

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ
ННЦ «ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА МЕДИЦИНИ»
КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОЛОМІЄЦЬ ЛЕСЯ АНАТОЛІЇВНА

УДК 577.217.5; 577.152.611

ДИСЕРТАЦІЯ

**СТВОРЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА НАНОКОМПОЗИТНОГО
КОМПЛЕКСУ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА
ЕМАР II З ДЕКСТРАНОМ 70**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Л.А. Коломієць

Науковий керівник: **Корнелюк Олександр Іванович**, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

КИЇВ – 2020

АНОТАЦІЯ

Коломієць Л.А. Створення та характеристика нанокompозитного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстраном 70. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія – ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2020.

Дисертаційна робота присвячена пошуку способів підвищення стабільності протипухлинного цитокіна ЕМАР II та зниження його агрегаційних властивостей шляхом створення нового біотехнологічного комплексу білка ЕМАР II з декстраном 70.

Ендотеліальний та моноцитарноактивуючий поліпептид II (ЕМАР II) – цитокін, який здатний проявляти антиангіогенну дію, індукувати експресію TNF та інтерлейкіну-8, викликати апоптоз ендотеліальних клітин. Здатність ЕМАР II інгібувати неоангіогенез та стимулювати апоптоз пухлинних клітин стала основою для дослідження питання про те, чи може він бути використаний у якості протипухлинного лікарського засобу. Протипухлинна дія ЕМАР II експериментально показана на різних типах пухлин. Останні дослідження показали, що ЕМАР II викликає дозозалежне інгібування проліферації клітин та ініціює апоптоз лімфоцитів, які є мішенями цитотоксичної активності ЕМАР II. Раніше нами було досліджено вплив ЕМАР II на ріст пухлини передміхурової залози та показано здатність цього білка інгібувати ріст трансплантованих мишам ксенографтів аденокарциноми простати людини. В високих дозах проявляється антиангіогенний вплив цитокіну та властивості, що протидіють

росту пухлинних тканин: підвищення рівня апоптозу ракових клітин, прокоагулятивна активність та ін.

Використання білків та білкових препаратів широко застосовується у медичній практиці при лікуванні різноманітних захворювань. Білкові препарати проявляють більшу специфічність щодо мішеней, а також меншу токсичність. Основною проблемою використання таких препаратів в терапевтичних цілях є їх нестабільність, висока здатність до агрегації та низький ступінь розчинності. Агрегація білків виникає в процесі виробництва білкових терапевтичних засобів, оскільки етапи експресії та очистки білків, а також приготування лікарських засобів на їх основі може супроводжуватися утворенням агрегатів різного розміру. Для подолання цих проблем використовують різноманітні хімічні речовини, в тому числі декстрини та циклодекстрини.

Найбільш ефективним засобом боротьби з проблемою агрегації є використання різноманітних лігандів, які запобігають агрегації. Ці допоміжні речовини широко використовують під час виробництва, очистки та приготування терапевтичних засобів.

Декстран відноситься до сімейства природних полісахаридів, які широко використовуються в клінічних і доклінічних дослідженнях з добре охарактеризованим профілем безпеки. Декстран застосовується в наномедицині, яка використовує субмікронні частинки для терапевтичних і діагностичних цілей. Декстран також використовують для захисту і стабілізації унікальної структури білків (наприклад, альбуміну, стрептокінази, аспарагіну, інсуліну, гемоглобіну). В цілому, ці дані свідчать про те, що конструювання наноструктур білків з декстраном є перспективним підходом для отримання широкого спектру протипухлинних препаратів.

Метою дисертаційної роботи було створити біотехнологічний комплекс протипухлинного цитокіна ЕМАР II з лігандом – декстраном 70 для підвищення стабільності цитокіна та зниження здатності до агрегації.

Тому логічним було спочатку оптимізувати бактеріальну експресію самого цитокіна ЕМАР II для максимального виходу білка в препаративних кількостях. Показано, що оптимальними умовами експресії цитокіну є культивування бактеріальної культури *E. coli* BL21(DE3)pLysE на мінімальному середовищі А. В процесі експресії цитокіна ЕМАР II максимальна кількість білка спостерігалась за умови додавання в середовище культивування індуктора на другу годину росту культури ($OD_{600}=0,7-0,9$), оптимальна концентрація індуктора синтезу цільового білка IPTG становить 1,25 мМ, найбільший приріст експресії цільового білка спостерігався при культивуванні культури 4,5 год. Отриманий високоочищений цитокін ЕМАР II використано для біотехнологічної розробки комплексу цитокіна ЕМАР II з лігандом та дослідження характеристик комплексу.

Як потенційний ліганд для створення комплексу вибрано декстран 70, який вже давно використовується в медицині і добре відомий.

