
- 2) <https://fozzyshop.ua/sol-kamennaya/111737-sol-kamennaya-kukhonnaya-4820267700019.html>
- 3) <https://sweet-factory.com.ua/ua/p1731194535-drozhzhevoj-ekstrakt-marmite.html>
- 4) <https://flagma.ua/uk/sulfat-magniya-magniy-sernokisly-semivodny-o3592164.html>
- 5) <https://prom.ua/ua/p2178570122-glyukoza-poroshok.html>
- 6) <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12658019>
- 7) <https://shop.hlr.ua/ua/l-arginin-monogidrohlorid-dlya-biohimii-99-250-g-234928.html>
- 8) <https://prom.ua/ua/p617627067-asparaginovaya-kislota-asp.html>
- 9) <https://tov-srp.com/product/glutamat-natriya/>
- 10) <https://shop.hlr.ua/ua/l-izoleycin-dlya-biohimii-500-g-235987.html>
- 11) <https://shop.hlr.ua/ua/l-lizin-monogidrohlorid-dbiohimii-100-g-233860.html>
- 12) <https://shop.hlr.ua/ua/l-fenilalanin-985-thermo-fisher-scientific-500-g-241776.html>
- 13) <https://shop.hlr.ua/ua/l-serin-99-thermo-fisher-scientific-500-g-241987.html>
- 14) <https://shop.hlr.ua/ua/l-treonin-98-thermo-fisher-scientific-100-g-242104.html>
- 15) <https://shop.hlr.ua/ua/l-tirozin-99-thermo-fisher-scientific-100-g-242212.html>
- 16) <https://shop.hlr.ua/ua/l-valin-99-thermo-fisher-scientific-25-g-242236.html>
- 17) https://growglobal.com.ua/ua/p1991467176-yantarnaya-kislota-25kg.html?gad_source=1&gclid=CjwKCAiAudG5BhAREiwAWMISjIgdQhQR3qEQO6yXZJqdgMBWQ1y8mN_br1DDKb2bQlstUnhVJ_o3zBoCLvkQAvD_BwE
- 18) <https://lab-kremovara.com.ua/gidroksid-natriyu-naon-kaustichna-soda-yidkiy-natriy-lug>
- 19) https://pai.in.ua/products/sulfat-amoniyu-25kg-tara-vid-1kg?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=P_Max_%D0%94%D0%91%D0%A0_%D0%94%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B8%D0%B2%D0%B0_%D0%A1%D0%B8%D0%BF%D1%83%D1%87%D1%96_%D0%B4%D0%BE%D0%B1%D1%80%D0%B8%D0%B2%D0%B0&utm_term=&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAudG5BhAREiwAWMISjEei7YNeeG_F8_HDr-OuKITAn70H6uZMpjQ7tJKE67mliq_wHq1XCRoCjQYQAvD_BwE

Дані, наведені в табл. 1.5., однозначно доводять, що умовна вартість 1 мг феритину, синтезованого *Escherichia coli* BL21(DE3) (2,60 грн/мг), значно нижча, ніж синтезованого *Saccharomyces cerevisiae*, а тим паче синтезованого клітинами *Spodoptera frugiperda* (Sf9), тоді як ефективність синтезу (кількість феритину синтезованого за 1 год) – значно вища (0,714 мг/год).

Escherichia coli BL21(DE3) з рекомбінантною плазмідною рЕТ28а-rHF має більшу ефективність синтезу, ніж модифікація цього ж штаму з рекомбінантною плазмідною рЕТ-28а-rLF.

Отже, *Escherichia coli* BL21(DE3) має найвищу ефективність синтезу та найнижчу умовну вартість 1 мг феритину, отже, це найбільш економічно рентабельний продуцент феритину.

Таблиця 1.5.

Умовна вартість 1 мг феритину

Біологічний агент	Кінцева концентрація феритину, мг/л	Тривалість культивування, Год	Ефективність синтезу, мг/год	Вартість 1л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 мг феритину, грн/мг
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) рЕТ-28а-rLF	10	21	0,476	38,93	3,89
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) рЕТ28а-rHF	15	21	0,714	38,93	2,60
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9) insect cells	11.25	72	0,156	2920,70	259,62
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9.58	72	0,133	82,72	8,63

В результаті порівняння інформації щодо умов культивування біологічного агента та кінцевої концентрації феритину з наукових статей, найбільш оптимальний продуцент для масштабного промислового біосинтезу

феритину – рекомбінантний штам *Escherichia coli*, а саме *Escherichia coli* BL21(DE3) з рекомбінантною плазмідною рЕТ28а-rHF. Цей продуцент має найбільш високі показники синтезу цільового продукту.

До того ж *Escherichia coli* - найбільш досліджені організми для генетичної модифікації. Вони ростуть на відносно дешевому поживному середовищі LB. Також очевидною перевагою *Escherichia coli* є невелика тривалість культивування (21 год), що значно менше, ніж клітин комах чи дріжджів (72 год).

1.4. Аналіз умов біосинтезу феритину

Біосинтез рекомбінантного феритину є високо контрольованим процесом, який зазвичай здійснюють при використанні генетично модифікованих мікроорганізмів. Умови цього процесу поділяють на два основні етапи: експресію та внутрішньоклітинну збірку білкових субодиниць, а також пост-біосинтетичні умови, що пов'язані з навантаженням лікарських засобів та модифікацією наноконтейнерів. Найпоширенішим рекомбінантним продуцентом феритину є бактерії *Escherichia coli*, які використовують як для отримання гомополімерних феритинових наночастинок, так і для створення гетерогенних білкових платформ. Для експресії рекомбінантного феритину у клітини *E. coli* вводять відповідні конструкції на основі експресійних векторів, наприклад, рТ7-7-huHF(+/+). Це дає можливість отримувати як немодифіковані форми феритину, так і генетично інженерні варіанти, зокрема HuHF із вставленими пептидами для таргетування клітин або для специфічного протеолітичного розщеплення (Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022). Використання інструментарію синтетичної біології, такого як Ferritin Assembly Toolbox System (FATS), забезпечує точний контроль над внутрішньоклітинною збіркою різних субодиниць і дозволяє створювати гібридні наноконтейнери у бактеріальній цитоплазмі (Liu et al., 2024).

Рекомбінантні клітини *Escherichia coli* культивують у ферментері приблизно 16 год за аеробних умов при температурі 37 °C з метою накопичення

біомаси. При досягненні значення оптичної густини $OD = 0.6$, при довжині хвилі 600, що свідчить про кінець логарифмічної і початок стаціонарної фази, вводиться тетрациклін (ТЕТ) (20 нг/л) для активації шаперонів, а через 30 хв індуктор синтезу Ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид (IPTG) (1мМ), після чого культивування триває ще 5 годин за тієї ж температури (Zou et al., B, 2016).

Під час експресії більшість рекомбінантного HuHF у клітинах *E. coli* накопичується у розчинній формі, яка природно здатна до самозбірки в 24-мерні наночастинки, подібні до нативної структури феритину. Для легкого ланцюга феритину (rhFTL), який зазвичай утворює тільки включення, розроблені ефективні стратегії перетворення цих агрегованих форм на однорідні та правильно зібрані наночастинки (Song et al., 2022).

Після виділення апоферитину (порожньої білкової капсули) проводять пост-біосинтетичне навантаження лікарських речовин. Найпоширеніший метод ґрунтується на контрольованому розбиранні наночастинки та подальшій її повторній збірці. Розбирання здійснюють або за допомогою екстремальних значень рН, або із застосуванням денатуруючих агентів, таких як 8 М сечовина, що особливо ефективно для інкапсуляції доксорубіцину. Для препаратів платини чи фотосенсибілізаторів використовують рН-опосередковане розбирання та рекомбінацію. Повторну збірку проводять поступовим зниженням концентрації сечовини або шляхом відновлення фізіологічного рН; зазвичай цей процес триває близько однієї години (Liang et al., 2014).

Концентрація білка та лікарського засобу істотно впливає на ефективність інкапсуляції. Наприклад, для цисплатину оптимальною виявилася комбінація 10 мг/мл феритину та 1 мг/мл цисплатину (Turiel-Fernández, Blanco-González, Corte-Rodríguez, Bettmer, & Montes-Bayón, 2020). Генетично модифіковані субодиниці феритину також можуть містити пептидні мітки для специфічного розпізнавання клітин або послідовності, що розщеплюються ендосомальними протеазами, забезпечуючи контрольоване

вивільнення терапевтичних агентів у пухлинному мікросередовищі (Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022).

Таким чином, біосинтез рекомбінантного феритину складається з двох взаємопов'язаних етапів: експресії та самозбірки наночастинок у клітинах *E. coli*, а також подальшого керованого розбирання та повторної збірки для точного навантаження терапевтичних молекул і створення високофункціональних біомедичних платформ.

1.5. Аналіз умов виділення та очищення феритину

Процес виділення та очищення рекомбінантного феритину є критично важливим етапом. Оскільки рекомбінантний феритин найчастіше експресується в клітинах *Escherichia coli*, методи очищення ґрунтуються на унікальній термічній та хімічній стійкості феритину. Рекомбінантний феритин, зокрема людський Н-ланцюг (HuHF) або L-ланцюг (rhFTL), зазвичай отримують шляхом надекспресії у бактеріальній системі (Liang, 2014; Jiang, 2019). Завдяки надзвичайно стабільній сферичній структурі феритин може витримувати температуру до 80 °С і навіть вище, що дозволяє використовувати термічну обробку як один з ключових етапів очищення. Традиційні підходи включають нагрівання сирого екстракту до 70-80 °С протягом приблизно 10 хвилин для видалення більшості сторонніх білків. Після цього очищення продовжують за допомогою багатостадійної хроматографії – передусім аніонообмінної та ексклюзійної (SEC), які забезпечують високий ступінь чистоти та відокремлення правильно сформованих наноконтейнерів феритину (Song et al., 2022). Для мутантних форм феритину, зокрема тих, що містять вставки пептидів, застосовують комбінацію іонообмінної хроматографії та гель-фільтрації, що дозволяє виділити білок із збереженою структурою та функціональністю (Zhang et al., 2016).

Окремий інтерес становлять спрощені схеми очищення, розроблені для рекомбінантного легкого ланцюга феритину (rhFTL), який часто утворює тільця включення в *E. coli*. У таких випадках ефективним виявився процес

температурно-полімерного осадження, оптимізований за температурою, рН та іонною силою. Нагрівання до 75 °С дозволяє видалити більшість домішок, а регулювання рН до 4,0-4,4 сприяє селективному осадженню небажаних білків. Додавання NaCl у концентрації 0,5-1,0 М підвищує вихід rhFTL, оскільки іонна сила стабілізує самозбірку феритину та сприяє утворенню сольових містків між субодиницями. Після освітлення супернатанту rhFTL додатково очищують за допомогою гідрофобної хроматографії (HIC), що дозволяє отримати білок високої чистоти (до 98,4%) та з високим виходом (понад 90%) (Song et al., 2022).

Після очищення феритину або його модифікованих форм важливим етапом є верифікація структури, ступеня чистоти та функціонального стану білка. Для цього використовують широкий спектр аналітичних методів. SDS-PAGE дозволяє оцінити склад субодиниць, тоді як нативний електрофорез (Native PAGE) підтверджує правильну самозбірку у 24-мерну наноструктуру. Поєднання SEC з ICP-MS використовують для оцінки інкапсуляції лікарських речовин, наприклад доксорубіцину або цисплатину, оскільки цей метод дає змогу розмежувати вільний препарат і той, що інкорпорований у феритинову оболонку. SEC з УФ-детекцією (280 нм) додатково підтверджує, що білок перебуває у правильно зібраному стані (Zhang, 2016; Turiel-Fernández, 2020).

Трансмійсна електронна мікроскопія (TEM) дає змогу візуалізувати сферичну морфологію феритину та оцінити однорідність наночастинок. Для аналізу гідродинамічного діаметра та розподілу розмірів використовують динамічне розсіювання світла (DLS). Додаткові фізико-хімічні методи, такі як MALDI-TOF-MS, застосовують для точного визначення молекулярної маси субодиниць та підтвердження структурних модифікацій (Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022).

РОЗДІЛ 2. СТВОРЕННЯ ПРОТИПУХЛИННИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ФЕРИТИНУ

2.1. Принцип дії феритину як засобу цільової доставки протиракових речовин

Ракові клітини мають властивість активно накопичувати залізо, забираючи залізо в усіх інших клітин організму (Manz, Blanchette, Paul, Torti, & Torti, 2016).

Цей процес реалізується завдяки накопиченню раковими клітинами природного переносника заліза – наносфер феритину (García et al., 2016). Тож, якщо у наносфери феритину завантажити замість заліза цитотоксичний протираковий препарат, ракові клітини накопичуватимуть наносфери феритину, а отже накопичуватимуть протиракову речовину, що доставляється цими наносферами.

Отже, біологічно активна речовина у комплексі з феритином значно меншою мірою буде накопичуватися у здорових клітинах відносно цієї ж речовини без феритину в якості наноносія, і більшою мірою накопичуватиметься в ракових клітинах, а отже чинитиме більшу цитотоксичну дію саме на них, завдяки більшій концентрації, тоді як дія на інші клітини, а отже побічна дія препарату буде значно меншою (Jiang et al., 2019).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пізн.</i>	<i>Дата</i>					
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>				<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протиракових засобів</i>		<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Скороцька О.І.</i>						25	95	
<i>Консульт.</i>					РОЗДІЛ 2. СТВОРЕННЯ ПРОТИПУХЛИННИХ ЗАСОБІВ НА ОСНОВІ ФЕРИТИНУ		<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>									
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>								

Сучасні наукові дослідження підтверджують, що комплекс феритину з хіміотерапевтичною речовиною є більш ефективним засобом боротьби з онкологічними захворюваннями, ніж хіміотерапевтичні засоби без носія (Monti, Ferraro, & Merlino, 2019; Mohanty, Parida, Raut, & Behera, 2022, Zhu et al., 2022), і, що не менш важливо, застосування наносфер феритину в якості носія антиракових цитотоксичних сполук зменшує їх побічну дію (Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022). Так, в дослідженнях, проведених на лабораторних тваринах, максимальна доза протипухлинної речовини доксорубіцину, яку може витримати організм (D_{50}) – 5 мг/кг маси. Максимальна доза доксорубіцину в комплексі з феритином, яку може витримати організм 20 мг/кг, тобто кардіотоксична дія доксорубіцину, що доставляється до ракових клітин наносферами феритину, в чотири рази нижче (Fan et al., 2018; Liang et al., 2014; Botlagunta et al., 2016).

Отже, препарати на основі феритину є більш ефективним та безпечним лікуванням онкологічних захворювань, ніж класичні лікарські препарати, що застосовуються зараз.

2.2. Порівняння феритину з існуючими аналогами

Крім феритину розглядаються і інші носії протипухлинних біологічно активних речовин, такі як ліпосоми. Можливість використання ліпосом для цільової доставки протівірусних та протипухлинних речовин практично доведена, і деякі препарати на основі ліпосом уже застосовуються в медицині на даний час (Kim, 2016; Li, Zhang, & Knez, 2016).

Проте, ліпосоми як носій біологічно-активних речовин мають певні недоліки. Ліпосоми накопичуються клітинами печінки, що знижує фармакотерапевтичну дію біологічно-активної речовини (адже замість того, щоб дістатися до ракових клітин, вона разом з ліпосоною затримується в печінці), а також підвищує гепатотоксичність препарату. Крім того, ліпосоми частково руйнуються в крові, через що частина біологічно-активної речовини

усе одно потраплятиме в кров'яне русло, а отже чинитиме побічну дію на здорові клітини. Тож, за цільової доставки протипухлинних речовин за допомогою ліпосом їх ефективність зростає, а побічна дія знижується у порівнянні з використанням хіміотерапевтичного препарату без засобів цільової доставки. Але у випадку використання ліпосом в якості засобу цільової доставки ефективність буде нижча, а побічна дія вища, ніж у випадку застосування з цією метою наносфер феритину (Olusanya, Naj Ahmad, Ibegbu, Smith, & Elkordy, 2018; Zhang et al., 2016; Guo et al., 2022). Отже, протипухлинні препарати на основі наносфер феритину є перспективнішими, ніж аналогічні препарати на основі ліпосом.

Крім цільової доставки хіміотерапевтичних препаратів перспективним методом лікування онкологічних захворювань є застосування моноклональних антитіл. Моноклональні антитіла демонструють високу ефективність та не мають тих побічних ефектів, що мають хіміотерапевтичні речовини (Matsumura, 2021).

Але на даний час виробництво моноклональних антитіл за допомогою гібридомних клітин складно масштабувати. Крім того, моноклональні антитіла не здатні проходити через гематоенцефалічний бар'єр, що є перешкодою для їх застосування проти злоякісних новоутворень, локалізованих у головному мозку (Matsumura, 2021). Натомість феритин здатен долати гематоенцефалічний бар'єр, доставляючи крізь нього хіміотерапевтичні речовини (рис. 2.1), що робить протипухлинні засоби на основі феритину більш універсальними, ніж моноклональні антитіла (Fan et al., 2018; Wang et al., 2024).