Проведено титрування рекомбінантного білка ЕМАР II розчином декстрану 70. Спостерігається падіння інтенсивності флуоресценції білка з підвищенням концентрації ліганда, що свідчить про міцне зв'язування ліганда з рекомбінантним білком. За отриманими залежностями розрахована константа зв'язування (K_d) для ЕМАР II із декстраном 70, яка складає $1,97 \pm 0,17 \mu\text{M}$. Стехіометрія зв'язування декстрана 70 з ЕМАР II становить згідно даних близько 1:1, що свідчить про утворення специфічного комплексу.

При дослідженні впливу декстрана 70 на стабільність білкової глобули ЕМАР II встановлено, що при підвищенні температури максимум емісії флуоресценції ЕМАР II в комплексі з декстраном зсувається з 334 нм до 345 нм, тоді як локальний конформаційний перехід в оточенні Trp125 спостерігається при $49 \pm 1^\circ\text{C}$. Температура локального конформаційного переходу у вільному ЕМАР II становить $43 \pm 1^\circ\text{C}$ (визначена як температура в точці напівпереходу між двома станами). Це свідчить про стабілізацію структури ЕМАР II у

комплексі, яка є більш стабільною до дії високих температур порівняно з вільним білком ЕМАР II.

Температурне плавлення як білка ЕМАР II, так і його комплексу з декстраном 70 вивчали в діапазоні температур 25-55 °С методом динамічного розсіювання світла. При підвищенні температури спостерігалось плавлення білка, що супроводжувалося постійним зростанням розмірів агрегатів. При дослідженні розмірів комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у розчині при різних температурах встановлено, що розміри комплексу ЕМАР II з декстраном 70 при зростанні температури значно відрізняються від розмірів вільного білка ЕМАР II. З підвищенням температури розмір частинок комплексу ЕМАР II з декстраном 70 не змінюється і така тенденція зберігається до досягнення температури 55 °С. Ці дані свідчать про те, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 досить міцний та стабільний і не руйнується при високих температурах. Полісахарид декстран 70 стабілізує білкову глобулу ЕМАР II та перешкоджає процесам агрегації.

Щоб зрозуміти природу формування агрегатів вільного білка ЕМАР II проведено моделювання взаємодії між просторовими структурами білка за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 та SymmDock. Проведений аналіз просторових структур виявив, що одну з ключових ролей у формуванні контакту між молекулами білка в структурі білок-білкових комплексів в агрегатах відіграє неструктурована петля ³⁴DVGEIAPR⁴¹, яка блокує гідрофобну триптофанову “кишеню”.

З метою виявлення потенційного сайту зв'язування декстрана з поверхнею білка ЕМАР II проводили гнучкий докінг в програмі AutoDockVina. В результаті комп'ютерного моделювання докінгу встановлено, що зв'язування декстрана з ЕМАР II відбувається в “кишені” на поверхні білка, де локалізований Trp125. Згідно отриманих моделей у зв'язуванні декстрана 70 з ЕМАР II залучені такі залишки як Arg12, Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166.

Аналіз просторової структури комплексу ЕМАР II з декстраном 70 показав, що афінність зв'язування декстрана 70 (ΔG_{Free}) з ЕМАР II становить -6.4 ккал/моль.

Вперше запропоновано та створено біотехнологічний продукт - комплекс ЕМАР II з декстраном 70.

При перевірці нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 наявність ліполісахаридів встановлено, що в перпараті міститься менше, ніж 0,5 МОЕ/кг, але більше, ніж 0,03 МОЕ/кг.

Токсикологічні дослідження LD_{50} комплексу ЕМАР II з декстраном 70 проводили на лабораторних мишах лінії Balb/c. Показано, що після введення мишам комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у дозах 300 - 10 000 мкг/кг не спостерігається загальнотоксичної дії комплексу і він не викликає загибель тварин. Спостерігається позитивна динаміка маси тіла.

Токсичність комплексу ЕМАР II з декстраном 70 визначали на культурах клітин L929 (фібробласти зі сполучної тканини миші С3Н/Ап, сублінія "а") та PST (тестикули поросяти). На культурі клітин PST показано, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 спричиняє продукцію TNF- α у діапазоні концентрацій від 1,6 - 25,0 $\mu\text{г}/\text{мл}$. Продукції інтерферону культурами клітин при обробці комплексом ЕМАР II з декстраном 70 виявлено не було.

При дослідженні протипухлинної активності комплексу ЕМАР II з декстраном 70 в концентрації 10 мкг/кг на моделі трансплантованих фрагментів аденокарциноми простати людини встановлено, що комплекс забезпечував 77% гальмування прогресу росту пухлини.

Отже, проведені нами дослідження дозволили запропонувати новий біотехнологічний продукт, а саме, комплекс протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстраном 70 для подальших доклінічних досліджень.

Ключові слова: ендотеліальний та моноцитаактивуєчий поліпептид II (ЕМАР II), декстран 70, агрегація білків, нанокмпозитний комплекс, стабілізація білка, комп'ютерне моделювання.

Список публікацій здобувача за темою дисертації:

Статті у наукових фахових виданнях:

1. **Kolomiets L. A., Vorobyova N. V., Lozhko D. M., Zayets V.N., Kornelyuk A. I.** (2020) Stabilization of AIMP1/p43 and EMAP II recombinant proteins in the complexes with polysaccharide dextran-70. *Pharmacological Reports*, 72(1), 238-245. DOI: 10.1007/s43440-019-00016-x. *(Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку цитокіну EMAP II, створено нанокмпозитний комплекс EMAP II та AIMP1/p43 з декстраном 70, дослідження утворених комплексів методами флуоресцентної спектроскопії, написання та подання рукопису до друку).*

2. **Коломієць Л.А., Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І.** (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного цитокіну EMAP II. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3 (47), 6 - 18. DOI: 10.18524/2307-4663.2019.3(47).182815. *(Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку білка EMAP II, створено нанокмпозитний комплекс EMAP II з декстраном 70, дослідження утворення агрегатів методом динамічного світорозсіювання, обробка та узагальнення результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку).*

3. **Коломієць Л., Заєць В., Корнелюк О.** (2018) Дослідження впливу нанокмпозитного комплексу цитокіну EMAP II з декстраном 70 на організм мишей лінії Balb/c. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, серія біологія*, 2(76), 29-33. DOI: 10.17721/1728_2748.2018.76.29-33. *(Особистий внесок здобувача – експресія та очистка рекомбінантного білка EMAP II, створення нанокмпозитного комплексу EMAP II з декстраном 70, проведено власноруч експерименти з тваринами, аналіз та обробка результатів експериментів, написання рукопису та подання до друку).*

4. **Kolomiets-Babenko L.A.**, Bohorad-Kobelska O. S., Kovalchuk N. L., Spivak M. Ja., Kornelyuk A. I. (2016) Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon. *Biotechnologia Acta*, 9 (5), 18-23. DOI: 10.15407/biotech9.05.018. *(Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку цитокіну EMAP II, створено нанокмпозитний комплекс EMAP II з декстраном 70, участь в експерименті з культурами клітин, обробка та аналіз результатів досліджень, написання статті та подання до друку).*

5. Чайковская Л.В., Полякова Л.И., Сачинская О.В., **Бабенко Л.А.**, Корнелюк А.И., Резников А.Г. (2011) Тестирование противоопухолевой активности нанокмпозитного комплекса рекомбинантного цитокинподобного полипептида EMAP-II на ксенотрансплантатах андрогензависимого рака предстательной железы человека. *Эндокринология*, 16 (2), 160-168. *(Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку цитокіну EMAP II, створено нанокмпозитний комплекс EMAP II з декстраном 70, участь у експериментах по підсадці ксенографтів пухлини під капсулу нирки мишей, здійснено аналіз та обробку отриманих результатів).*

6. Lylo V., Matsevich L., Kotsarenko E, **Babenko L.**, Kornelyuk A., Lukash L. (2011) Activation of gene expression of the O⁶-methylguanidine-DNA-transferase repair enzyme upon the influence of EMAP II cytokine in human cells *in vitro*. *Cytology and Genetics*, 45 (6), 373-378. DOI: 10.3103/S0095452711060053. *(Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку білка EMAP II, участь у експериментах, здійснено аналіз отриманих результатів).*

7. **Бабенко Л.А.**, Скоробогатов О.Ю., Дубровський О.Л., Корнелюк О.І. (2010) Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна EMAP II в клітинах *E.coliBL21(DE3)pLysE*. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3 (11), 21-31. DOI: 10.18524/2307-4663.2010.3(11).98933 *(Особистий внесок здобувача – аналіз літературних джерел, проведення оптимізації бактеріальної експресії цитокіна EMAP II, аналіз і узагальнення результатів, написання та підготовка рукопису до друку).*

8. Голобородько Т.О., Полякова Л.І., Соткіс Г.В., Корнелюк О.І., **Бабенко Л.А.**, Шуба Я.М., Резніков О.І. (2010) Поліпептид ЕМАР II гальмує ріст і стимулює апоптоз клітин лінії LNCaP раку простати людини. *Журнал АМН України*, 16(4), 681-690. *(Особистий внесок здобувача – проведено виділення та очистку цитокіну ЕМАР II, здійснено аналіз отриманих результатів).*

Патенти на корисні моделі

9. Корнелюк О.І., **Бабенко Л.А.**, Козлов О.В., Резніков О. Г., Чайковська Л.В., Полякова Л.І. Нанокмпозитний протипухлинний препарат: патент на корисну модель № 64374; заявл.18.03.2011, Опубл. 10.11.2011, Бюл. № 21 *(Особистий внесок здобувача – аналіз патентної документації, біотехнологічна розробка та створення нанокмпозитного комплексу, підбір оптимальних концентрацій білка та ліганду, опис патенту та ведення документації).*

10. **Коломієць Л.А.**, Малина А.Е., Корнелюк О.І. Спосіб стабілізації протипухлинного цитокіна ЕМАР II: патент на корисну модель № 141271; заявл.24.10.2019, Опубл. 25.03.2020. *(Особистий внесок здобувача – аналіз патентної документації, біотехнологічна розробка та проведення експериментів по стабілізації протипухлинного цитокіна ЕМАР II, опис патенту та ведення документації).*

Тези наукових доповідей на конференціях

11. **Бабенко Л.А.**, Чайковська Л.В., Резніков О. Г., Корнелюк О. І. (2010 вересень) Дослідження протипухлинної дії цитокіна ЕМАР II на ксенотрансплантанти аденокарциноми простати людини у мишей лінії СВА. - X Український біохімічний з'їзд, 13-17 вересня, Одеса. (Опубл. В *Ukr. Biochem. J.*, 2010, (Спеціальний випуск), том 82, №4, С.49).