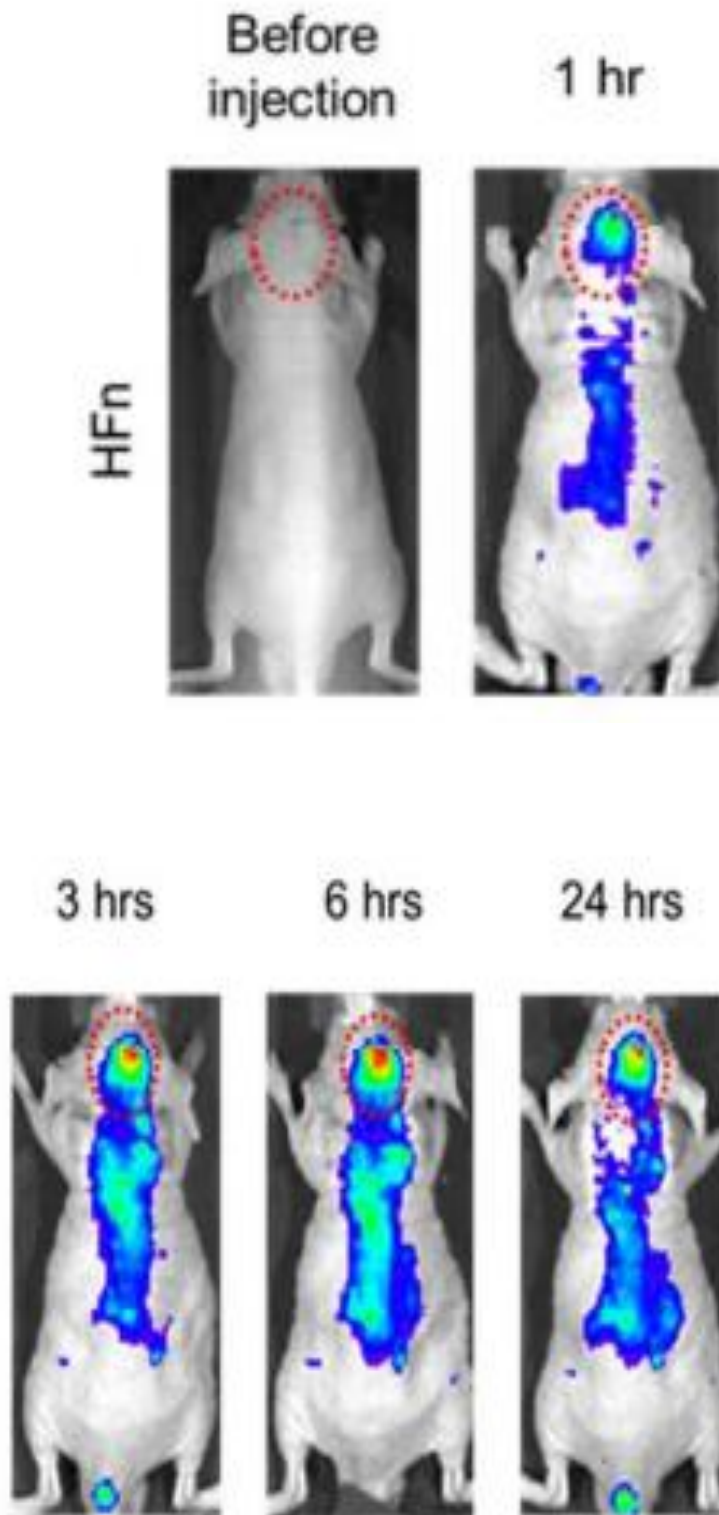


Рис. 2.1. Розподіл феритину в організмі миші, в якій є злоякісне новоутворення, локалізоване в головному мозку (Fan et al., 2018)

2.3. Самозбирання, саморозбирання і перезбирання феритинових наносфер

Феритин існує у двох формах: декомпактизований – білковий ланцюг, і компактизований – наносфера. Саме в компактизованій формі феритин виконує функцію носія лікарської речовини. Феритин збирається у наносфери, які зв'язуються з потрібною діючою речовиною препарату при значеннях рН 7-7,4. Людський феритин за рН 7 - 7,4 формує 24-мерні наносфери масою 440 кДа. Час необхідний для самозбирання – 5 год. Температура 30-35°C. При пониженні рН з 7 до 2 усі наносфери розформовуються і феритин знаходиться в декомпактизованій формі (Mohanty, Jena, & Behera, 2021; Liu et al., 2024; Srivastava, Scalcione, Arosio, & Bou-Abdallah, 2023).

Якщо рН знову підвищити до значення 7-8, феритин знову збереться у наносфери. Відповідно, регулюючи рН, можливо здійснювати розбірку та перезбірку феритинових наносфер (Sato et al., 2016).

Однак, як показало дослідження (Carmona et al., 2017), при переведенні феритину з компактизованої форми у декомпактизовану шляхом пониження рН до 2, частина наносфер розформовуються безповоротно і не перезбираються при підвищенні рН до 7. З цього впливає той факт, що за таких умов здійснення процесу перезбірки феритинових наносфер відбуваються втрати феритину, що знижує економічну рентабельність процесу.

Але у випадку, якщо понижувати рН не до 2, а до 2,5 – 3,5, і підвищувати не менш ніж до 7,4 для перезбірки, то безповоротне розформування наносфер буде зведено до мінімуму (Carmona et al., 2017).

Отже, з метою мінімізації втрат феритину, пов'язаних з безповоротним розбиранням наносфер, на етапі перезбірки варто понижувати рН до 2,5 для розформування наносфер, а підвищувати до 7,4-8 для їхнього перезбирання.

Регулювання рН здійснюється за допомогою відповідних буферів. Для створення низького рН, необхідного для розбирання наносфер феритину, до

розчину білка додається 500 мМ (0,5 М) розчин фосфорної кислоти в об'ємному співвідношенні 1:15, тобто 1 мл розчину фосфорної кислоти на 15 мл розчину білка, при цьому рН знизиться до 2,5 (Sato et al., 2016). Для перезбирання наносфер до розчину білка додається суміш 50 мМ трис, 2 мМ EDTA/2Na та 37,5 мМ NaOH в об'ємному співвідношенні 1:1:1, тобто 1 мл суміші на 1 мл розчину білка, при цьому рН досягне 8,0 (Sato et al., 2016).

Сучасні дослідження довели, що розмір феритинової наносфери не є постійним і її можливо регулювати шляхом впливу на His-мотиви (ділянки ланцюга феритину, що відповідають за формування наносфери) іонами металів або рН різної лужності (від 7 до 10) на етапі перезбірки (Gu et al., 2020; Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2016). Тож, розмір наночастинки можливо адаптувати під речовину, яку вона має транспортувати.

Також, наносфери можливо додатково зібрати у більші наноструктури. Для цього до звичайного феритину необхідно додати біотиновані феритинові наносфери, мічені пероксидазою хрому, у співвідношенні біотинованих до звичайних 1:24. Тоді утвориться двадцятип'ятисферний феритиновий нанокomплекс, здатний транспортувати великі органічні речовини (Men et al., 2015; Song et al., 2022).

Отже, процеси самозбирання, розбирання та повторної збірки феритинових наносфер можна уявити як багаторазове використання високоточного біологічного контейнера з керованим механізмом відкриття. У природних умовах субодиниці феритину спонтанно та високоспецифічно самозбираються у стабільну 24-мірну нанокапсулу завдяки кооперативним білковим взаємодіям, що формують порожнисту сферичну структуру. Це самозбирання відбувається без потреби сторонніх факторів, оскільки є термодинамічно вигідним та генетично запрограмованим (Carmona et al., 2017).

Для того щоб помістити всередину феритинової нанокапсули терапевтичну молекулу, структуру необхідно тимчасово дестабілізувати,

тобто, відкрити. Розбирання нанокapsули здійснюють за допомогою зовнішніх фізико-хімічних факторів, таких як низьке або високе значення рН, зміна іонної сили, застосування денатуруючих агентів (наприклад, 8 М сечовини) чи впливу високих температур. Ці умови порушують міжсубодиничні взаємодії, переводячи білок у мономерну або частково дисоційовану форму, що дозволяє терапевтичній молекулі проникнути у внутрішню порожнину (Liang et al., 2014).

Після введення препарату умови середовища повертають до фізіологічних, що запускає процес спонтанної повторної збірки. Субодиниці феритину відновлюють нативну 24-мірну наноструктуру, закриваючи внутрішній вантаж (діючу речовину, наприклад, протипухлинну сполуку) у стабільну білкову оболонку. Цей процес є швидким та зазвичай завершується упродовж однієї години. Важливо, що повторна збірка зберігає морфологію та монодисперсність наносфер, а також захищає інкапсульовану молекулу від деградації (Carmona et al., 2017).

Вивільнення терапевтичного агента відбувається лише після активації нанокapsули у клітині-мішені. Для цього феритинову субодиницю можуть модифікувати так, щоб її певні ділянки розщеплювалися специфічними протеазами, характерними для пухлинного мікросередовища (наприклад, катепсином Е або іншими ендосомальними ферментами). Альтернативно, вивільнення може запускатися локальною зміною рН у лізосомах, відновлювальним середовищем цитозолу або дією світла у випадку фотосенсибілізованих систем (Deng et al., 2023).

Таким чином, феритинові нанокapsули працюють як розумні біологічні контейнери. Поєднання їхньої природної самозбірки, високої структурної стабільності та можливості точного молекулярного програмування робить феритин універсальною платформою для таргетованої доставки ліків, створення нанореакторів і розробки складних біомедичних конструкцій.

2.4. Включення діючої речовини у феритинові наносфери

Включення діючої речовини у феритинові наносфери є ключовим етапом у створенні таргетних систем доставки. Особливості цього процесу визначаються як унікальною структурою феритину, внутрішня порожнина якого має діаметр приблизно 8 нм, так і хімічними властивостями самої діючої речовини. Основними стратегіями є інкапсуляція, тобто завантаження всередину порожнини, та кон'югація – зв'язування молекул зі зовнішньою або внутрішньою поверхнею феритину. Методи інкапсуляції передбачають подолання обмежень, що пов'язані із малими природними каналами у феритинових наносферах (0,3-0,4 нм), через які великі молекули не можуть потрапити всередину (Zhang et al., 2017). Одним з найпоширеніших підходів є метод розбирання та перезбирання, опосередкований рН (рис. 2.2). Він передбачає тимчасове руйнування 24-субодиночної структури за умов екстремально низького рН ($\leq 2,0-2,5$) або високого рН ($\geq 11,0-13,0$). Однак такі умови можуть спричинити денатурацію, дефекти або агрегацію феритину, що часто знижує вихід наносфер і ефективність інкапсуляції (Monti, Ferraro, & Merlino, 2019). Після розбирання білок перезбирають у присутності діючої речовини, повертаючи значення рН до нейтрального. Такий підхід був успішно застосований для інкапсуляції цисплатину у феритинові наносфери (Turiel-Fernández, Blanco-González, Corte-Rodríguez, Bettmer, & Montes-Bayón, 2020; Jiang et al., 2019).



Рис 2.2. Включення біологічно активної сполуки в наносфери феритину шляхом перезбирання (Deng et al., 2023)

Також існує метод пасивної дифузії (рис 2.3). Він полягає у тому, що наносфери феритину розширюються при підвищенні температури та зменшуються при зниженні, отже, при підвищенні температури молекули діючої речовини можуть легше проникати в наносфери шляхом молекулярної дифузії. Цей метод є найбільш простим і дешевим, але підходить лише для невеликих молекул (до 10 кДа), таких як доксорубіцин (DOX), епірубіцин, цисплатин і оксаліплатин, які включають в наносфери феритину саме цим способом (Turiel-Fernández, Blanco-González, Corte-Rodríguez, Bettmer, & Montes-Bayón, 2020; Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022; Deng et al., 2023).

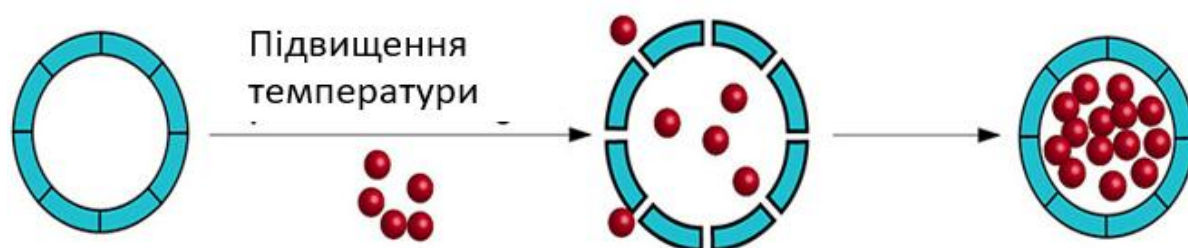


Рис 2.3. Включення біологічно активної сполуки в наносфери феритину шляхом пасивної дифузії (Deng et al., 2023)

Іншим варіантом є метод хімічного розбирання та електростатичної взаємодії. Наприклад, для інкапсуляції доксорубіцину (Dox) феритин розбирають у 8 М розчині сечовини. Оскільки рКа доксорубіцину становить 8,2 (функціональна група доксорубіцину заряджена позитивно), то ця молекула легко зв'язується з негативно зарядженою внутрішньою поверхнею феритинової наносфери в нейтральному буфері. Поступове видалення сечовини дозволяє провести перезбирання феритинових наносфер вже з включеним доксорубіцином. Ефективність цього методу є високою – до 33 молекул доксорубіцину на одну наносферу феритину, що на 85% ефективніше методу розбирання та перезбирання феритинових наносфер, що опосередкований рН (Liang et al., 2014).

Дослідження показали, що наносфера феритину має певну структурну гнучкість. Це дозволяє проникнення окремих молекул без необхідності попереднього розбирання. Діючу речовину можна включити простим змішуванням апоферитину з відповідним комплексом. Таким чином було інкапсульовано уранілацетат дигідрат та фосфовольфраміву кислоту. Показово, що інкапсуляція галової кислоти призводила до збільшення розміру феритинової наносфери з 12,0 до приблизно 14,5 нм (Zhang et al., 2017).

Феритин також широко використовують для інкапсуляції металів за рахунок природних біомінералізаційних механізмів, притаманних накопиченню заліза. Цей підхід ефективний при формуванні неорганічних наночастинок, наприклад MnO_2 (Deng et al., 2023). Крім того, радіоізотопи, такі як $Cu-64$ та $U-235$, можуть асоціюватися з металозв'язувальними центрами феритину, подібно до іонів заліза (Liang et al., 2014).

Для гідрофобних препаратів застосовують метод емульгування, який часто дає вищу ефективність завантаження діючої речовини у наносфери у порівнянні зі звичайним самозбиранням у фосфатно-сольовому буферному розчині. У цьому випадку гідрофобні молекули, такі як ерастин або рапаміцин, розчиняють у дихлорметані, тоді як феритин у водному буфері. Під час емульгування препарат формує гідрофобне ядро у взаємодії з феритином, що сприяє його ефективній інкапсуляції (рис 2.4). Включення рапаміцину у феритинові наносфери при створенні препарату NFER проводили методом емульгування. Розчин рапаміцину у дихлорметані – масляна фаза, водний розчин феритину (1мг/мл) – водна. Феритин знаходився в компактизованій формі. Фази змішували у співвідношенні 1:1 і піддавали впливу ультразвуку 10 хв, після чого проводили діаліз та додавали ліопротектор. Інкубували 36 годин за $24^{\circ}C$ та pH7, в результаті чого рапаміцин включався в феритинові наносфери (Li et al, 2019; Deng et al., 2023).

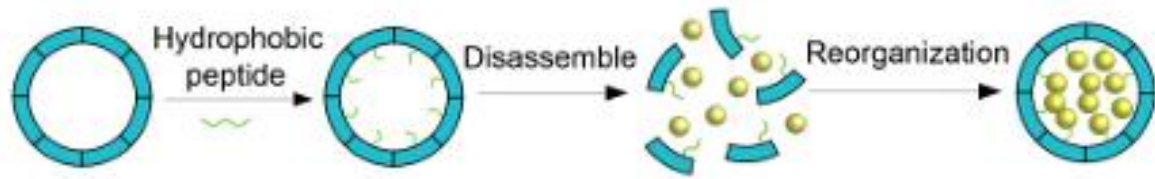


Рис 2.4. Включення гідрофобної біологічно активної сполуки в наносфери феритину (Deng et al., 2023)

Стратегії ковалентного зв'язування (поверхнева модифікація) передбачають приєднання діючої речовини безпосередньо до поверхні феритинової наносфери. Такий підхід застосовують тоді, коли потрібне точне таргетування або контрольована активація діючої речовини в певних клітинах. Одним із методів є ковалентна кон'югація до модифікованих пептидних ланцюгів, які попередньо вводять у структуру феритину. Наприклад, для створення платформи huHF(+/-)-drug використовують людський феритин (huHF), модифікований пептидом, багатим на карбоксильні групи. До цього пептиду ковалентно приєднують хіміотерапевтичні препарати, зокрема гемцитабін, мітоміцин С та доксорубіцин. Реакція кон'югації відбувалася за механізмом EDC-NHS. EDC (1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)-карбодіімід) – активатор карбоксильних груп, а NHS (N-гідроксисукцинімід) – стабілізатор проміжного ефіру. Утворений кон'югат залишається неактивним до моменту потрапляння у пухлинні клітини, де відбувається його специфічне розщеплення ендосомальною протеазою. Завдяки цьому забезпечується цільова доставка та вибіркоче вивільнення діючої речовини (Deng et al., 2023).