12. **Babenko L.A.**, Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Reznikov A.G., Kornelyuk A. I. (2010 February) Antitumor activity of II protein. - FEBS Special Meetings JakStat Signaling: From Basics to Disease, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria (Опубл. в *Abstract book*, 2010, P.53).

13. **Бабенко Л.А.**, Скоробогатов О.Ю. (2010 вересень) Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *E.coliBL21(DE3)pLysE*. - VI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, Україна (Опубл. в *Збірник тез*, 2010, С.143-144).

14. **Бабенко Л.А.**, Козлов О.В., Чайковська Л.В., Полякова Л.І., Резніков О. Г., Корнелюк О. І. (2011 березень) Створення нанокмпозитного препарату ЕМАР II та дослідження його протипухлинної активності. - Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини», 24-26 березня, Харків, Україна (Опубл. в *Збірник тез*, 2011. С. 25-26).

15. Скоробогатов О.Ю., **Бабенко Л.А.**, Корнелюк О. І (2011 березень) Визначення імуногенних ділянок рекомбінантного білка ЕМАР II біоінформатичним методом. . - Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини», 24-26 березня, Харків, Україна (Опубл. в *Збірник тез*, 2011. С. 158-159).

16. **Бабенко Л.А.**, Коцаренко Е.В., Лыло В.В., Мацевич Л.Л., Рубан Т.А., Корнелюк А.И., Лукаш Л.Л. (2011) Изучение влияния нанокмпозитного препарата ЕМАР II на пролиферацию и выживаемость иммортализованных клеток. - Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века, Пушино, Россия (Опубл. в *Сборник тезисов* 2011, С.300).

17. **Babenko L.A.**, Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Kornelyuk A. I. (2011 June) Investigation of anticancer activity of ЕМАР II based nanocomposite complex.

- 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy (Опубл. *Abstract book* 2011, P.196).

18. Goloborodko T., Polyakova L., Sotkis A., Moriev R., Kornelyuk A., **Babenko L.**, Shuba Y., Reznikov A. (2011 June) Effect of recombinant protein EMAP II on proliferation and apoptosis in the prostate cancer LNCaP cell line. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy (Опубл. *Abstract book* 2011, P.209).

19. Коцаренко К. В., Лыло В. В., Мацевич Л. Л., Рубан Т. А., **Бабенко Л. А.**, Корнелюк А. И., Лукаш Л. Л. (2011 травень) Вплив цитокінів на експресію гена *MGMT* в клітинах людини *in vitro*. - П'ята Конференція молодих вчених інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 130-річчю від дня народження О.О. Богомольця, 24-25 травня Київ, Україна (Опубл. *Біополімери і клітина*, 2011. № 4. С. 318).

20. Kotsarenko K., **Babenko L.**, Ruban T., Lylo V., Kochubey T., Kornelyuk A., Lukash L. (2011 September) Study of EMAP II based nanocomposite complex affect on the survival of human cell *in vitro*. - The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology Advances and Perspectives", 14-17 September, Kyiv. (Опубл. в *Abstract book* P. 99).

21. **Коломієць Л.А.**, Ковальчук Н.Л. (грудень 2015) Визначення вмісту ендотоксинів у нанокмпозитному препараті ЕМАР II методом гель-тромб тесту. – X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 2-4 грудня 2015, Харків, Україна. (Опубл. в *Збірник тез*, 2015. С. 128).

22. Воробйова Н. В., **Коломієць-Бабенко Л. А.**, Ложко Д. М., Нестеренко Є. В. (2016 жовтень) Дослідження формування комплексів рекомбінантних білків АІМР1/Р43 та ЕМАР II людини із декстраном-70. - XI міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, Україна. (Опубл. в *Збірник тез*, 2016. С. 29).

23. **Коломієць Л.А.**, Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І. (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного цитокіну ЕМАР II. - XII Український біохімічний конгрес, 30 вересня-4 жовтня, Тернопіль, Україна. (Опубл. в *Медична та клінічна хімія*, 2019, Т.21, № 3 (80), С.272).