Іншим способом є поверхнева модифікація феритину для імунотерапії. Наприклад, на поверхню HF_n (феритин людини) можна приєднувати STING-агоністи, такі як SR-717. STING – це сигнальний шлях, що активує протипухлинну імунну відповідь. Для підвищення специфічності доставлення такі молекули кон'югують разом із пептидом, що зв'язує імунорегуляторний білок PD-L1 (PD-L1_{pep1}), який часто надекспресується пухлинами. Таким

чином формують наносфери феритину, які здатні селективно взаємодіяти з пухлинними клітинами, що експресують PD-L1 (Deng et al., 2023).

Ефективність інкапсуляції та завантажувальна здатність феритину можуть суттєво змінюватися в залежності від властивостей наносфери та умов проведення інкапсуляції. Оптимізація цих параметрів досягається шляхом модифікації амінокислотних залишків, зміни хімічного середовища або регулювання концентрацій реагентів. Одним із визначальних чинників є електростатичне середовище всередині наносфери феритину. Внутрішня поверхня натурального феритину людини (HF_n) має негативний заряд. Заміна цих негативно заряджених амінокислот на позитивно заряджені залишки дозволяє створити модифікований феритин HF_n(+). Така модифікація значно підвищує включення негативно заряджених молекул у феритинові наносфери, наприклад, олігонуклеотиди типу CpG (короткі ДНК-послідовності з повторами 5'-цитозин-фосфат-гуанін-3', що мають імуномодулюючу активність) (Deng et al., 2023).

Важливу роль відіграють і модифікації, спрямовані на покращення специфічного зв'язування та включення діючих речовин. Наприклад, модифікація N-кінця феритину людини шляхом приєднання пептиду, що зв'язує інтегрин $\alpha_2\beta_1$, дозволила підвищити ефективність інкапсуляції до 61,7%. Додатковим підходом є хімічна модифікація внутрішньої поверхні феритину. Заміна чотирьох нативних амінокислотних залишків на залишки глутамінової кислоти створює більш негативно заряджену внутрішню порожнину. Це сприяє підвищеному електростатичному притягуванню деяких інгібіторів і збільшує ефективність їх інкапсуляції (Deng et al., 2023).

Суттєвим фактором є концентрація реагентів у системі. Під час інкапсуляції цисплатину (платинового хіміотерапевтичного препарату) найвищу ефективність включення спостерігали при використанні початкової концентрації феритинового білка, що містить Fe, на рівні 10 мг/мл, і концентрації розчину цисплатину 1 мг/мл. Такий підбір концентрацій сприяє оптимальному співвідношенню між феритином та молекулами препарату

(Turiel-Fernández, Blanco-González, Corte-Rodríguez, Bettmer, & Montes-Bayón, 2020).

Отже, включення діючої речовини у феритинові наносфери є багатофакторним процесом, ефективність якого визначається як властивостями самого феритину, так і хімічними характеристиками молекул, що інкапсулюються. Унікальна структура феритину з внутрішньою порожниною діаметром близько 8 нм та наявністю природних наноканалів зумовлює необхідність застосування спеціальних методів завантаження, таких як рН-опосередковане розбирання і перезбирання, термозалежна дифузія, хімічне розбирання або використання електростатичних взаємодій. Кожний із цих методів має свої переваги і обмеження, що визначає доцільність їх застосування залежно від розміру, заряду та фізико-хімічних властивостей діючої речовини.

2.5. Протипухлинні речовини, що потенційно можуть бути включені в наносфери феритину

Феритин є універсальним внутрішньоклітинним білком. Він складається з 24 субодиниць двох типів – важких (FH) та легких (FL), які самозбираються у майже сферичну структуру. Геометрія феритинової наносфери наближена до ромбічного додекаедра, що забезпечує високу стабільність та рівномірний розподіл субодиниць у структурі (Carmona et al., 2017).

Наносфера феритину має зовнішній діаметр приблизно 12 нм. Усередині знаходиться велика внутрішня порожнина діаметром близько 8 нм, яка є основним простором для інкапсуляції різних біологічно активних молекул. Діаметр феритину людини (HFn) навіть після зв'язування з діючими речовинами, наприклад доксорубіцином, зазвичай залишається практично незмінним, що свідчить про збереження структури наносфери (Zhang et al., 2017).

Феритинові наносфери поєднують високу стабільність, біосумісність та природну здатність до таргетування. Завдяки цим властивостям вони є ефективними та перспективними носіями для доставки лікарських препаратів, діагностичних агентів і різноманітних молекул (Liang et al., 2014).

Узагальнені дані по феритиновим наносферам наведені у табл. 2.1

Таблиця 2.1

Характеристика феритинових наносфер

Наноструктура	Характеристика	Особливості самозбирання, розбирання та перезбирання	Джерело
Гетерогенні нанокапсули (FNn)	Гібридні нанокапсули (24 субодиниці)	Самозбирання <i>in vivo</i> : використання системи FATS (Ferritin Assembly Toolbox System) для внутрішньоклітинної <i>in situ</i> збірки. Саморозбирання <i>in vitro</i> : менш стабільні і схильні до агрегації	Liu et al., 2024
HF _n , модифікований для активації протеазою (huHF(+/-)-drug)	Рекомбінантний феритин, модифікований трьома пептидами для таргентної доставки цільових сполук	Самозбирання <i>in vivo</i> : відбувається в бактеріальній цитоплазмі. Перезбирання <i>in vitro</i> : ковалентне зв'язування з діючою сполукою	Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022
HF _n (включений цисплатин)	Сферична нанокапсула з 2 атомами платини	Самозбирання (завантаження) <i>in vitro</i> : 24 год при 37 °C, 10 мг/мл Fe-білка та 1 мг/мл цисплатину	Turiel-Fernández, Blanco-González, Cortez-Rodríguez, Bettmer, & Montes-Bayón, 2020
HF _n (включений доксорубіцин)	Розміри: HF _n – 14,1 нм, HF _n -DOX – 14,2 нм. Навантаження DOX HF _n .	Саморозбирання <i>in vitro</i> : 8 М розчин сечовини з доксорубіцином	Liang et al., 2014

Завдяки здатності феритину зв'язуватися з рецептором трансферину 1 (TfR1), який надмірно експресується в ракових клітинах, ці нанокапсули

забезпечують цільове доставлення терапевтичних агентів до пухлинних клітин (Zhang et al., 2017).

Класичні хіміотерапевтичні препарати можуть бути інкапсульовані всередину феритинової наносфери або ковалентно приєднані до її поверхні. Так, цисплатин успішно інкапсульюється у феритинові наносфери, що підвищує його поглинання клітинами у 5-9 разів. Вважається, що цисплатин та деякі його похідні є одними з малих молекул, що формують позитивно заряджені групи у нейтральних водних розчинах, що дозволяє завантажувати їх у негативно заряджену порожнину феритинової наносфери (Turiel-Fernández, Blanco-González, Corte-Rodríguez, Bettmer, & Montes-Bayón, 2020). Доксорубіцин (DOX) ефективно інкапсульюється у феритинові наносфери через електростатичні взаємодії; його рКа становить 8,2, що сприяє зв'язуванню з негативно зарядженою внутрішньою поверхнею феритину (Liu et al., 2024).

Терапевтичні агенти для імунотерапії включають речовини, що стимулюють протипухлинний імунітет. Так, CpG олігонуклеотиди інкапсульюють у позитивно заряджені феритинову наносфери, таким чином посилюють антиген-презентуючу здатність дендритних клітин. Агоніст STING SR-717, модифікований пептидом RGE для таргетування гліоми, зменшував об'єм пухлини на 55,3%. Варіанти білків SIRP α та SIRP γ модифікують поверхню феритинових наносфер для блокування CD47, покращуючи фагоцитоз пухлинних клітин макрофагами та дендритними клітинами. Феритин також використовують для цільової доставки агентів, що застосовуються у фотодинамічній та фототермічній терапії раку. (Deng et al., 2023).

На даний час пропонуються використання в комплексі з феритиновими наносферами різних протипухлинних речовин, таких як, наприклад, доксорубіцин, епірубіцин, цисплатин, оксаліплатин, латероспорулін, наведені в табл. 2.2.

Протипухлинні речовини, що потенційно можуть бути включені в наносфери феритину

Речовина	Протипухлинна активність (EC ₅₀)*	Культура ракових клітин, на якій проводили випробування	Джерело
Цисплатин	10 мкМ	H357 (клітини раку (адренокарцинома) підшлункової залози)	Monti, Ferraro, & Merlino, 2019
Доксорубіцин	50 мкМ		Botlagunta et al., 2018
Епірубіцин	0.5 мкМ	MCF-7 (клітини раку (адренокарцинома) молочної залози)	Guo et al., 2022
Оксаліплатин	0.5 мкМ	HCT116 (клітини раку товстої кишки)	O'Dowd, Sutcliffe, & Griffith, 2023
Латероспорулін	10 мкМ	HeLa (клітини раку шийки матки)	Baindara, Gautam, Raghava, & Korpole, 2017

Примітка. * - кількість (моль) біологічно-активної речовини, яка викликає 50 % лізису моношару ракових клітин

Таким чином, феритинові наносфери є універсальною платформою для доставки широкого спектру протипухлинних сполук, імуномодулюючих речовин та фотосенсибілізаторів, забезпечуючи цільову та контрольовану доставку до пухлинних клітин.

ВИСНОВОК

Згідно даних актуальної наукової літератури застосування наносфер феритину в якості носія протипухлинних речовин підвищує їх ефективність та знижує побічну дію. Тож, виробництво феритину є перспективним напрямом сучасної біотехнології.

На основі порівняння інформації з різних літературних джерел було встановлено, що оптимальним біологічним агентом для виробництва феритину є рекомбінантний штам *Escherichia coli* BL21(DE3), генетична модифікація якого полягає у введенні в клітину бактерії рекомбінантної плазмиди рЕТ28а-rHF, що сконструйована інтеграцією в бактеріальну плазмиду рЕТ-28а гену, виділеного з культури людських клітин легеневої аденокарциноми (A549), який відповідає за синтез важкого ланцюга (H-chain) феритину. Оптимальним середовищем для даного біологічного агента є Luria broth (LB).

Також, в даному літературному огляді було досліджено процес самозбирання наносфер феритину та включення у них лікарських речовин. Встановлено, що оптимальне рН для розформування наносфер феритину 2,5 - 3,5, а для збирання 7,4-8, адже за таких умов незворотне розформування наносфер зводиться до мінімуму. Включення лікарських речовин може проводитись під час самозбирання, що є оптимальним для молекул масою більше 10 кДа, або ж шляхом пасивної дифузії за умов підвищення температури, що є оптимальним для молекул масою менше 10 кДа, таких як доксорубіцин.

ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ

3.1. Характеристика біотехнологічного продукту

Феритин – це універсальний внутрішньоклітинний білок, характерний як для прокариотів, так і для еукаріотів. Феритин може існувати у двох формах: декомпактизований – білковий ланцюг, і компактизований – наносфера. Маса наносфери феритину 440 кДа, зовнішній діаметр – 12 нм, внутрішній – 8 нм (Plays, Müller, & Rodriguez, 2021; Sevieri et al., 2024). Одна наносфера людського феритину збирається з 24 ланцюгів (рис 3.1). Самозбирання наносфер феритину (повний перехід феритину з декомпактизованої форми в компактизовану) відбувається при рН 7. Повне розформування наносфер відбувається при рН 2 (Mohanty, Jena, & Behera, 2021; Men et al., 2015). Феритинові наносфери виконують в клітині функцію зберігання і транспортування заліза. Це досягається шляхом зв'язування наносфери з атомарним залізом (Song et al., 2022). За аналогічним принципом феритин здатен зв'язуватись з біологічно активними речовинами, а отже виконувати роль носія лікарських речовин, в тому числі протипухлинних, забезпечуючи їх цільову доставку (Crich et al., 2015; Zhu et al., 2022; Wang et al., 2018) (рис 3.2). Ефективність комплексу феритину з доксорубіцином практично доведена дослідженнями на мишах (Liang et al, 2014). Завдяки цільовій доставці феритиновими наносферами побічна дія доксорубіцину є нижчою в чотири рази у порівнянні з чистим доксорубіцином (Fan et al, 2018; Liang et al, 2014, Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пізн.</i>	<i>Дата</i>	<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протипухлинних засобів</i>	<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>							42
<i>Перевірив</i>	<i>Скроцька О.І.</i>				РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ	<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт.</i>								
<i>Н. контр</i>								
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

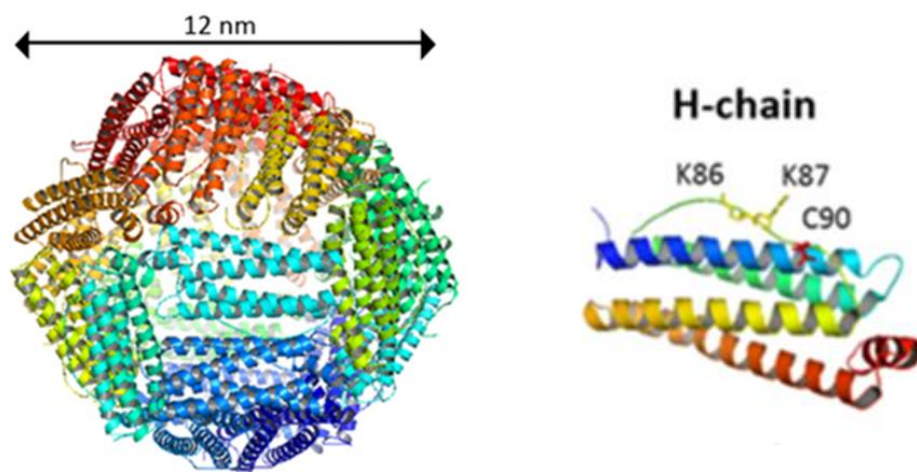


Рис 3.1. Наносфера феритину та її мономер– Н-ланцюг феритину (Carmona et al., 2017)

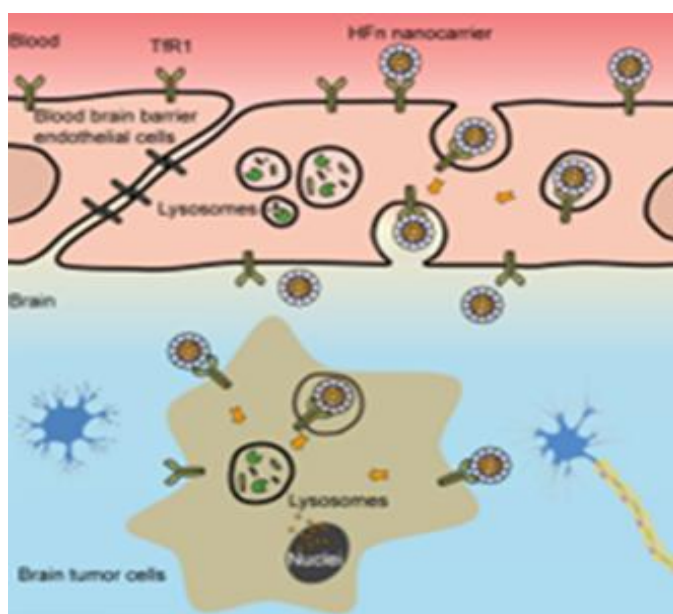


Рис 3.2. Схема цільової доставки біологічно активних речовин наносферами феритину (Fan et al., 2018)

3.2. Потреба у цільовій продукції

Присутні на даний час на ринку України препарати доксорубіцину наведено в табл. 3.1.

Препарати доксорубіцину на ринку України

Торгова назва	Виробник	Дозування у флаконі	Ціна за флакон, грн (на жовтень 2025)
Доксорубіцин «Ебеве»	Ебеве Фарма, Австрія	50 мг у 25 мл (2 мг/мл)	958 – 1200
Доксорубіцин-Віста	Сіндан Фарма, Румунія	50 мг у 25 мл (2 мг/мл)	1067 – 1115

Доксорубіцин може застосовуватися при наступних онкологічних захворюваннях: лімфобластний лейкоз, саркома м'яких тканин, остеогенна саркома, саркома Юінга, множинна мієлома, рак щитовидної залози, пухлина Вільмса, нейробластома, рак сечового міхура, рак шлунка, рак яєчників, лімфогранулематоз, неходжкінські лімфоми, трофобластичні пухлини, рефрактерний рак яєчника, саркома Капоші (Доксорубіцин. Компендіум).

Кількість випадків захворювання на ті види раку, які використовують переважно хіміотерапію у схемах лікування згідно національних протоколів, станом на 2023 рік в Україні зазначено в табл. 3.2 (Національний канцер реєстр України).