SUMMARY

Kolomiets L. A. Creation and characterization of a new nanocomposite complexEMAPII with dextran 70. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.20 - Biotechnology. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Proteins and protein preparations are widely used in medical practice in the treatment of various diseases. Protein based drugs have several advantages over small molecule preparations. Such drugs exhibit greater target specificity and less toxicity. The main problem with the use of protein drugs as drugs is their instability, high ability to aggregate and low degree of solubility. Protein aggregation occurs during the production of protein therapeutic agents, as the stages of expression and purification of proteins, as well as the preparation of drugs based on them, may be accompanied by the formation of aggregates of different sizes. A variety of chemicals, including dextrans and cyclodextrins, are used to overcome these problems.

The most effective way of combating the problem of aggregation is to use variety of ligands that prevent aggregation. These excipients are widely used in the manufacturing, purification and preparation of therapeutic dosage forms.

Endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP II) is a cytokine capable of exhibiting anti-angiogenic action, inducing expression of TNF and interleukin-8, causing apoptosis of endothelial cells. The precursor to EMAP II is the p43 protein, a component of the high molecular weight complex of higher eukaryotic aminocyl-tRNA synthetases. EMAP II's ability to inhibit neoangiogenesis and stimulate cancer cell apoptosis has become the basis for investigating whether it can be used as an anticancer drug. The antitumor effect of EMAP II has been experimentally demonstrated on different types of tumors. Recent studies have shown that EMAP II causes a dose-dependent inhibition of cell proliferation and initiates apoptosis of lymphocytes, which targets cytotoxic activity of EMAP II. The effect of EMAP II on prostate cancer growth has previously been investigated and the ability of this protein to inhibit the growth of human prostate adenocarcinoma xenograft transplanted into mice has been demonstrated. It is important to note that the effect of EMAP II is dose/concentration dependent. At high doses, anti-angiogenic effects of cytokine and other properties that counteract the growth of tumor tissues, such as increased apoptosis, procoagulative activity, etc., are manifested.

Dextran belongs to the family of natural polysaccharides that are widely used in clinical and preclinical studies with a well-characterized safety profile. Dextran is also used in nanomedicine, which uses submicron particles for therapeutic and diagnostic purposes. Dextran is also used to protect and stabilize the unique structure of the protein (e.g., albumin, streptokinase, asparagine, insulin, hemoglobin). Overall, the results show that the construction of protein nanostructures with dextran is a promising approach for obtaining a wide range of anticancer drugs

The bacterial expression of the cytokine EMAP II and preparation of recombinant protein in preparative amounts are optimized. It is shown that the optimal conditions for cytokine expression are the cultivation of bacterial culture of

E. coli BL21 (DE3) pLysE on minimal medium A. In the course of EMAP II cytokine expression the maximum amount of protein was observed if the inducer was added to the culture medium for the second hour of culture growth (OG600 = 0,7-0,9), the optimal concentration of the inducer of the synthesis of the target protein IPTG is 1.25 mM. The highest increase in expression of the target protein was observed in the culture of culture 4.5 h. A highly purified EMAP II cytokine was obtained to further construct its complex with the ligand and study its characteristics.

As a potential ligand to create the complex dextran 70 was selected, which has been used in medicine for a long time and is well known. In order to identify a potential dextran binding site with the EMAP II surface, flexible docking was performed in AutoDock Vina. The most exposed residues in the cytokine structure are tryptophan 125 and phenylalanine 113. As a result of computer simulation of docking, it was found that the binding of dextran to EMAP II occurs in the "pocket" on the surface of the protein, where Trp125 is localized.

According to models obtained in the binding of dextran 70 to EMAP II involved such residues as Arg12, Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166. Analysis of the structure of dextran complexes with protein showed that the affinity of binding of dextran (ΔG_{Free}) to EMAP II is -6.4 kcal/mol.

The recombinant EMAP II protein was titrated with dextran 70 solution. There is a change in the fluorescence intensity of the protein with increasing concentration of the ligand, which indicates the strong binding of the ligand to the recombinant protein and the formation of a stable complex. Based on the dependencies obtained, the binding constant (K_d) for EMAP II with dextran 70 was calculated to be $1.97 \pm 0.17 \mu\text{M}$. The stoichiometry of binding of dextran 70 to EMAP II is about 1: 1, which confirms the formation of a specific complex. In the study of the effect of dextran 70 on the stability of the protein globule EMAP II found that with increasing temperature, the maximum fluorescence emission EMAP II shifts from 334 nm to 345 nm, while the local conformational transition in the environment of Trp125 is

observed at $49 \pm 1^\circ\text{C}$. The local conformational transition temperature in the (free) EMAP II is $43 \pm 1^\circ\text{C}$ (defined as the temperature at the midpoint between the two states). This indicates the stabilization of the EMAP II structure in the complex, which is more resistant to high temperatures compared to the free EMAP II protein. The melting point of both EMAP II protein and its complex with dextran 70 was studied in the temperature range $25\text{-}55^\circ\text{C}$ by dynamic light scattering. With increase in temperature, there is a melting of the protein, which is accompanied by a constant increase in the size of aggregates. When examining the size of EMAP II complex with dextran 70 in solution at different temperatures, it is shown that the dimensions of EMAP II complex - dextran 70 with increasing temperature are significantly different from the size of free EMAP II protein. As the temperature increases, the particle size of the EMAP II - dextran 70 complex does not change, and this tendency persists until the temperature reaches 55°C . These data indicate that the EMAP II - dextran 70 complex is sufficiently strong and stable and does not break down at high temperatures, and that the dextran 70 polysaccharide stabilizes the EMAP II protein globule and impedes aggregation processes.