Кількість виявлених у 2023 році випадків захворювання на види раку, що передбачають терапію доксорубіцином

Вид раку	Кількість пацієнтів
множинна мієлома (C90)	4833
неходжкінські лімфоми (C82-C85)	17481
рак сечового міхура (C67)	37212
рак шлунка (C16)	30363
рак яєчників (C56)	32865

При лікуванні цих онкологічних захворювань використовуються різні методи терапії, в тому числі хірургічне втручання, променева та хіміотерапія терапія, але хіміотерапія має ключове значення (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Методи лікування онкологічних захворювань вищенаведених типів

Вид раку	Методи лікування			Джерело інформації	
	Хірургія	Променева терапія	Хіміотерапія		
множинна мієлома	-	+	<u>Доксорубіцин</u> , вінкрістін, метотриксат, мелфолан, циклофосфамід, талідомід	Бортезоміб	(Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги множинна мієлома)
неходжкінська лімфоми	-	+	<u>Доксорубіцин</u> , вінкрістін, вінбластин, блеоміцин, хлорамбуцин, етопозид, циклофосфамід, флударабін, хлорамбуцил	Рітуксімаб	(Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги неходжкінські лімфоми та лімфома ходжкіна)
рак шлунка	+	-	<u>Доксорубіцин</u> , цисплатин, паклітаксел, фторурацил, оксаліплатин, капецитабін	Трастузумаб, пембролізумаб	(Стандарт медичної допомоги рак шлунка)
рак яєчників	+	-	<u>Доксорубіцин</u> , цисплатин, гемцитабін, паклітаксел, циклофосфамід, блеоміцин	-	(Клінічний протокол. Додаток до наказу МОЗ №554 від 17-09-2007)
рак сечового міхура	+	+	<u>Доксорубіцин</u> , цисплатин, гемцитабін, метотриксат, вінбластин, мітоміцин С	-	(Національний інститут раку. локальний протокол медичної допомоги та клінічний маршрут хворих на рак сечового міхура)

Враховуючи наявність інших методів лікування, а також використання різних препаратів для хіміотерапії, вважатимемо, що лікування доксорубіцином знадобиться орієнтовно 30% пацієнтів.

Враховуючи наявність інших виробників доксорубіцину, розраховуватимемо на 10% ринку доксорубіцину.

3.3. Розрахунок річної потужності виробництва

Загальна кількість пацієнтів, у яких виявлено види раку, що потенційно можуть лікуватися за допомогою доксорубіцину:

$$37212 + 30363 + 32865 + 17481 + 4833 = 122754 \text{ пацієнтів}$$

З них потребують доксорубіцину приблизно 30% – 36 000 пацієнтів

10% ринку доксорубіцину – 3600 пацієнтів.

Курсова доза доксорубіцину для одного пацієнта – 50 мг доксорубіцину.

Для лікування 3600 пацієнтів необхідно $50 \text{ мг} * 3600 = 180\,000 \text{ мг} = 180 \text{ г}$ доксорубіцину

Одна наносфера феритину здатна здійснювати цільову доставку 400 молекул доксорубіцину (Jiang et al., 2019).

Отже, для виготовлення препарату на 400 моль доксорубіцину потрібен 1 моль наносфер феритину.

Маса наносфери феритину 440 кДа. Отже, молярна маса наносфер феритину 440 000 г / моль.

Молярна маса доксорубіцину ($C_{27}H_{29}NO_{11}$) 543,5 г/моль (Johnson-Arbor, & Dubey, 2017).

Маса 400 моль доксорубіцину $400 * 543,5 = 217\,400 \text{ г}$

Масу феритину, необхідну для перенесення 1 г доксорубіцину, визначаємо за пропорцією:

217 400 г доксорубіцину – 440 000 г феритину

1 г доксорубіцину – x

$$x = 440\,000 / 217\,400 = 2 \text{ г феритину}$$

Отже, на 1 г доксорубіцину необхідно 2 г феритину

На 180 г доксорубіцину необхідно 360 г феритину

За 1 виробничий цикл біологічний агент продукує 15 мг феритину/л культуральної рідини. З урахуванням витрат 40% на виділення і очищення отримуємо 9 мг феритину /л культуральної рідини.

Виходячи з того, що з 1 л культуральної рідини може бути виділено 9 мг цільового продукту, за пропорцією визначимо об'єм культуральної рідини ($V_{кр}$), необхідний для отримання 360 г феритину:

0,009 г феритину – 1 л культуральної рідини

360 г феритину – x

$x = 360/0,009 = 40\ 000$ л культуральної рідини

Тривалість одного виробничого циклу – 24 год, а кількість робочих днів на рік – 330

Отже, кількість циклів на рік – 330

Об'єм культуральної рідини, що зливається за 1 цикл

$V_{кр} = 40\ 000 / 330 = 120$ л

Враховуючи краплєвинос $Eф = 10\%$, робочий об'єм ферментера:

$V_{рф} = V_{кр} / (1 - Eф) = 120 / 0,9 = 133$ л

Коефіцієнт заповнення $Kф = 0,6$

Приблизний геометричний об'єм ферментера:

$V_{пф} = V_{рф} / Kф = 133/0,6 = 222$ л

Геометричний об'єм ферментера:

$V_{гф} = 250$ л

Фактичний коефіцієнт заповнення:

$Kф = 133 / 250 = 0,53$.

Узагальнена схема здійснення етапів розрахунків ТЕО виробництва феритину представлена на рис. 3.3.

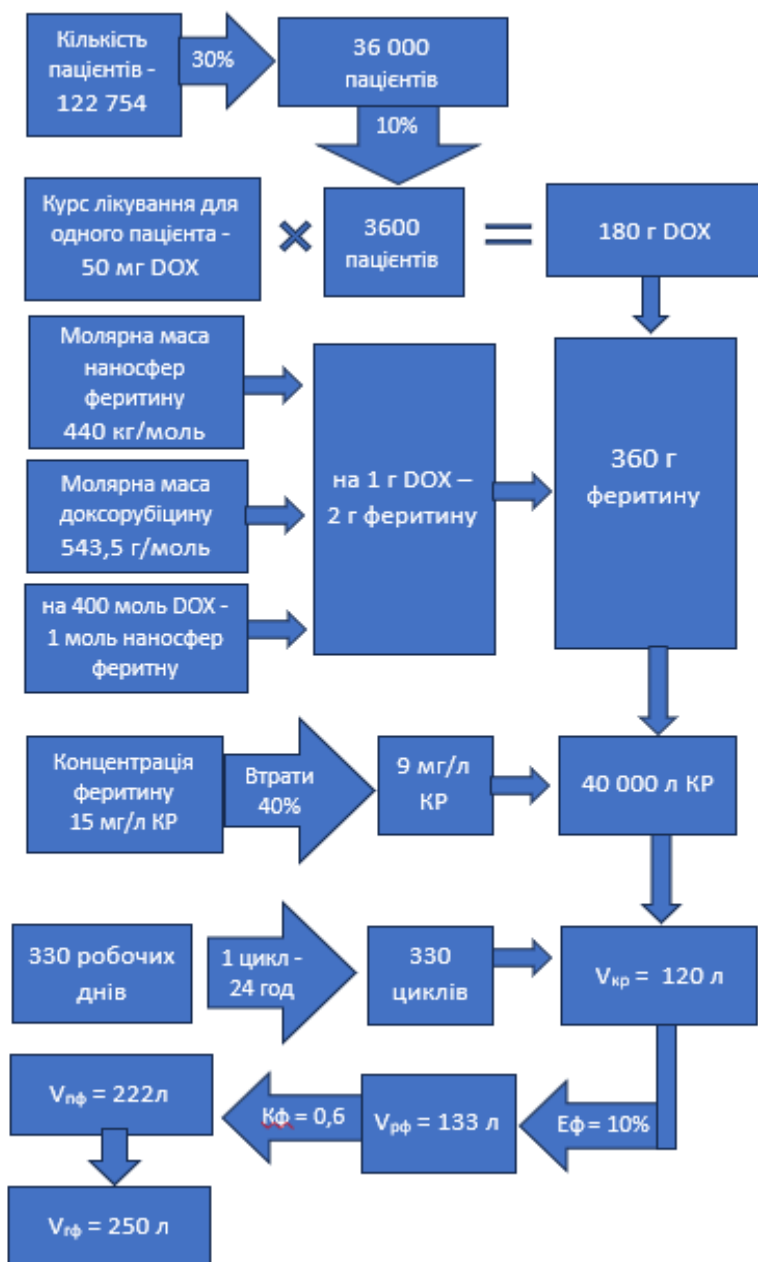


Рис. 3.3. Узагальнена схема здійснення етапів розрахунків техніко-економічного обґрунтування виробництва феритину

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

4.1. Обґрунтування вибору післяферментаційних процесів отримання феритину

Оскільки феритин – це ендометаболіт (Zou et al, B, 2016), для його виділення необхідно спершу дезінтегрувати клітини. Для цього спочатку потрібно відділити біомасу, для чого оптимальним варіантом буде центрифугуванням (3 хв, 10000 g при 4°C) (Liu et al., 2024).

У лабораторних умовах для дезінтеграції клітин *Escherichia coli* використовується ультразвук (Liu et al., 2024; Sato et al., 2016). Але в промислових масштабах цей метод не є оптимальним варіантом, адже, по-перше, ультразвукові дезінтегратори не виготовляються під промислові масштаби, по-друге, за дезінтеграції ультразвуком виділяється багато тепла, а отже в промислових масштабах довелось би витратити енергію на охолодження. Іншим варіантом дезінтеграції може бути ферментативний лізис, але цей метод потребує використання дороговартісного літичного буфера.

Враховуючи, що феритин не руйнується під час механічної дезінтеграції клітин біологічного агента, на відміну від більшості рекомбінантних білків (Sato et al., 2016), прийнятними методами дезінтеграції клітин є механічні методи, такі як механічний зсув за допомогою гомогенізатора або ж bead beating за допомогою бісерного млина. Враховуючи більшу економічну рентабельність дезінтеграції за допомогою механічного млина оптимальним методом руйнування клітин є bead beating.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пізн.</i>	<i>Дата</i>					
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>				<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протираковинних засобів</i>		<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Скроцька О.І.</i>							49	95
<i>Консульт.</i>					РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ СТАДІЙ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ		<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>									
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>								

Знаючи, що феритин – термостабільна сполука (Sato et al., 2016), можна застосувати попередній підігрів 45-50°C для полегшення руйнування клітинної стінки (Diels, Callewaert, Wuytack, Masschalck, & Michiels, 2004) і, відповідно, зниження енерговитрат на роботу млина.

Існує два основних способи виділення феритину з лізату. Перший – осадження сульфатом амонію (Mohanty, Jena, & Behera, 2021), другий – ультрафільтрація (Liu et al., 2024). Оскільки при ультрафільтрації менші потенційні втрати цільового продукту, ніж при осадженні та подальшому діалізі, а розміри білка є відомими, доцільніше застосувати ультрафільтрацію.

Але спершу потрібно позбутися супутніх білків та уламків клітин. Для зменшення кількості супутніх білків раціональним буде метод теплового шоку, адже за підвищення температури більшість білків згорнуться і стануть нерозчинними, тоді як феритин залишиться в розчині (Liu et al., 2024; Sato et al., 2016; Song et al., 2021).

Для зниження енерговитрат раціональним буде застосувати тепло, що виділяється при дезінтеграції механічним зсувом, що з одного боку мінімізує енерговитрати на охолодження, з іншого – зменшить витрати на нагрівання.

Після 10 хв інкубації при 75°C нерозчинні білки і фрагменти клітин можливо відокремити центрифугуванням 30 хв, 16000 g за температури 4 °C (Mohanty, Jena, & Behera, 2021). Феритин залишається в супернатанті, який направляється на подальші етапи.

Для очищення феритину раціонально застосувати іонообмінну хроматографію (Liu et al., 2024).

В результаті елюції утвориться розчин з занадто низькою концентрацією феритину для виробництва феритин-доксорубіцинового комплексу, тож, утворений розчин необхідно концентрувати. Для цього раціональним буде застосувати метод випарювання. Оскільки феритин руйнується при температурі вищій за 75°C, випарювання необхідно проводити при температурі

нижчій за 75°C (Sato et al., 2016). Тож, раціональним буде метод вакуум випарювання, адже він дає змогу випарувати воду за температур нижчих за температуру кипіння води. Найкращим варіантом з точки зору зручності обслуговування промислового обладнання буде вакуум-випарний апарат з винесеною поверхнею нагріву.

4.2. Підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків по стадіях

Обґрунтовано вибір наступних післяферментаційних стадій:

ДР 1. Підготовка води

ДР 1.1. Механічна фільтрація

ДР 1.2. Дехлорування

ДР 1.3. Пом'якшення

ДР 1.4. Зворотній осмос

ДР 1.5. Електродеіонізація

ДР 1.6. УФ-опромінення

ДР 1.7. Ультрафільтрація

ДР 1.8. Дистиляція в багаторазовому дистиляторі

ДР 1.9. Зберігання та циркуляція

ДР 2. Приготування буферів

ДР 2.1. Приготування буферу для ресуспендування

ДР 2.2. Приготування 5х буферу А

ДР 2.3. Приготування буферу А

ДР 2.4. Приготування буферу В

ТП 3. Відділення біомаси

ТП 3.1. Відділення біомаси центрифугуванням

ТП 4. Дезінтеграція клітин Escherichia coli

ТП 4.1. Попередній підігрів

ТП 4.2. Механічна дезінтеграція клітин Escherichia coli

ТП 5. Осадження супутніх білків та уламків клітин

ТП 5.1. Тепловий шок

ТП 5.2. Центрифугування

ТП 6. Виділення феритину з супернатанту

ТП 6.1. Самозбирання наносфер феритину

ТП 6.2. Тангенціальна ультрафільтрація

ТП 7. Очищення феритину іоннообмінною хроматографією

ТП 7.1. Підготовка колонки (еквілібрація)

ТП 7.2. Підготовка зразка

ТП 7.3. Завантаження

ТП 7.4. Елюція

ТП 8. Концентрування

ТП 8.1 Вакуум випарювання

ТП 8.2. Зберігання

Розподіл втрат феритину по стадіях, а також підбір необхідного обладнання наведено в табл. 4.1.

Вихідні дані:

Об'єм культуральної рідини, що зливається за 1 цикл – 120 л

Концентрація абсолютно сухої біомаси в культуральній рідині – 7,5 г/л

Концентрація феритину в культуральній рідині – 15 мг/л

За одну ферментацію синтезується 15 мг/л * 120 л = 1800 мг феритину

Втрати феритину на стадіях виділення – 40% (згідно ТЕО)

Отже, кінцева кількість феритину становитиме 1800 мг * 0,6 = 1080 мг

Таблиця 4.1

Розподіл втрат феритину по стадіях та підбір обладнання

Стадія	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Обладнання
		Надійшло	Втрати феритину	Вийшло	
<i>ДР 1. Підготовка води</i>					
<i>ДР 2. Приготування буферів</i>					
<i>ДР 2.1. Приготування буферу для ресуспендування</i>	порошок Tris-HCl	47,3 г		-	Реактор з мішалкою 10 л, електронні ваги
	порошок NaCl	52,6 г		-	
	порошок EDTA	2,2 г		-	
	Вода очищена	5,5 л		-	
	Буфер для ресуспендування	-		6 л	
<i>ДР 2.2. Приготування 5x буферу А</i>	порошок Tris-HCl	6,3 г		-	Мірна колба 1 л, електронні ваги
	порошок NaCl	5,8 г		-	
	Вода очищена	350 мл		-	
	5x буфер А			400 мл	
<i>ДР 2.3. Приготування буферу А</i>	5x буфер А	150		-	Мірна колба 1 л
	Вода очищена	600 мл		-	
	Буфер А			750 мл	
<i>ДР 2.4. Приготування буферу В</i>	порошок Tris-HCl	2,42		-	Мірна колба 2 л, електронні ваги
	порошок NaCl	58,44 г		-	
	Вода очищена	900 мл		-	
	Буфер В			1 л	

Продовження табл. 4.1

Стадія	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Обладнання
		Надійшло	Втрати феритину	Вийшло	
<i>ТП 3. Відділення біомаси</i>					
<i>ТП 3.1. Відділення біомаси центрифугуванням</i>	Культуральна рідина (у якій 1800 мг феритину)	120 л	-	118 л	Збірник 130 л, центрифуга продуктивністю 200 л/год.
	Волога біомаса (у якій 1710 мг феритину)	7,5 г/л * 120л = 900г (АСБ) враховуючи вологість 70% - 3000 г	5% (90мг)	2850 г (2 л)	
<i>ТП 4. Дезінтеграція клітин Escherichia coli</i>					
<i>ТП 4.1. Попередній підігрів</i>	Буфер для ресуспендування	6 л		8 л суспензії	Бісерний млин, 10 л
	Волога біомаса (у якій 1710 мг феритину)	2850 г (2 л)			
<i>ТП 4.2. Механічна дезінтеграція клітин Escherichia coli</i>	Суспензія вологої біомаси у буфері (у якій 1710 мг феритину)	8 л		-	
	Дезінтеграт (у якому 1710 мг феритину)	-		8 л	
<i>ТП 5. Осадження супутніх білків та уламків клітин</i>					
<i>ТП 5.1. Тепловий шок</i>	Дезінтеграт (в якому 1710 мг феритину)	8 л		8 л	Реактор з мішалкою, 15 л
<i>ТП 5.2. Центрифугування</i>	Дезінтеграт (в якому 1625 мг феритину)	8 л	5% (85мг)	7,7 л	Горизонтальна осаджувальна промислова центрифуга, розрахована на 16000 г, продуктивністю 10 л / год
	Нерозчинний осад	-		600 мг	На знешкодження