To understand the nature of the formation of EMAP II protein aggregates, we modeled the interaction between the spatial structures of the protein using web servers for the macromolecular docking of Cluspro 2.0 and SymmDock. The analysis of spatial structures revealed that one of the key roles in the formation of contacts between protein molecules in the structure of protein-protein complexes in aggregates is played by the unstructured loop ³⁴DVGEIAPR⁴¹, which blocks the hydrophobic tryptophan pocket.

EMAP II anticancer complex with dextran 70 was first proposed and created in the following component ratios - EMAP II protein: dextran 70-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 1.5 mg. When checking the nanocomposite preparation EMAP II with dextran 70 for the presence of lipopolysaccharides, it was found that the preparation contained less than 0.5 IU/kg but more than 0.03 IU/kg. The state pharmacopoeia limit is 5 IU/kg. From this we can conclude that the extremely small number of available

lipopolysaccharides in nanocomposite preparation does not affect the results of the studies.

Toxicological testing of LD50 complex EMAP II with dextran 70 was performed on Balb / s laboratory mice. It is shown that after the infusion of the EMAP II complex with dextran 70 to mice at doses of 300 - 10 000 mcg / kg no general toxic effect of the complex is observed and it does not cause animal death. Positive dynamics of body weight were observed.

The toxicity of EMAP II complex with dextran 70 was determined on cultures of L929 and PST cells. For the evaluation of the toxicity of substances used indicators of IBC (maximum concentration) and CC50. Dose CC50 is the cytotoxic concentration of the drug that results in 50% destruction of the monolayer of cells compared to the control. Cells not treated with the test substances were used as controls. MBC and CC50 on both cell lines for EMAP II coincide and are 25 and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. PST cell culture shows that EMAP II complex with dextran 70 produces TNF- α production in the concentration range from 1.6 to 25.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$. The production of interferon by cell cultures during treatment with EMAP II complex with dextran 70 was not detected.

In the study of the antitumor activity of the complex EMAP II with dextran 70 with a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ on the model of transplanted fragments of human prostate adenocarcinoma, it was found the complex provided 77% inhibition of the tumor growth progress.

Keywords: endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP II), dextran 70, protein aggregation, nanocomposite complex, protein stabilization, computer simulation.

List of scientific publications published on the topic of the dissertation:

Articles

1. **Kolomiets L. A.**, Vorobyova N. V., Lozhko D. M., Zayets V.N., Kornelyuk A. I. (2020) Stabilization of AIMP1/p43 and EMAP II recombinant proteins in the complexes with polysaccharide dextran-70. *Pharmacological Reports*, 72(1), 238-245. DOI: 10.1007/s43440-019-00016-x.
2. **Kolomiets L. A.**, Lozhko D. M., Chunihin O.Yu., Zayets V.N., Gordovska N. V., Kornelyuk A. I. (2019) The effect of dextran 70 on the aggregation of the antitumor cytokine EMAP II. *Microbiology and Biotechnology*, 3 (47), 6 - 18. DOI: 10.18524/2307-4663.2019.3(47).182815.
3. **Kolomiets L. A.**, Zayets V.N., Kornelyuk A. I. (2018) Investigation of influence of cytokine EMAP II nanocomposite complex with dextran 70 the Balb/c lines muscle organism. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, series Biology*, 2(76), 29-33. DOI: 10.17721/1728_2748.2018.76.29-33.
4. **Kolomiets-Babenko L.A.**, Bohorad-Kobelska O. S., Kovalchuk N. L., Spivak M. Ja., Kornelyuk A. I. (2016) Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon. *Biotechnologia Acta*, 9 (5), 18-23. DOI: 10.15407/biotech9.05.018.
5. Chaykovskaya L.V., Polyakova L. I., Sachinskaya O. V., **Babenko L. A.**, Kornelyuk A. I., Reznikov O. I. (2011) Testing the antitumor activity of the nanocomposite complex of the recombinant cytokine-like polypeptide EMAP-II on xenografts of androgen-dependent human prostate cancer. *Endocrinology*, 16 (2), 160-168.
6. Lylo V.V., Matsevich L. L., Kotsarenko E.V., **Babenko L. A.**, Kornelyuk A. I., Sukhorada E. M., Lukash L. L. (2011) Activation of gene expression of the O⁶-methylguanine-DNA-transferase repair enzyme upon the

influence of EMAP II cytokine in human cells in vitro. *Cytology and Genetics*, 45 (6), 373-378. DOI: 10.3103/S0095452711060053.