Продовження табл. 4.1

Стадія	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Обладнання
		Надійшло	Втрати феритину	Вийшло	
<i>ТП 6. Виділення феритину з супернатанту</i>					
<i>ТП 6.1. Збирання</i>	Супернатант (в якому 1625 мг феритину)	7,7 л		7,7 л	Реактор з мішалкою, 15 л
<i>ТП 6.2. Тангенціальна ультрафільтрація K=7</i>	Супернатант (в якому 1495 мг феритину)	7,7 л	8% (130мг)	-	Тангенціальна ультрафільтрацій на установка касетного типу, 10 л, 100/300 кДа
	Концентрат	7,7/7 = 1,1		1,1 л	
	Пермеат	-		6,5 л	На знешкодження
<i>ТП 7. Очищення феритину іоннообмінною хроматографією</i>					
<i>ТП 7.1. Підготовка колонки (еквілібрація)</i>	Буфер А	250 мл			АКТА (хроматографічна система, колонка HiLoad 16/60 Fast Flow, об'ємом колонки - 50 мл)
	Дистильована вода	250 мл			
	1 М розчин NaCl	250 мл			
<i>ТП 7.2. Підготовка зразка</i>	Розчин феритину (в якому 1495 мг)	1,1 л			
	5x буфер А	250 мл			
<i>ТП 7.3. Завантаження</i>	Розчин феритину (в якому 1495 мг феритину)	1250 мл			
	Буфер А	500 мл			
<i>ТП 7.4. Елюція</i>	Буфер Б	1 л		-	
	Розчин феритину у буфері А (в якому 1495 мг феритину)	1850 мл	20% (350мг)	-	
	Елюат (в якому 1145 мг феритину)	-		2850 мл	

Стадія	Матеріальні потоки на стадії	Кількість по стадіях			Обладнання
		Надійшло	Втрати феритину	Вийшло	
<i>ТП 8. Концентрування</i>					
<i>ТП 8.1. Вакуум випарювання</i>	Елюат (в якому 1145 мг феритину)	2850 мл	5% (65мг)	-	
	Концентрат (в якому 1080 мг феритину)	-		100 мл	
	Екстра-пара	-		2750 мл	На знешкодження
<i>ТП 8.2. Зберігання</i>	Концентрат (в якому 1080 мг феритину)	100 мл		100 мл	

4.3. Специфікація обладнання

Специфікація обладнання для проведення післяферментаційних процесів отримання феритину представлена в табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Ф1	Механічний фільтр		Фільтр Aquafilter, 5 мкм, Габаритні розміри: 60мм*60мм*128мм [1]
K2	Катіонітна іонообмінна колонка		Іонообмінна вежа Newterra Ion Exchange Vessels Габаритні розміри: 150мм*150мм*1000мм [2]
AK3	Аніонна іонообмінна колонка		Іонообмінна вежа Newterra Ion Exchange Vessels Габаритні розміри: 150мм*150мм*1000мм [2]
Ф4	Вугільний фільтр		Насипний вугільний фільтр Akvo Carbon 1035TC
H5	Відцентровий насос		Відцентровий насос Alfa Laval LKH / LKHex, 1,5–75 кВт, продуктивність 250 л/год Габаритні розміри: 260мм*102мм*62мм [3]

Продовження табл. 4.2

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
306	Система зворотного осмосу		Промислова система зворотного осмосу Organic RO 0.25 з мембраною General Electric 4040. Продуктивність: 250 л/год. Мембрана: 4040 Вихід пермеату: до 75% Робочий тиск: до 8 – 10 атм Діаметр підключення: фланець Ду 25. Габаритні розміри: 485*330*500мм [4]
Н7	Відцентровий насос		Відцентровий насос Alfa Laval LKH / LKHex, 1,5–75 кВт, продуктивність 250 л/год Габаритні розміри: 260мм*102мм*62мм [5]
ЕД8	Модуль електродеіонізації		Система електродеіонізації MASTERpakTM, продуктивність 4 л/хв 320мм*210мм*500мм [6]
39	Збірник води очищеної		4 л
Н10	Відцентровий насос		Відцентровий насос Alfa Laval LKH / LKHex, 1,5–75 кВт, продуктивність 250 л/год Габаритні розміри: 260мм*102мм*62мм [5]
УФ11	УФ-стерилізатор		УФ-стерилізатор VIQUA Sterilight VH150 Габаритні розміри:330*330*890мм [7]
Ф12	Стерилізуючий фільтр		0,22 мкм
Д 13	Багатоступеневий дистилятор		Багатоступеневий дистилятор Senieer multi effect water distiller. Продуктивність 250 л/год. Габаритні розміри: 1000мм*240мм*560мм [8]
Ц14	Центрифуга	1	Alfa laval Clara 200, продуктивність 200 л/год, 10000 g, виробник Alfa laval Габаритні розміри 1778мм*1358 мм*2059 мм [9]
Г15	Горизонтальний бісерний млин	1	HYBS-10, об'єм 10 л, потужність 22кВт Виробник: Hefei Huayun Machinery Manufacturing Co. Габаритні розміри – 500м*500м*1400м [10]
Р16	Реактор з мішалкою	1	ChemReactor BR/GR, скляний, обладнаний імпелерною мішалкою з емальованої сталі, об'єм 15 л, виробник LPP Equipment Warsaw, Габаритні розміри 600м*600м*1500м [11]
Н17	Насос	1	Насос 700 series продуктивністю 1980 л/год. Виробник Watson-Marlow. Габаритні розміри 380*400*400
Ц18	Горизонтальна осаджувальна промислова центрифуга	1	Горизонтальна осаджувальна промислова центрифуга 16000 g, виробник Super manufacturer Габаритні розміри 2000 мм*500 мм*500 мм [12]

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
H19	Насос	1	Насос 700 series продуктивністю 1980 л/год. Виробник Watson-Marlow. Габаритні розміри 380*400*400
P20	Реактор з мішалкою	1	ChemReactor BR/GR, скляний, обладнаний імпелерною мішалкою з емальованої сталі, об'єм 15 л, виробник LPP Equipment Warsaw, Габаритні розміри 600м*600м*1500м [13]
УФ21	Тангенціальна ультрафільтраційна установка	1	Тангенціальна ультрафільтраційна установка Minimate™ Tangential Flow Filtration Capsule виробництва Pall, з мембранними фільтрами 100 та 500 кДа касетного типу виробництва Pellicon. Габаритні розміри: 300 мм*200мм*400мм [14]
ХК22	Хроматографічна колонка	1	HiLoad 16/60 Fast Flow. Об'єм колонки - 50 мл діаметр 16 мм (1,6 см), висота шару сорбенту 60 см (система АКТА виробництва Cytiva), Габаритні розміри 16*16*600 [15]
B23	вакуум-випарний апарат	1	вакуум-випарний апарат з винесеною поверхнею нагріву. RV-5A. Об'єм 5 л, продуктивність 2 л/хв, виробник Beinginternational, Габаритні розміри: 830×345×1135
324	Асептичний резервуар	1	500 мл

Сайти виробників обладнання:

1. Механічний фільтр Aquafilter [електронний ресурс] Режим доступу: https://aquafilter.store/?srsltid=AfmBOop8sg4sRi_6PBZ4Y6QdagkYpEvgLI7wcZoNxCAil542_Cr-O8Pq
2. Іонообмінна вежа Newterra Ion Exchange Vessels. Офіційний сайт виробника Newterra [електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.newterra.com/technologies/ion-exchange-systems/>
3. Промислова система зворотного осмосу Organic RO 0.25. Офіційний сайт виробника akvo [електронний ресурс] Режим доступу: <https://akvo.com.ua/ua/1730-organic-ro-025-promyishlennaya-sistema-obratnogo-osmosa>
4. Відцентровий насос Alfa Laval LKH / LKHex. Офіційний сайт виробника Alfa laval [електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.alfalaval.ua/service-and-support/product-services/hygienic-pump-services/>

5. Система електродеіонізації MASTERpak™. Офіційний сайт виробника Месо [електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.meco.com/product/food-and-beverage-packaged-roedi/>
6. <https://www.lenntech.com/Data-sheets/Evoqua-ultra-clear-tp-en-ps-L.pdf>
7. VIQUA Sterilight VH150 [електронний ресурс] Режим доступу: VP950/2 <https://akvo.com.ua/ua/1697-viqua-sterilight-professional-vp9502-ultrafioletoviy-obezzarajivatel-vodyi>
8. Багатоступеневий дистилятор Senieer multi effect water distiller. Офіційний сайт виробника Senieer [електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.senieer.com/multi-effect-water-distiller/>
9. Центрифуги серії Clara виробництва Alfa laval. Офіційний сайт виробника Alfa laval [електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.alfalaval.ua/products/separation/centrifugal-separators/separators/clara/>
10. Hefei Huayun Machinery Manufacturing Co.,. Офіційний сайт [електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.gea.com/ru/products/homogenizers/laboratory-homogenizers/homogenizers-table-top/>
11. Промислові скляні реактори типу chemReactor BR/GR виробництва LPP Equipment Warsaw. Офіційний сайт виробника LPP Equipment Warsaw [електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.lpp-equipment.pl/en/products/reactors/glass-reactors/pilot-production/chemreactor-br-gr>
12. Насос 700 series виробництва Watson-Marlow. Офіційний сайт виробника Watson-Marlow [електронний ресурс] режим доступу: <https://www.wmfts.com/en/watson-marlow-pumps/cased-pumps/700-series-cased-pump/>
13. Горизонтальна осаджувальна промислова центрифуга виробництва Super manufacturer. Офіційний сайт виробника Super manufacturer <https://super-manufacturer.com/product/horizontal-spiral-centrifuge-for-sedimentation/>
14. Minimate™ Tangential Flow Filtration Capsule виробництва Pall. [електронний ресурс] Режим доступу: https://www.pall.com/content/dam/pall/japan/laboratory/literature-library/non-gated/PALL_MinimateTFF_Capsule_DataSheet_20-0326.pdf
15. Хроматографічна система АКТА виробництва Cytiva. Офіційний сайт виробника Cytiva [електронний ресурс] Режим доступу: https://www.cytivalifesciences.com/en/us/about-us/our-brands/akta?srsId=AfmBOoqXM07Ci_zaa8ozfcVYD6JGuxIfAcgorPi61V8HCmHDvBr-JOXk

РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА ФЕРИТИНУ

ДР 1. Підготовка води

ДР 1.1. Механічна фільтрація

Воду водопровідну фільтрують на механічному фільтрі (Ф1) з діаметром пор 5 мкм

ДР 1.2. Адсорбційне очищення (Дехлорування)

Фільтрат (від ДР 1.1) пропускають через проточний насипний вугільний фільтр (Ф4).

ДР 1.3. Пом'якшення

На-катіонування. Фільтрат (від ДР 2.1) подається на катіонну (К2) та аніонну (АК3) іонообмінні колонки

ДР 1.4. Зворотній осмос

Вода пом'якшена (від ДР 1.3) подається на систему зворотного осмосу (ЗО6), де очищується зворотнім осмосом через непористу дифузійну мембрану.

ДР 1.5. Електродеіонізація

Вода (від ДР 1.4) деіонізується за рахунок різниці потенціалів постійного електричного поля мембранного каналу модуля електродеіонізації (ЕД8).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пігн.</i>	<i>Дата</i>					
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>				<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протипухлинних засобів</i>		<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірів</i>	<i>Скроцька О.І.</i>							60	95
<i>Консульт.</i>					РОЗДІЛ 5. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНИХ СТАДІЙ ВИРОБНИЦТВА ФЕРИТИНУ		<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>									
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>								

ДР 1.6. УФ-опромінення

Вода (від ДР 1.5) стерилізується ультрафіолетовим опроміненням 10 хв.

ДР 1.7. Ультрафільтрація

Вода (від ДР 1.6) проходить подається на ультрафільтраційну установку з фільтром з діаметром пор 0,22 мкм

ДР 1.8. Дистиляція в багаторазовому дистиляторі

Вода очищена (від ДР 1.7) проходить 4-ступеневу дистиляцію в багаторазовому дистиляторі.

ДР 1.9. Зберігання та циркуляція

Вода для ін'єкцій безперервно циркулює за температури 70-80°C

ДР 2. Приготування буферів

ДР 2.1. Приготування буферу для ресуспендування

Для ресуспендування біомаси, що відділяють центрифугуванням, необхідно 6 л буферу наступного складу: 50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, pH 8.0.

Для приготування буферу на електронних вагах зважують 47,3 г порошку Tris-HCl та поміщають в реактор. Далі, на цих же вагах зважують 52,6 г порошку NaCl та поміщають в реактор, після чого зважують 2,2 г порошку EDTA та поміщають в реактор. У реактор додають 5,5 л води очищеної. Суміш перемішують 15 хв при температурі 50°C та доводять до 6 л додаванням води очищеної. Готовий буфер подається до ТП 4.1.

ДР 2.2. Приготування 5x буферу А

На електронних вагах зважують 6,3 г порошку Tris-HCl та засипають в колбу об'ємом 1л, після чого на електронних вагах зважують 5,8 г порошку NaCl і також засипають в цю ж колбу. Далі в колбу заливають 350 мл води очищеної,

та доводять об'єм розчину до 400 мл додаванням води очищеної. Суміш перемішують 15 хв при температурі 50°C. Готовий буфер подається до ТП 7.2

ДР 2.3. Приготування буферу А

150 мл 5х буферу А наливають в колбу об'ємом 1л та розводять додаванням 600 мл води очищеної. 250 мл буфера А подається до ТП 7.1., 500 мл буфера А подається до ТП 7.3.

ДР 2.4. Приготування буферу В

На електронних вагах зважують 2,42 г порошку Tris-HCl та засипають в колбу 2 л, після чого на електронних вагах зважують 58,44 г порошку NaCl та засипають в цю ж колбу. Далі в колбу заливають 900 мл води очищеної, та доводять об'єм розчину до 1 л додаванням води очищеної. Суміш перемішують 15 хв при температурі 50°C. Готовий буфер подається до ТП 7.4.

ТП 3. Відділення біомаси

ТП 3.1. Відділення біомаси

Культуральна рідина зі збірника подається у центрифугу (Ц14) продуктивністю 200 л/год, де центрифугується 40 хв за 10000 g.

Осаджена центрифугуванням біомаса автоматично відвантажується на дезінтеграцію (до ТП 4), супернатант - на знешкодження.

ТП 4. Дезінтеграція клітин Escherichia coli

ТП 4.1. Попередній підігрів

Буфер для ресуспендування (від ДР 2.1) розігрівають до 45-50°C та подають в гомогенізатор високого тиску

ТП 4.2. Механічна дезінтеграція клітин Escherichia coli

Біомаса подається на горизонтальний бісерний млин (Г15) і дезінтегрується 30-40 хв за швидкості обертання ротора 2500 об/хв. Температура +70-75 °C

ТП 5. Осадження супутніх білків та уламків клітин

ТП 5.1. Тепловий шок

Дезінтеграт подається в реактор з мішалкою та витримується впродовж 10 хв, за температури +70-75 °С з метою осадження супутніх білків.

ТП 5.2. Центрифугування

Дезінтеграт подають на горизонтальну осаджувальну промислову центрифугу (Ц18) і центрифугують 1 год при 16000 g. Супернатант подають на ТП 6, осад на знешкодження.

ТП 6. Виділення феритину з супернатанту

ТП 6.1. Самозбирання наносфер феритину

Дезінтеграт витримують в реакторі з мішалкою (Р20) впродовж 1 год, за температури +30 °С при рН 7, аби відбулося самозбирання наносфер феритину.

ТП 6.2. Тангенціальна ультрафільтрація

Супернатант подають на тангенціальну ультрафільтраційну (УФ21) установку касетного типу з мембранами на 100 і 500 кДа. Феритин залишається на мембрані 100 кДа, з якої вимивається зворотнім потоком.

ТП 7. Очищення феритину іоннообмінною хроматографією

ТП 7.1. Підготовка колонки (еквілібрація)

Колонка (ХК8) наповнюється діетиламіноетилцелюлозою (DEAE-Cellulose) до половини, після чого проводиться її промивання:

250 мл (5 колонкових об'ємів) дистильованої води

250 мл 1М розчину NaCl

250 мл буфера А (20 мМ Tris-HCl, 50 мМ NaCl, рН 7,5)

Об'єм колонки - 50 мл діаметр 16 мм (1,6 см), висота шару сорбенту 60 см

ТП 7.2. Підготовка зразка

1л розчину феритину, що надходить з ультрафільтраційної установки, змішується з 250 5х буферу А (100 мМ Tris-HCl, рН 7.5, 250 мМ NaCl). В результаті концентрація Tris-HCl та NaCl у розчині феритину буде рівною буферу А.

ТП 7.3. Завантаження в колонку

Розчин феритину подається на колонку.

Потік: 140-150 см/год. Контроль сигналу – УФ 280 нм ($OD_{280} > 0,3$).

Промивання 500 мл буферу А до моменту стабілізації фону.

Феритин (негативно заряджений) зв'язується з аніонообмінною смолою (DEAE-Cellulose).

ТП 7.4. Елюція

В колонку подається 1л буферу В (20 мМ Tris-HCl, 1 М NaCl, рН 7,5).

Гradient 50 мМ – 1 М (0-100% буферу В).

При $OD_{280} > 0.3$ (що фіксується ультрафіолетовим детектором) автоматично спрацьовує клапан, що подає очищений феритин з колонки на вакуум-випарювання (ТП 8.1). Інші фракції з колонки відправляють на знешкодження.

ТП 8. Концентрування

ТП 8.1 Вакуум випарювання

Елюат (від ТП 5.4) подається на вакуум-випарну установку (В 23). В ході вакуум-випарювання утворюється екстрапара, що йде на утилізацію та концентрат, що йде на зберігання.

ТП 8.2. Зберігання

Концентрат розчину феритину (від ТП 6.1) збирають в асептичний резервуар та зберігають у холодильній камері при температурі 3-5°C впродовж 2 тижнів.

РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ

6.1. Обґрунтування вибору кінцевої форми випуску та упаковки лікарського засобу

Згідно клінічних протоколів доксорубіцин має вводиться пацієнту внутрішньовенно крапельно (Клінічний протокол. Додаток до наказу МОЗ №554 від 17-09-2007). Враховуючи це, формою випуску протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу має бути розчин для інфузій. Відповідно формі випуску первинним пакуванням для даного лікарського засобу мають бути флакони (об'ємом 25 мл).

Оскільки під дією сонячного світла молекула доксорубіцину руйнується з утворенням токсичних для людського організму продуктів розпаду (Greco et al., 2023; Pugazhendhi et al., 2018), препарат, що містить доксорубіцин, має бути захищений від впливу світла, тож флакони мають бути виготовлені з темного скла.

Для скляних флаконів метод герметизації – встановлення гумової пробки, яку обжимають алюмінієвим ковпачком. Додатково для зручності зберігання та транспортування, а також додаткового захисту вмісту від впливу сонячного світла кожен флакон раціонально упакувати в індивідуальну картонну коробку. Крім того, така форма пакування дозволить розмістити інструкцію-вкладиш в одній упаковці з флаконом.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пізн.</i>	<i>Дата</i>	<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протипухлинних засобів</i>	<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>							65
<i>Перевірів</i>	<i>Скроцька О.І.</i>				РОЗДІЛ 6. ТЕХНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ОТРИМАННЯ ГОТОВОГО ПРОДУКТУ	<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт.</i>								
<i>Н. контр</i>								
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Доза доксорубіцину, рекомендована Міністерством Охорони Здоров'я України на 1 курс – 50 мг (Клінічний протокол. Додаток до наказу МОЗ №554 від 17-09-2007; Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги множинна мієлома; Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги неходжкінські лімфоми та лімфома Ходжкіна; Стандарт медичної допомоги рак шлунка).

1 флакон лікарського засобу розрахований на 1 курс лікування.

Отже, 1 флакон має містити 50 мг доксорубіцину та необхідну для його транспортування кількість феритину.

Оскільки, на 1 г доксорубіцину необхідно 2 г феритину, в 1 флаконі об'ємом 25 мл має бути 50 мг доксорубіцину (2 мг/мл) та 100 мг феритину (4 мг/мл).

6.2. Обґрунтування технологічних особливостей одержання розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу

Для виготовлення суміші з потрібною концентрацією компонентів необхідно виготовити рівні об'єми розчинів феритину та доксорубіцину вдвічі більшою концентрацією компонентів, тобто розчин феритину концентрацією 8 мг/мл і розчин доксорубіцину 4 мг/мл.

Оскільки за 1 ферментацію синтезується 1080 мг феритину, чого достатньо лише для 10 флаконів протипухлинного лікарського засобу, раціональним буде зберігання концентрованого розчину феритину, а приготування феритин-доксорубіцинового комплексу та його розлив у флакони проводити раз на 2 тижні. В такому разі передбачуваний об'єм виробництва становитиме 150 флаконів на один цикл роботи ділянки приготування та розливу феритин-доксорубіцинового комплексу, що

економічно ефективніше, ніж задіювати ділянку на кожен цикл роботи ферментера, тобто для виробництва 10 флаконів. Феритин зберігається впродовж 2-3 тижнів у формі концентрованого розчину за температури 3-4°C (Zou et al., В, 2016). Для більш тривалого зберігання знадобились би дорожчі методи, що знизило б економічну рентабельність виробництва, отже цикл в 2 тижні є оптимальним.

Враховуючи молекулярну масу молекули доксорубіцину, його включення в наносфери феритину можливе шляхом пасивної дифузії (Turiel-Fernández, Blanco-González, Corte-Rodríguez, Bettmer, & Montes-Bayón, 2020; Moon, Yoon, Lee, & Lee, 2022) і потреби в розбиранні та перезбиранні наносфер немає. Для забезпечення пасивної дифузії доксорубіцину в наносфери феритину необхідним є розширення пор наносфер, яке відбувається при підвищенні температури до 50-55°C (Deng et al., 2023).

Операції приготування та змішування розчинів мають відбуватися в приміщеннях, що відповідають класу чистоти В.

Наповнення та герметизація флаконів має відбуватись в зоні чистоти А, адже виготовляється ін'єкційний препарат, який має відповідати вимогам GMP до мікробіологічної чистоти.

Перед подачею в зону чистоти А (резервуар машини, в якій відбуватиметься розлив та укупорка) розчин комплексу має пройти стерилізацію ультрафільтрацією, для чого необхідний мембранний фільтр з діаметром по 0,22 мкм.

Вимоги до класу чистоти для кожного з технологічних процесів виготовлення кінцевої форми випуску протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу наведено в табл. 6.1

Розподіл технологічних процесів згідно класів чистоти

Клас чистоти	Процес
Клас чистоти В	ТП 9. Підготовка розчинів ТП 9.1. Приготування розчину феритину ТП 9.2. Приготування розчину доксорубіцину ТП 10. Приготування феритин-доксорубіцинового комплексу ТП 10.1. Змішування розчинів ТП 10.2. Пасивна дифузія
Зона чистоти А	ТП 10.3. Стерилізація ультрафільтрацією ТП 11. Розлив готового препарату у флакони ТП 11.1. Заповнення флаконів ТП 11.2. Встановлення гумової пробки ТП 11.3. Встановлення алюмінієвого ковпачка ТП 11.4. Обжимання алюмінієвого ковпачка

6.3. Матеріальний розрахунок на серію виробництва розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу

За одну ферментацію після виділення і очищення цільового продукту отримуємо 100 мл концентрованого розчину, що містить 1080 мг феритину. Цей розчин зберігається при температурі 3-5°C впродовж 2 тижнів. Приготування розчину для інфузій на основі феритин-доксорубіцинового комплексу проводиться раз на 2 тижні.

Кількість феритину, що використовується за один цикл приготування комплексу (тобто накопичений за 2 тижні), становить:

$$G_{\text{ф}} = 1080 \text{ мг} * 14 = 15120 \text{ мг феритину}$$

ТП 7. Підготовка розчинів

ТП 7.1. Приготування розчину феритину

Об'єм розчину феритину (8 мг/мл), що містить 15120 мг феритину, визначається з пропорції:

8 мг феритину – 1 мл розчину

15120 мг феритину – x

Об'єм розчину феритину $V_{\phi} = 1890$ мл розчину

ТП 7.2. Приготування розчину доксорубіцину

Кількість доксорубіцину, необхідна для приготування $V_{\text{DOX}} = 1890$ мл розчину доксорубіцину (4 мг/мл), визначається з пропорції:

4 мг доксорубіцину – 1 мл розчину

X – 1890 мл розчину

Кількість доксорубіцину на серію $G_{\text{DOX}} = 7560$ мг DOX

ТП 8. Приготування феритин-доксорубіцинового комплексу

ТП 8.1. Змішування розчинів

Об'єм розчину феритин-доксорубіцинового комплексу:

$$V_{\text{роз}} = V_{\phi} + V_{\text{DOX}} = 1890 \text{ мл} + 1890 \text{ мл} = 3780 \text{ мл}$$

Отримуємо 3780 мл розчину феритин-доксорубіцинового комплексу, що містить 7560 мг доксорубіцину (2 мг/мл) та 15120 мг феритину (4 мг/мл)

ТП 8.2. Пасивна дифузія

ТП 8.3. Стерилізація ультрафільтрацією

Втрати при фільтрації $E_{\phi} = 0,11 \%$

Об'єм профільтрованого розчину:

$$V = V_{\text{роз}} * (1 - E_{\text{ф}} / 100) = 3780 * (1 - 0,11/100) = 3775 \text{ мл}$$

$$\text{Втрати при фільтрації } V_{\text{втр}} = V_{\text{роз}} - V = 3780 - 3775 = 5 \text{ мл}$$

ТП 9. Розлив готового препарату у флакони

$$\text{Об'єм флаконів } V_{\text{фл}} = 25 \text{ мл}$$

Необхідна кількість флаконів в серії:

$$N_{\text{фн}} = V / V_{\text{фл}} = 3775 \text{ мл} / 25 \text{ мл} = 151 \text{ флакон}$$

Продуктивність машини заповнення та укупорки моделі FC-X40 по флаконам об'ємом 25 мл становить $N_{\text{маш}} = 30 \text{ фл/хв}$

$$\text{Час наповнення серії } t = N_{\text{фн}} / N_{\text{маш}} = 151 / 30 = 5 \text{ хв}$$

$$\text{Втрати при розливі в первинну упаковку } E_{\text{роз}} = 0,01 \%$$

Продуктивність наповнення флаконів з урахуванням втрат:

$$N_{\text{нвт}} = N_{\text{маш}} * (1 - E_{\text{роз}}/100) = 30 * (1 - 0,01/100) = 29,99 \text{ фл/хв}$$

Упакована кількість флаконів в серії:

$$N_{\text{фy}} = N_{\text{нвт}} * t = 29,99 * 5 = 149 \text{ флаконів}$$

Втрати при розливі в первинну упаковку:

$$N_{\text{вт}} = N_{\text{фн}} - N_{\text{фy}} = 151 - 149 = 2 \text{ флакона}$$

6.4. Специфікація обладнання для одержання розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу

Специфікація обладнання для процесів виготовлення кінцевої форми випуску протипухлинного препарату на основі феритин-доксорубіцинового комплексу представлена в табл. 6.2.

Специфікація обладнання

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
Р 25	Реактор з мішалкою	1	3L Jacketed Glass reactor. Матеріал – борсилікатне скло 3.3, об'єм 3 л, обладнаний спектрофотометром. Габаритні розміри 430*430*1100 Виробник Taiji [1]
Р 26	Реактор з мішалкою	1	3L Jacketed Glass reactor. Матеріал – борсилікатне скло 3.3, об'єм 3 л, обладнаний нефелометром. Габаритні розміри 430*430*1100 Виробник Taiji [1]
Р 27	Реактор з мішалкою	1	5L Jacketed Glass reactor. Матеріал – борсилікатне скло 3.3, об'єм 5 л, мішалка 600 об/с Габаритні розміри 450*450*1200 Виробник Taiji [1]
Н 28	Насос	1	Перистальтичний насос AS VX Продуктивністю 3,2-1280 л/год. Виробник Etatron D.C. Габаритні розміри 380*400*400 [2].
Ф 29	Мембранний фільтр	1	Sartorius Sartobran® P 0.2 µm Мембранний фільтр з поліетилсульфону Діаметр пор 0,22 мкм Виробник Sartorius Продуктивність 30 л/год Діаметр фільтра 67 мм Корпус – з'єднувач труб Tri-clamp Габаритні розміри 70*70*100 мм Виробник Sartorius [3].
М 30	Машина заповнення та укупорки	1	FC-X40 Vial Filling And Capping Machine, Продуктивність 30-50 флаконів/хв, Потужність - 2KW Маса 550 кг. Габаритні розміри 1800*1000*1500 мм Виробник Micmachinery [4].

Сайти виробників обладнання:

1. Виробник Micmachinery. Офіційний сайт. [електронний ресурс] Режим доступу: https://www.micmachinery.com/nail-polishfillingmachine-16479324705530719.html?_gl=1*267md3*_up*MQ..*_gs*MQ..&gclid=Cj0KCQjwrJTGBhCbARIsANFBfgsyrZsT9645P_pK9d5ndZTIWYGHxEzlc9Ximyx0_0HMT22r2cnaOCAaAowNEALw_wcB&gbraid=0AAAAABp8bGTVozKjpDYuAdq8c-U7dVI0F
2. Виробник Etatron D.C. [електронний ресурс] Режим доступу: https://www.etatron.com.ua/chemical_pump/peristaltic_pump/as/as_vx/
3. Виробник Sartorius. Офіційний сайт. [електронний ресурс] Режим доступу: <https://www.sartorius.hr/media/lp3d34yv/sartobranp-datasheet-en-b-spk2164-sartorius.pdf>
4. Виробник Taiji. Офіційний сайт. [електронний ресурс] Режим доступу: https://www.taiji-glasslined.com/glass-lined-reactor/?gad_source=1&gad_campaignid=21859351566&gbraid=0AAAAA-V8Ov5xgIFNALXIAUv9egEij93-h&gclid=CjwKCAjwlt7GBhAvEiwAKal0cmhjp7HGY2P4K7BDIedddUTH6_F-KBB-pmp0b155bzYgQ_9gJKWhTRoCZqsQAvD_BwE

6.5. Опис технологічної схеми виробництва розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу

ТП 9. Підготовка розчинів

ТП 9.1. Приготування розчину феритину

Розчин, отриманий в результаті вакуум випарювання (від ТП 8), доводять до концентрації феритину 8 мг/мл водою для ін'єкцій. Концентрацію контролюють за допомогою спектрофотометра.

ТП 9.2. Приготування розчину доксорубіцину

7 560 мг порошку доксорубіцину розчиняють в 1500 мл води для ін'єкцій та доводять до концентрації 4 мг/мл. Концентрацію контролюють за допомогою нефелометра.

ТП 10. Приготування феритин-доксорубіцинового комплексу

ТП 10.1. Змішування розчинів

Розчин феритину (від ТП 9.1) і розчин доксорубіцину (від ТП 9.2) змішують у реакторі (Р25) у співвідношенні 1:1.

ТП 10.2. Пасивна дифузія

Суміш розчинів (від ТП 8.1) підігрівають у реакторі (Р26) до 50-55°C і витримують за цієї температури 3 год.

ТП 10.3. Стерилізація ультрафільтрацією

Розчин (від ТП 10.2) фільтрують за допомогою тангенціальної ультрафільтраційної установки з мембранним фільтром з діаметром пор 0,22 мкм, після чого подають в резервуар машини заповнення та укупорки (М30).

ТП 11. Розлив готового препарату у флакони

ТП 11.1. Заповнення флаконів

В кожен флакон об'ємом 25 мл заливається 25 мл розчину (від ТП 10.3).

ТП 11.2. Встановлення гумової пробки

Гумова пробка встановлюється в горло флакона.

ТП 11.3. Встановлення алюмінієвого ковпачка

Алюмінієвий ковпачок одягається поверх пробки.

ТП 11.4. Обжимання алюмінієвого ковпачка

Алюмінієвий ковпачок обжимається кримпером, щільно фіксуючи ковпачок та герметизуючи флакон.

ПМВ 12. Пакування і маркування

ПМВ 12.1. Наклеювання етикеток на флакони

На кожен флакон наклеюється етикетка, на якій вказується:

- Назва продукту
- Назва підприємства
- Дата виготовлення
- Номер партії
- Склад

ПМВ 12.2. Пакування флаконів в коробки

Кожен флакон кладуть в індивідуальну картонну коробку і вкладають інструкцію-вкладиш.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Методи контролю виробництва розчину наносфер феритину

1. Ідентифікація та визначення кількісного вмісту феритину.

Проводиться за допомогою УФ-спектроскопії на довжині хвилі 280 нм (Sun et al., 2016; Qu et al., 2020; European Pharmacopoeia, 11th Edition, Розділ 2.2.25).

Методика проведення. Зразок (1 мл розчину) поміщають в кювету товщиною 1 см. За допомогою УФ-спектроскопії визначається оптична густина на довжині хвилі від 200-400 нм. Пік при 280 нм свідчить про те, що досліджувана речовина є феритином (ідентифікація). Для кількісного визначення вимірюється оптична густина при довжині хвилі 280 нм (OD280). Концентрація феритину розраховується за формулою $OD280/\epsilon$, де ϵ – молярний коефіцієнт поглинання, що для феритину дорівнює 1,065 (Sun et al., 2016; Qu et al., 2020).

2. Випробування на фізико-хімічні властивості. Феритин має бути у формі наносфер діаметром 12 нанометрів. Контроль проводиться за допомогою DLS (динамічне розсіювання світла) та електронної мікроскопії (Sevieri et al., 2024; Gu et al., 2020).

3. Випробування на стерильність. Проводиться шляхом фільтрації зразка через стерильний мембранний фільтр, в результаті чого усі мікроорганізми, наявні в зразку, затримуються на фільтрі, після чого фільтр інкубують на поживному середовищі (Державна фармакопея України, 1-е видання, Розділ 5.1.4).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пізн.</i>	<i>Дата</i>				
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>				<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протипухлинних засобів</i>	<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Скороцька О.І.</i>						75	95
<i>Консульт.</i>					РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>								
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

Методика проведення. Зразок фільтрують через стерильний мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. Після цього здійснюється інкубація фільтра на поживному середовищі TFM – для анаеробних мікроорганізмів та TSB – для аеробних, впродовж 24 год при 30°C. Поява хоча б однієї колонії свідчить про нестерильність, а отже непридатність до застосування в складі ін'єкційного препарату (European Pharmacopoeia, 11th Edition, Розділ 2.6.1; Державна фармакопея України, 1-е видання, Розділ 5.1.4).

4. Випробування на хімічну чистоту. Допустимий вміст сторонніх речовин для субстанції, призначеної для виготовлення ін'єкційного препарату, до 1%, а кожна стороння речовина у зразку не має перевищувати 0,1% від маси зразка (European Pharmacopoeia, 11th Edition, Розділ 2.4).

Визначення проводиться за допомогою SEC (Size exclusive chromatography). Принцип методу полягає в розділенні речовин в хроматографічній колонці за їхнім розміром – великі молекули елюються першими, малі останніми (European Pharmacopoeia, 11th Edition, Розділ 2.4).

Методика проведення. 10 мкл зразка розчиняють в 90 мкл 50 мМ фосфатного буфера (рН 7) та подають на SEC-хроматографічну колонку. Швидкість потоку 0,1 мл/хв, $t=20-25^{\circ}\text{C}$, об'єм ін'єкції 20 мкл. Проводиться мінімум 3 ін'єкції. Наявність домішок (сторонніх речовин) реєструють за допомогою УФ-детектора на довжині хвилі 280 нм (European Pharmacopoeia, 11th Edition, Розділ 2.4).

7.2. Методи контролю розчину для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу

1. Опис. Прозорий розчин червоного кольору.

2. Прозорість. Визначається оптично згідно ДФУ, вид. 1, р2.2.3 (Державна фармакопея України, 1-е видання, Розділ 2.2.3).

3. Автентичність. Проводиться за допомогою УФ-спектроскопії на довжині хвилі 280 нм (Sun et al., 2016; Qu et al., 2020; European Pharmacopoeia, 11th Edition, Розділ 2.2.25).

Методика проведення. Зразок (1 мл розчину) поміщають в кювету товщиною 1 см. За допомогою УФ-спектроскопії визначається оптична густина на довжині хвилі від 200-400 нм. Пік при 280 нм свідчить про те, що досліджувана субстанція містить наносфери феритину.

Для ідентифікації доксорубіцину у складі комплексу застосовується реакція з аргентум нітратом.

Методика проведення. До 5 мл проби додають 0,5 мл азотної кислоти та нагрівають на полум'ї протягом 2 хв. Одержаний розчин витримують до охолодження, після чого додають 0,5 мл розчину аргентум нітрату. Якщо в комплексі присутній доксорубіцин - утворюється білий осад.

4. Випробування на пірогенність. Здійснюється за допомогою LAL-тесту. Принцип методу полягає в тому, що LAL-реактив (Limulus amoebocyte lysate, який є витяжкою з клітин крові мечохвоста виду *Limulus polyphemus*) взаємодіє з бактеріальними ендотоксинами, які є причиною пірогенності препарату (Pasqua et al., 2021).

Методика проведення. LAL-тест проводиться змішуванням зразка з LAL-реактивом та інкубацією при $t=30^{\circ}\text{C}$ впродовж 1 год. Утворення гелю свідчить про наявність ендотоксинів, а отже пірогенність і непридатність до застосування в складі ін'єкційного препарату (Pasqua et al., 2021; European Pharmacopoeia, 11th Edition, Розділ 2.6.14).

5. Випробування на стерильність. Проводиться шляхом фільтрації зразка через стерильний мембранний фільтр, в результаті чого усі мікроорганізми, наявні в зразку, затримуються на фільтрі, після чого фільтр інкубують на поживному середовищі (Державна фармакопея України, 1-е видання, Розділ 5.1.4).

Методика проведення. Зразок фільтрують через стерильний мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. Після цього здійснюється інкубація фільтра на поживному середовищі TFM – для анаеробних мікроорганізмів та TSB – для аеробних, впродовж 24 год при 30°C. Поява хоча б однієї колонії свідчить про нестерильність, а отже непридатність до застосування в складі ін'єкційного препарату (European Pharmacopoeia, 11th Edition, Розділ 2.6.1; Державна фармакопея України, 1-е видання, Розділ 5.1.4).

6. Контроль герметичності флакона. Оскільки вміст флаконів не безбарвний, метод випробування на герметичність за допомогою барвника не є інформативним, тож раціонально буде застосувати вакуумний контроль герметичності. Даний метод є неруйнівним і може бути застосований до кожного флакона серії.

Методика проведення. Флакон поміщають у вакуумну камеру, після чого герметично закривають кришку камери та викачують з вакуумної камери повітря за допомогою насоса до досягнення тиску в 400 мбар. Після вимкнення насоса моніторять тиск впродовж 60 с за допомогою барометра. Якщо тиск залишається стабільним – флакон герметичний. Якщо тиск зростає – є витік з флакона, а значить флакон не герметичний.

РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ
СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ФЕРИТИНУ З
КЛІТИН БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА *ESCHERICHIA COLI*

8.1. Галузь і застосування корисної моделі

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується виділення та очищення рекомбінантного феритину, синтезованого біологічним агентом *Escherichia coli* BL21(DE3), для його застосування в складі протипухлинних препаратів в якості засобу цільової доставки хіміотерапевтичних речовин.

8.2. Відомі аналоги та їх основні недоліки

Відомим способом дезінтеграції клітин *Escherichia coli* BL21(DE3) для виділення та очищення рекомбінантних білків є ферментативний лізис (Kim, Bang, & Choi, 2022). Цей метод застосовується, аби не пошкодити вторинну структуру білка. Але його основним недоліком є матеріальні затрати на приготування буферу, а отже висока собівартість кінцевого продукту. Іншим недоліком даного методу є складність утилізації рідких відходів, пов'язана з необхідністю знешкодження компонентів літичного буфера.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення (найближчий аналог) є спосіб дезінтеграції клітин бісерним млином за підтримання сталої температури (Zhu, Xie, Jiang, Wang, Fan, & Zhang, 2022).

Недоліком цього методу є енерговитрати спочатку на охолодження млина, а потім на підігрів до температури теплового шоку.

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>				
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пізн.</i>	<i>Дата</i>					
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>				<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протипухлинних засобів</i>		<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Перевірив</i>	<i>Скороцька О.І.</i>							79	95
<i>Консульт.</i>					РОЗДІЛ 8. ПРОЕКТ ЗАЯВКИ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ		<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Н. контр</i>									
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>								

8.3. Постановка задачі корисної моделі та її вирішення

В основу корисної моделі поставлено задачу по оптимізації виділення та очищення феритину, а саме зниження фінансових та енергетичних витрат на дезінтеграцію клітин *Escherichia coli* та тепловий шок дезінтеграту.

Шляхом вирішення поставленої задачі є механічна дезінтеграція з попереднім нагрівом. Феритин не руйнується при механічній дезінтеграції та є термостабільною сполукою, що здатна витримувати температури до 75°C. Крім того, технологія виділення і очищення феритину включає тепловий шок – інкубацію дезінтеграту за високої температури з метою осадження супутніх білків. Нагрів до 45-50°C сприяє полегшенню руйнування клітинної стінки, що знизить енерговитрати на роботу бісерного млина. Крім того, млин під час роботи виділяє тепло, що зазвичай компенсується системами охолодження, але в даному випадку вирішенням поставленої задачі буде дати вмісту млина нагрітися до температури 70-75°C, що зекономить електроенергію як на роботу охолоджувальної системи, так і на нагрів для теплового шоку. Для теплового шоку достатньо буде підтримувати сталу температуру уже нагрітого роботою млина дезінтеграту.

8.4. Опис запропонованого способу

Біомасу *Escherichia coli* BL21(DE3) виділяють з культуральної рідини, відділяють центрифугуванням та подають на бісерний млин, у який попередньо подається буфер для ресуспендування (Tris-HCl, pH 7.5–8.0 - 20–50 mM, NaCl - 100–150 mM), розігрітий до 45-50°C для полегшення руйнування клітинної стінки. Механічна дезінтеграція проводиться впродовж 30-60 хв за тиску 1500 бар. Система охолодження млина не вмикається, поки не буде досягнута температура 70°C за рахунок теплової енергії, що виділяється при роботі млина, після чого температура має підтримуватися в межах 70-75°C. По завершенню дезінтеграції дезінтеграт подається в реактор, де інкубується 10 хв за температури 70-75°C (тепловий шок) для осадження супутніх білків. Після теплового шоку дезінтеграт подається на горизонтальну

центрифугу і нерозчинні білки та фрагменти клітин відокремлюють центрифугуванням впродовж 30 хв, при 16000 g за температури 4 °С. Феритин залишається в супернатанті, звідки його можна очистити мембранною фільтрацією та іонообмінною хроматографією.

8.5. Формула корисної моделі

Спосіб виділення рекомбінантного феритину з клітин *Escherichia coli* BL21(DE3), що включає дезінтеграцію клітин, осадження супутніх білків та виділення рекомбінантного феритину, який відрізняється тим, що:

- Перед механічною дезінтеграцією бісерним млином здійснюють попередній підігрів до 45-50°C.
- Тепло, що виділяється при роботі бісерного млина, використовується для досягнення температури, необхідної для проведення теплового шоку (теплового осадження супутніх білків).

8.6. Реферат

Корисна модель належить до біотехнології та стосується способу виділення рекомбінантного феритину, що включає дезінтеграцію бісерним млином клітин *Escherichia coli* BL21(DE3) з попереднім підігрівом до 45-50°C та використання тепла, що виділяється під час дезінтеграції, для досягнення температури 70-75°C, необхідної для теплового шоку (теплового осадження супутніх білків).

ВИСНОВКИ

В ході виконання дипломного проекту було розроблено технологію промислового отримання наносфер рекомбінантного людського феритину для використання в складі протипухлинного препарату в якості засобу цільової доставки доксорубіцину. Враховуючи, що одна наносфера феритину здатна транспортувати 400 молекул доксорубіцину, в ході роботи було розроблено розчин для інфузій на основі протипухлинного феритин-доксорубіцинового комплексу, що містить компоненти у співвідношенні 2 г феритину на 1 г доксорубіцину. Отриманий протипухлинний комплекс має в чотири рази нижчу побічну дію відносно класичних хіміотерапевтичних препаратів доксорубіцину.

Спроектовані в даному проекті промислові потужності розраховані на виробництво 360 г феритину на рік, що достатньо, аби забезпечити протипухлинним препаратом з цільовою доставкою доксорубіцину за допомогою наносфер феритину покриття 10% вітчизняного ринку хіміотерапевтичних препаратів доксорубіцину.

Завдяки застосуванню таких методів виділення та очищення феритину як тепловий шок, тангенціальна ультрафільтрація та іоннообмінна хроматографія вдалося досягти належної хімічної чистоти для ін'єкційного препарату за відносно невисоких втрат феритину (40%).

					<i>НУХТ БТЕК 02.01.11 КР ПЗ</i>			
<i>Зм</i>	<i>Арк</i>		<i>Пізн.</i>	<i>Дата</i>	<i>Рекомбінантні феритини у нанобіотехнологіях протипухлинних засобів</i>	<i>Літ</i>	<i>Арк</i>	<i>Аркушів</i>
<i>Розроб</i>	<i>Вербіян В.М.</i>							82
<i>Перевірів</i>	<i>Скроцька О.І.</i>				ВИСНОВКИ	<i>Кафедра БТМ</i>		
<i>Консульт.</i>								
<i>Н. контр</i>								
<i>Затверг.</i>	<i>Стабніков В.П.</i>							

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Державна Фармакопея України, 1-е вид, 2001 р.

Доксорубіцин. Компендіум [електронний ресурс] режим доступу: <https://compendium.com.ua/akt/68/3152/doxorubicinum/>

Клінічний протокол. Додаток до наказу МОЗ №554 від 17-09-2007. Вид допомоги: амбулаторний, стаціонарний, цільова група: не вказано. Напрямок медицини: Онкологія. Клінічний стан, патології: Рак яєчника [електронний ресурс] режим доступу: <http://medstandart.net/browse/2564>

Метастатичний рак молочної залози. клінічна настанова, заснована на доказах [електронний ресурс] режим доступу: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2025/02/kn_2025_metastatychnyj-rmz.pdf

Національний інститут раку. Локальний протокол медичної допомоги та клінічний маршрут хворих на рак сечового міхура [електронний ресурс] режим доступу: https://unci.org.ua/wp-content/uploads/2021/04/7.3_21_protocol_unci.org_ua_.doc

Національний канцер реєстр України [електронний ресурс] режим доступу: http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/

Стандарт медичної допомоги рак шлунка [електронний ресурс] режим доступу: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2023/12/smd_rsh_2052_05122023.pdf

Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги множинна мієлома [електронний ресурс] режим доступу: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2015_710_ukpmd_mm.pdf

Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої), третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги

неходжкінські лімфоми та лімфома Ходжкіна [електронний ресурс] режим доступу: https://www.dec.gov.ua/wp-content/uploads/2019/11/2013_866_ukpmd_limfomy.pdf

Baindara P., Gautam A., Raghava P.S., Korpole S., (2017). Anticancer properties of a defensin like class IId bacteriocin Laterosporulin10. *Sci. Rep.*, 7: 46541. doi: 10.1038/srep46541.

Botlagunta M., Kollapalli B., Kakarla L., Gajarla S.P., Gade S.P., Dadi C.L., Penumadu A., Javeed S, (2016). *In vitro* anti-cancer activity of doxorubicin against human RNA helicase, DDX3. *Bioinformation*. 12 (7): 347-353. doi: 10.6026/97320630012347.

Buranrat, B., & Connor, J. R. (2015). Cytoprotective effects of ferritin on doxorubicin-induced breast cancer cell death. *Oncology reports*, 34(5), 2790-2796. doi:10.3892/or.2015.4250

Carmona, F., Poli, M., Bertuzzi, M., Gianoncelli, A., Gangemi, F., & Arosio, P. (2017). Study of ferritin self-assembly and heteropolymer formation by the use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) technology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(3), 522–532. doi:10.1016/j.bbagen.2016.12.011

Crich, S. G., Cadenazzi, M., Lanzardo, S., Conti, L., Ruiu, R., Alberti, D., ..., & Aime, S. (2015). Targeting ferritin receptors for the selective delivery of imaging and therapeutic agents to breast cancer cells. *Nanoscale*, 7(15), 6527–6533. doi:10.1039/c5nr00352k

De Llanos, R., Martínez-Garay, C. A., Fita-Torró, J., Romero, A. M., Martínez-Pastor, M. T., & Puig, S. (2016). Soybean Ferritin Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Modulates Iron Accumulation and Resistance to Elevated Iron Concentrations. *Applied and environmental microbiology*, 82(10), 3052-3060. doi: 10.1128/AEM.00305-16

Deng, G., Li, Y., Liang, N., Hu, P., Zhang, Y., Qiao, L., ... Zhang, J. (2023). Ferritin in cancer therapy: A pleiotropic tumoraffin nanocage-based transport. *Cancer Medicine*, 12(10), 11570-11588. doi: 10.1002/cam4.5778

Diels, A. M., Callewaert, L., Wuytack, E. Y., Masschalck, B., & Michiels, C. W. (2004). Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenization only through fluid viscosity. *Biotechnology progress*, 20(5), 1512-1517. doi:10.1021/bp0499092

Dong, X., Tang, B., Li, J., Xu, Q., Fang, S., & Hua, Z. (2008). Expression and purification of intact and functional soybean (*Glycine max*) seed ferritin complex in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(2), 299-307. doi: koreascience.kr/article/JAKO200832642388751.page

Duman-Özdamar Z. E., & Binay B. (2021) Production of Industrial Enzymes via *Pichia pastoris* as a Cell Factory in Bioreactor: Current Status and Future Aspects. *The Protein Journal*, 40, 367-376. doi: 10.1007/s10930-021-09968-7

European Pharmacopoeia, 11th Edition, 2022

Fan, K., Jia, X., Zhou, M., Wang, K., Conde, J., He, J., ... Yan, X. (2018). Ferritin nanocarrier traverses the blood brain barrier and kills glioma. *ACS nano*, 12(5), 4105-4115. doi:10.1021/acsnano.7b06969

García, J., Fernández, D., Álvarez, E., González, E., Montes-Bayón, M., & Sanz-Medel, A. (2016). Iron speciation, ferritin concentrations and Fe: ferritin ratios in different malignant breast cancer cell lines: on the search for cancer biomarkers. *Metallomics*, 8(10), 1090-1096. doi:10.1039/c6mt00100a

Greco, G., Ulfo, L., Turrini, E., Marconi, A., Costantini, P. E., Marforio, T. D., ... Calvaresi, M. (2023). Light-enhanced cytotoxicity of doxorubicin by photoactivation. *Cells*, 12(3), 392. doi:10.3390/cells12030392

Gu, C., Zhang, T., Lv, C., Liu, Y., Wang, Y., & Zhao, G. (2020). His-mediated reversible self-assembly of ferritin nanocages through two different switches for encapsulation of cargo molecules. *ACS nano*, 14(12), 17080-17090. doi:10.1021/acsnano.0c06670

Guo, L., Sun, J., Wang, C., Wang, Y., Wang, Y., Li, D., & Li, Y. (2022). Epirubicin Enhances the Anti-Cancer Effects of Radioactive ¹²⁵I Seeds in Hepatocellular Carcinoma via Downregulation of the JAK/STAT1 Pathway. *Frontiers in Oncology*, 12, 854023. doi: 10.3389/fonc.2022.854023

Jiang, B., Zhang, R., Zhang, J., Hou, Y., Chen, X., Zhou, M., ... Yan, X. (2019). GRP78-targeted ferritin nanocaged ultra-high dose of doxorubicin for hepatocellular carcinoma therapy. *Theranostics*, 9(8), 2167–2182. doi:10.7150/thno.30867

Johnson-Arbor, K., & Dubey, R. (2017). Doxorubicin.

Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., Celik, I., & Kontek, R. (2023). Doxorubicin—an agent with multiple mechanisms of anticancer activity. *Cells*, 12(4), 659. doi:10.3390/cells12040659

Kim S. H., Bang J. H., Choi M. H. (2022). Method for expressing and purifying protein by using csq-tag. (US patent No. 20220235106A1) Korea Institute Of Ceramic Engineering And Technology.

Kim, J. S. (2016). Liposomal drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical investigation*, 46, 387-392. doi:10.1007/s40005-016-0260-1

Li, L., Zhang, L., & Knez, M. (2016). Comparison of two endogenous delivery agents in cancer therapy: Exosomes and ferritin. *Pharmacological Research*, 110, 1–9. doi: 10.1016/j.phrs.2016.05.006.