7. **Babenko L. A.**, Scorobogatov A. Yu., Dubrovskiy A. L., Kornelyuk A. I. (2010) Optimization of bacterial expression of the EMAP II antitumor cytokine in *E.coliBL21(DE3)pLysE* cells. *Microbiology and biotechnology*, 3 (11), 21-31. DOI: 10.18524/2307-4663.2010.3(11).98933.

8. Goloborodko T .O., Polyakova L. I., Sotkis G.V., Kornelyuk A. I., **Babenko L. A.**, Shuba Ya. M., Reznikov O. I. (2010) Polypeptide EMAP II inhibits growth and stimulates apoptosis of human prostate cancer LNCaP cell lines. *Journal of the Academy of Medical Sciences of Ukraine*, 16(4), 681-690.

Utility model patent

9. Kornelyuk A. I., **Babenko L. A.**, Kozlov A. V., Reznikov O. I., Chaykovskaya L.V., Polyakova L. I. (2011) Decision on the issuance of a declaratory patent for a utility model "Nanocomposite antitumor drug". Conclusion approved by the *Department of Intellectual Property* from 10.11.2011, № 64374.

10. **Kolomiets L. A.**, Malyna A.E., Kornelyuk A. I. The method of stabilization of the antitumor cytokine EMAP II. Conclusion approved by the *Department of Intellectual Property* from 25.03.2020, № 141271.

Conference abstracts

11. **Babenko L. A.**, Chaykovskaya L.V., Reznikov O. I., Kornelyuk A. I. (2010 September) Study of the antitumor effect of the cytokine EMAP II on xenografts of human prostate adenocarcinoma in CBA mice. - X Ukrainian biochemical Congress, 13-17 September 2010, Odessa, Ukraine. - *Ukr. Biochem. J.*, Vol 82, №4, Special Issue, P. 49.

12. **Babenko L.A.**, Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Reznikov A.G., Kornelyuk A. I. (2010 February) Antitumor activity of II protein. - FEBS Special

Meetings JakStat Signaling: From Basics to Disease, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria. - *Abstract book*, 2010, P.53.

13. **Babenko L. A.**, Skorobogatov O. Yu. (2010 September) Optimization of bacterial expression of the antitumor cytokine EMAP II in *E.coli* BL21(DE3)pLysE cells. - VI International Scientific Conference of Students and Postgraduates "Youth and Progress in Biology", Lviv, Ukraine. - *Abstract book*, 2010, P.143-144.

14. **Babenko L. A.**, Kozlov A. V., Chaykovskaya L.V., Polyakova L. I., Reznikov O. I., Kornelyuk A. I. (2011 March) Development of nanocomposite drug EMAP II and study of its antitumor activity. - International scientific conference of students and young scientists "Current issues of modern medicine", 24-26 March 2011, Kharkiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2011, P. 25-26.

15. Skorobogatov O. Yu, **Babenko L. A.**, Kornelyuk A. I. (2011 March) Determination of immunogenic regions of recombinant EMAP II protein by bioinformatics method. - International scientific conference of students and young scientists "Current issues of modern medicine", 24-26 March, Kharkiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2011, P. 158-159.

16. **Babenko L. A.**, Kotsarenko K. V., Lylo V.V., Macevych L. L., Ruban T. A., Kornelyuk A. I., Lukash L. L. (2011) Study of the effect of nanocomposite drug EMAP II on the proliferation and survival of immortalized cells.- International Pushchin School-Conference of Young Scientists "Biology is a science of the XXI century, Pushchino, Russia. - *Abstract book*, 2011, P.300.

17. **Babenko L.A.**, Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Kornelyuk A. I. (2011 June) Investigation of anticancer activity of EMAP II based nanocomposite complex. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino Italy. - *Abstract book*, 2011, P.196.

18. Goloborodko T., Polyakova L., Sotkis A., Moriev R., Kornelyuk A., **Babenko L.**, Shuba Y., Reznikov A. (2011 June) Effect of recombinant protein EMAP II on proliferation and apoptosis in the prostate cancer LNCaP cell line. - 36th

FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy.
- *Abstract book*, 2011, P.209.

19. Kotsarenko K. V., Lylo V. V., Macevych L. L., Ruban T. A., **Babenko L. A.**, Kornelyuk A. I., Lukash L. L. (2011 May) The effect of cytokines on MGMT gene expression in human cells *in vitro*. – 5th Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, *dedicated to the 130th anniversary of the birth of O.O. Bogomolets*, 24-25 May, Kyiv, Ukraine. - *Biopolymers and Cell*, 2011, № 4, P. 318.

20. Kotsarenko K., **Babenko L.**, Ruban T., Lylo V., Kochubey T., Kornelyuk A., Lukash L. (2011 September) Study of EMAP II based nanocomposite complex affect on the survival of human cell *in vitro*. - The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology Advances and Perspectives", 14-17 September, Kyiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2011, P. 99.

21. **Kolomiets L.A.**, Kovalchuk N.L. (2015 December) Determination of endotoxin content in nanocomposite preparation EMAP II by gel-thromb test. - X International Conference of Young Scientists "Biology: from molecule to biosphere", 2-4 December 2015, Kharkiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2015. P. 128.