Li, Y., Wang, X., Yan, J., Liu, Y., Yang, R.-L., Pan, D.-H., ... Yang, M. (2019). Nanoparticle Ferritin-bound Erastin and Rapamycin: A Nanodrug

Combined Autophagy and Ferroptosis for Anticancer Therapy. *Biomaterials Science*. doi:10.1039/c9bm00653b

Liang, M., Fan, K., Zhou, M., Duan, D., Zheng, J., Yang, D., ... Yan, X. (2014). H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), 14900–14905. doi:10.1073/pnas.1407808111

Liu, Q., Wang, C., Zhu, M., Liu, J., Duan, Q., Midgley, A. C., ... Huang, X. (2024). Self-Assembly of Heterogeneous Ferritin Nanocages for Tumor Uptake and Penetration. *Advanced Science*, 11(17), 2309271. doi:10.1002/advs.202309271

Luu, A. Z., Chowdhury, B., Al-Omran, M., Teoh, H., Hess, D. A., & Verma, S. (2018). Role of endothelium in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(6), 861-870. doi:10.1016/j.jacbts.2018.06.005

MacWilliams, M. P., & Liao, M. K. (2006). Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol. *ASM MicrobeLibrary. American Society for Microbiology*, 2006, 1-4. <https://asm.org/getattachment/5d82aa34-b514-4d85-8af3-aeabe6402874/LB-Luria-Agar-protocol->

Manz, D. H., Blanchette, N. L., Paul, B. T., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2016). Iron and cancer: recent insights. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1368(1), 149-161. doi:10.1111/nyas.13008

Masuda, T., Goto, F., Yoshihara, T., Ezure, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., ... Utsumi, S. (2007). Construction of homo- and heteropolymers of plant ferritin subunits using an in vitro protein expression system. *Protein Expression and Purification*, 56(2), 237–246. doi:10.1016/j.pep.2007.07.011

Matsumura, Y. (2021). Barriers to antibody therapy in solid tumors, and their solutions. *Cancer Science*, 112(8), 2939-2947. doi:10.1111/cas.14983

Men, D., Zhang, T. T., Hou, L. W., Zhou, J., Zhang, Z. P., Shi, Y. Y., ... Zhang, X. E. (2015). Self-assembly of ferritin nanoparticles into an enzyme nanocomposite with tunable size for ultrasensitive immunoassay. *ACS nano*, 9(11), 10852-10860. doi: 10.1021/acsnano.5b03607

Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(6), 729-741. doi:10.1111/jphp.12539

Mohanty, A., K. M., Jena, S. S., & Behera, R. K. (2021). Kinetics of ferritin self-assembly by laser light scattering: Impact of subunit concentration, pH, and ionic strength. *Biomacromolecules*, 22(4), 1389-1398. doi: 10.1021/acs.biomac.0c01562

Mohanty, A., Parida, A., Raut, R. K., & Behera, R. K. (2022). Ferritin: a promising nanoreactor and nanocarrier for bionanotechnology. *ACS bio & med chem Au*, 2(3), 258-281. doi: 10.1021/acsbiochemau.2c00003

Monti, D. M., Ferraro, G., & Merlino, A. (2019). Ferritin-based anticancer metallodrug delivery: Crystallographic, analytical and cytotoxicity studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 20, 101997. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.04.001>

Moon, O. J., Yoon, C. J., Lee, B. R., & Lee, J. (2022). An optimally fabricated platform guides cancer-specific activation of chemotherapeutic drugs and toxicity-free cancer treatment. *Advanced Healthcare Materials*, 11(15), 2200765. doi: 10.1002/adhm.202200765

O'Dowd, P. D., Sutcliffe, D. F., & Griffith, D. M. (2023). Oxaliplatin and its derivatives—An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 497, 215439. doi:10.1016/j.ccr.2023.215439

Olusanya, T. O., Haj Ahmad, R. R., Ibegbu, D. M., Smith, J. R., & Elkordy, A. A. (2018). Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules*, 23(4), 907. doi: 10.3390/molecules23040907

Pasqua, S., Niotta, M. C., Di Martino, G., Sottile, D., Douradinha, B., Miele, M., ... D'Apolito, D. (2021). Complete intra-laboratory validation of a LAL assay for bacterial endotoxin determination in EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, 22, 320-329. doi: 10.1016/j.omtm.2021.05.002

Pioli, P. D. (2019). Protocol: Luria-Bertani (LB) Media/Broth Recipe. Western Michigan University. [Электронный ресурс] – режим доступа: https://www.med.wmich.edu/sites/default/files/Pioli_Lab_LB_Media_Recipe.pdf

Plays, M., Müller, S., & Rodriguez, R. (2021). Chemistry and biology of ferritin. *Metallomics*, 13(5), mfab021. doi: 10.1093/mtomcs/mfab021

Pugazhendhi, A., Edison, T. N. J. I., Velmurugan, B. K., Jacob, J. A., & Karuppusamy, I. (2018). Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life sciences*, 200, 26-30. doi:10.1016/j.lfs.2018.03.023

Qu Z., Li M., Guo Y., Liu Y., Wang J., & Gao M. (2020). Expression, purification, and characterisation of recombinant ferritin in insect cells using the baculovirus expression system. *Biotechnology Letters*, 42, 57–65. doi: 10.1007/s10529-019-02755-6

Sato, D., Ohtomo, H., Yamada, Y., Hikima, T., Kurobe, A., Fujiwara, K., & Ikeguchi, M. (2016). Ferritin assembly revisited: a time-resolved small-angle X-ray scattering study. *Biochemistry*, 55(2), 287-293. doi: 10.1021/acs.biochem.5b01152

Sevieri, M., Andreatta, F., Mainini, F., Signati, L., Piccotti, F., Truffi, M., ... Mazzucchelli, S. (2024). Impact of doxorubicin-loaded ferritin nanocages

(FerOX) vs. free doxorubicin on T lymphocytes: a translational clinical study on breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 184.) doi:10.1186/s12951-024-02441-4

Song X., Zheng Y., Liu Y., Meng H., Yu R., & Zhang C. (2022). Conversion of recombinant human ferritin light chain inclusion bodies into uniform nanoparticles in *Escherichia coli* for facile production. *Engineering in Life Sciences*, 22(6), 437-470. doi: 10.1002/elsc.202100164

Song, X., Zheng, Y., Zhu, L., Zhang, L., Meng, H., Yu, R., & Zhang, C. (2021). Development of robust and facile purification process for production of recombinant human ferritin heavy chain nanoparticle from *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 104, 1-9. doi:10.1016/j.procbio.2021.02.014

Srivastava, A. K., Scalcione, L. J., Arosio, P., & Bou-Abdallah, F. (2023). Hyperthermostable recombinant human heteropolymer ferritin derived from a novel plasmid design. *Protein Science*, 32(1), e4543. doi: 10.1002/pro.4543

Sun, W., Jiao, C., Xiao, Y., Wang, L., Yu, C., Liu, J., ... Wang, L. (2016). Salt-dependent aggregation and assembly of *E coli*-expressed ferritin. *Dose-Response*, 14(1), 1559325816632102. doi:10.1177/1559325816632102

Turiel-Fernández, D., Blanco-González, E., Corte-Rodríguez, M., Bettmer, J., & Montes-Bayón, M. (2020). Analytical strategies to study the formation and drug delivery capabilities of ferritin-encapsulated cisplatin in sensitive and resistant cell models. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi:10.1007/s00216-020-02549-0

Wang, C., Zhang, C., Li, Z., Yin, S., Wang, Q., Guo, F., ... Su, Z. (2018). Extending half life of H-ferritin nanoparticle by fusing albumin binding domain for doxorubicin encapsulation. *Biomacromolecules*, 19(3), 773-781.

Wang, Z., Xu, X., Zhu, Y., Qian, Y., Feng, Y., Li, H., & Hu, G. (2024). Preparation and brain targeting effects study of recombinant human ferritin

nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 712, 149939. doi:10.1016/j.bbrc.2024.149939

World Health Organization. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>

World Health Organization. The top 10 causes of death. [Электронный ресурс] – режим доступа: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Yang, F., Mariz, F. C., Zhao, X., Spagnoli, G., Ottonello, S., & Müller, M. (2020). Broad neutralization responses against oncogenic human papillomaviruses induced by a minor capsid L2 polytope genetically incorporated into bacterial ferritin nanoparticles. *Frontiers in Immunology*, 11, 606569. doi: 10.3389/fimmu.2020.606569

Zhang, S., Zang, J., Chen, H., Li, M., Xu, C., & Zhao, G. (2017). The size flexibility of ferritin nanocage opens a new way to prepare nanomaterials. *Small*, 13(37), 1701045. doi: 10.1002/smll.201701045

Zhang, S., Zang, J., Wang, W., Chen, H., Zhang, X., Wang, F., ... Zhao, G. (2016). Conversion of the native 24-mer ferritin Nanocage into its non-native 16-mer analogue by insertion of extra amino acid residues. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(52), 16064-16070. doi: 10.1002/anie.201609517

Zhu J., Xie Y., Jiang H., Wang Z., Fan B., & Zhang N. (2022). Production method for protein and use thereof. (US patent No. 2023093826A1). Beijing Ruiheng Xinda Intellectual Property Agency (General Partnership).

Zhu, L., You, Y., Zhu, M., Song, Y., Zhang, J., Hu, J., ... Ji, J. (2022). Ferritin-Hijacking Nanoparticles Spatiotemporally Directing Endogenous

Ferroptosis for Synergistic Anticancer Therapy. *Advanced Materials*, 34(51), 2207174. doi:10.1002/adma.202207174

Zou, W., Liu, X., Chen, D., Wang, J., Zhao, X., Li, J., ... Hua, Z. (2016). Expression, purification, and characterization of recombinant human H-chain ferritin. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(8), 833-837. (B) doi:10.1080/10826068.2016.1141300

Zou, W., Liu, X., Zhao, X., Wang, J., Chen, D., Li, J., ... Hua, Z. (2016). Expression, purification, and characterization of recombinant human L-chain ferritin. *Protein Expression and Purification*, 119, 63-68. (A) doi: 10.1016/j.pep.2015.11.018

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ

Тези у збірниках міжнародних конференцій:

1. Матеріали 91-ї Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті" (м. Київ, НУХТ, 7–11 квітня 2025 р.). Ч.1. – С. 311

91st International scientific conference of young scientist and students
 "Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution",
 April, 7–11, 2025. Book of abstract. Part 1. NUFT, Kyiv.

8. Біосинтез феритину та перспективи його використання для цільової доставки протипухлинних сполук

Володимир Верб'ян, Оксана Скроцька
 Національний університет харчових технологій, Київ

Вступ. Феритин – це універсальний внутрішньоклітинний білок, що може формувати наносфери. Феритинові наносфери виконують функцію транспортування заліза. Це досягається шляхом зв'язування феритину з атомарним залізом. За цим же механізмом феритин може зв'язуватись не лише з залізом, а й з біологічно активними речовинами, тому він розглядається сучасними науковцями як перспективний засіб для цільової доставки протипухлинних лікарських сполук.

Матеріали і методи. Проведено пошук та аналіз інформації з іноземних літературних джерел щодо біотехнології феритину, а також перспектив його застосування для цільової доставки протипухлинних сполук.

Результати. Феритини свавців складаються з двох різних субодиниць: Н- і L-ланцюгів. У 2025 р. було встановлено, що Н-ланцюг феритину при рН 7 і за температури 30–40 °С формує 24-мерні наносфери діаметром 12 нм, молекулярна маса яких 440 кДа. При рН 2–3 наносфери розформовуються. Час, необхідний для формування наносфер, становить 5 год [1].

В подальшому на основі *Escherichia coli* BL21(DE3) Zou зі співавторами сконструювали рекомбінантний бактеріальний штаб, що здатен синтезувати Н-ланцюг феритину у концентрації 15 мг/л. При цьому синтезувався розчинний феритин, а не у вигляді тілець-включень. Збільшити розчинність феритину до 74 % вдалось за рахунок введення генів молекулярних шаперонів у рекомбінантну ДНК [2].

В ході досліджень на мишах (*in vivo*) науковцями Sevieri зі співавторами встановлено, що наносфери на основі рекомбінантного феритину можуть здійснювати цільову доставку хімотерапевтичного засобу доксорубіцину. Також було встановлено, що імунотоксичність доксорубіцину в комплексі з феритином зменшується у чотири рази [3].

Висновки. Отже, наносфери феритину можна використовувати з метою цільової доставки протипухлинних засобів. При цьому за рахунок цільової доставки знижується побічна дія цих сполук.

Література

1. Buranrat, B., & Connor, J. R. (2015). Cytoprotective effects of ferritin on doxorubicin-induced breast cancer cell death. *Oncology reports*, 34(5), 2790-2796. doi:10.3892/or.2015.4250
2. Zou, W., Liu, X., Chen, D., Wang, J., Zhao, X., Li, J., ... & Hua, Z. (2016). Expression, purification, and characterization of recombinant human H-chain ferritin. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(8), 833-837. (B) doi:10.1080/10826068.2016.1141300
3. Sevieri, M., Andreatta, F., Mainini, F., Signati, L., Piccotti, F., Truffi, M., ... & Mazzucchelli, S. (2024). Impact of doxorubicin-loaded ferritin nanocages (FerOX) vs. free doxorubicin on T lymphocytes: a translational clinical study on breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 184.) doi:10.1186/s12951-024-02441-4

2. Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції: Програма та тези матеріалів XIV Міжнародної науково-технічної конференції (м. Київ, НУХТ, 25 листопада 2025 р.). – С. 22-23

УДК 639.2

4. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО ОТРИМАННЯ ФЕРИТИНОВИХ НАНОСФЕР ДЛЯ ЦІЛЬОВОЇ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБІЦИНУ

В.М. Вербіяк, О.І. Скроцька

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Феритин – це універсальний внутрішньоклітинний білок, що може формувати наносфери. Феритинові наносфери виконують функцію транспортування заліза. Це досягається шляхом зв'язування феритину з атомарним залізом.

За цим же механізмом феритин може зв'язуватися не лише з залізом, а й з біологічно активними речовинами, тому він розглядається сучасними науковцями як перспективний засіб для цільової доставки протипухлинних лікарських сполук.

Феритини ссавців складаються з двох різних субодиниць: Н- і L-ланцюгів. В 2015р. дослідники встановили, що Н-ланцюг феритину при рН 7 і за температури 30-40 ° С формує 24-мерні наносфери діаметром 12 нм, молекулярна маса яких 440 кДа.

При рН 2-3 наносфери розформовуються. Час, що необхідний для формування наносфер, становить 5 год (Buranrat & Connor, 2015).

В подальшому на основі *Escherichia coli* BL21(DE3) було сконструйовано рекомбінантний бактеріальний штам, що здатен синтезувати Н-ланцюг феритину у концентрації 15 мг/л. При цьому синтезувався розчинний феритин, а не у вигляді тілець-включень. Збільшити розчинність феритину до 74% вдалося за рахунок введення генів молекулярних шаперонів у рекомбінантну ДНК (Zou et al., 2016).

В ході досліджень на мишах (*in vivo*) науковцями було встановлено, що наносфери на основі рекомбінантного феритину можуть здійснювати цільову доставку хіміотерапевтичного засобу доксорубіцину. Також було встановлено, що імуноотоксичність доксорубіцину в комплексі з феритином зменшується у

чотири рази (Sevieri et al., 2024).

Враховуючи, що одна наносфера феритину здатна транспортувати 400 молекул доксорубіцину (Jiang et al., 2019), можна розрахувати, що протипухлинний феритин-доксорубіциновий комплекс міститиме компоненти у співвідношенні 2 г феритину на 1 г доксорубіцину.

Для економічної та екологічної оптимізації виробництва наносфер феритину, що призначені для застосування у складі даного комплексу, можна запропонувати технологічне рішення, що полягає у використанні тепла, яке виділяється під час дезінтеграції рекомбінантних клітин *Escherichia coli* для досягнення температури, що необхідна для теплового шоку.

Отже, наносфери феритину є перспективним засобом для цільової доставки протипухлинних сполук. При цьому за рахунок цільової доставки знижується побічна дія цих речовин.

Література.

Buranrat, B., & Connor, J. R. (2015). Cytoprotective effects of ferritin on doxorubicin-induced breast cancer cell death. *Oncology reports*, 34(5), 2790-2796. doi:10.3892/or.2015.4250

Jiang, B., Zhang, R., Zhang, J., Hou, Y., Chen, X., Zhou, M., ... Yan, X. (2019). GRP78-targeted ferritin nanocaged ultra-high dose of doxorubicin for hepatocellular carcinoma therapy. *Theranostics*, 9(8), 2167–2182. doi:10.7150/thno.30867

Sevieri, M., Andreato, F., Mainini, F., Signati, L., Piccotti, F., Truffi, M., ... Mazzucchelli, S. (2024). Impact of doxorubicin-loaded ferritin nanocages (FerOX) vs. free doxorubicin on T-lymphocytes: a translational clinical study on breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 184. doi:10.1186/s12951-024-02441-4

Zou, W., Liu, X., Chen, D., Wang, J., Zhao, X., Li, J., ... Hua, Z. (2016). Expression, purification, and characterization of recombinant human H-chain ferritin. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(8), 833-837. doi:10.1080/10826068.2016.1141300