22. Vorobyova N. V., **Kolomiets L. A.**, Lozhko D. M., Nesterenko Ye. V. (2016 December) Study of the formation of complexes of recombinant proteins AIMP1 / P43 and human EMAP II with dextran-70. - XI International Conference of Young Scientists "Biology: from molecule to biosphere", 29 November – 2 December, Kharkiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2016, P. 29.

23. **Kolomiets L. A.**, Lozhko D. M., Chunihin O. Yu., Zayets V. N., Gordovska N. V., Kornelyuk A. I. (September - October 2019) The effect of dextran-70 on the aggregation of the antitumor cytokine EMAP II. - XII Ukrainian Biochemical Congress, 30 September - 4 October, Ternopil, Ukraine. - *Medical and clinical chemistry*. - V.21, № 3 (80), P.272.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	24
ВСТУП.....	25
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	31
1.1. Цитокін ЕМАР II.....	31
1.1.1. Історія відкриття ЕМАР II та загальна характеристика.....	31
1.1.2. Ефекти ЕМАР II на ендотеліальні клітини та клітини лімфоїдного походження.....	34
1.1.3. Протипухлинна активність ЕМАР II.....	36
1.1.4. ЕМАР II і апоптоз.....	37
1.1.5. ЕМАР II і ангиогенез.....	39
1.2. Агрегація білків.....	41
1.3. Декстран 70 – властивості та будова.....	44
1.4. Власна флуоресценція білків.....	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	50
2.1. Матеріали та обладнання.....	50
2.2. Бактеріальна експресія та очистка рекомбінантного білка ЕМАР II.....	53
2.2.1. Отримання компетентних клітин <i>Escherichia coli</i>	53
2.2.2. Трансформація бактеріальних клітин плазмідною ДНК.....	54
2.2.3. Отримання гліцеринових стоків для бактеріальної експресії.....	54
2.2.4. Експресія бактеріальних культур для препаративного виділення рекомбінантних білків.....	55
2.2.5. Оптимізація процесу біосинтезу рекомбінантних білків.....	55
2.2.6. Очистка рекомбінантного білка ЕМАР II.....	56
2.2.7. Розщеплення рекомбінантного білка ЕМАР II ентерокіназою.....	56
2.2.8. Визначення концентрації білка за методом Бредфорда.....	56
2.2.9. Спектрофотометричне визначення концентрації білків.....	57
2.2.10. Електрофоретичне розщеплення білків в поліакриламідному гелі.....	57

2.3. Дослідження взаємодії білка ЕМАР II з декстраном 70 методом флуоресцентної спектроскопії.....	58
2.4. Біотехнологічна розробка нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70.....	59
2.5. Дослідження агрегаційних властивостей цитокіна ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70.....	60
2.6. Біоінформатичний аналіз.....	61
2.7. Дослідження вмісту ендотоксинів у нанокмпозитному комплексі ЕМАР II з декстраном 70.....	62
2.8. Вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на продукцію TNF α та інтерферону.....	63
2.9. Визначення токсичності нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70.....	65
2.9.1. Визначення гострої токсичності створеного біотехнологічного продукту.....	65
2.9.2. Визначення хронічної токсичності нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70.....	66
2.10. Протипухлинні властивості цитокіна ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 на моделі трансплантованих фрагментів аденокарциноми простати людини у мишей лінії СВА.....	67
2.11. Вплив цитокіна ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 на проліферацію та апоптоз культур клітин.....	68
2.12. Статистичні методи.....	69
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	70
3.1. Оптимізація бактеріальної експресії, отримання, очистка та розщеплення ентерокиназою рекомбінантного цитокіна ЕМАР II.....	70
3.2. Дослідження взаємодії білка ЕМАР II з декстраном 70 методом флуоресцентної спектроскопії.....	79
3.3. Вплив декстрана 70 на агрегацію білка ЕМАР II.....	82

3.4. Біоінформатичний аналіз.....	85
3.5. Пірогенність комплексу ЕМАР II з декстраном 70.....	91
3.6. Вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на продукцію TNF α	92
3.6.1. Токсичність комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на культурі клітин...92	
3.6.2. Продукція ІФН під дією нанокмпозитного комплексу ЕМАР II.....93	
3.6.3. Продукція TNF- α під дією комплексу ЕМАР II з декстраном 70.....93	
3.7. Визначення гострої та хронічної токсичності комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на мишах лінії Balb/c.....	96
3.8. Протипухлинний ефект комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на моделі трансплантованих фрагментів аденокарциноми простати людини.....	100
3.9. Вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на проліферацію культур клітин.....	105
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	109
ВИСНОВКИ.....	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	123
ДОАТОК А.....	147
ДОДАТОК Б.....	152
ДОДАТОК В.....	153

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

A ₂₆₀ , A ₂₈₀	оптична густина при довжині хвилі 260 нм та 280 нм
EMAP II	ендотеліальний та моноцит-активуючий поліпептид II
His•Tag	константна частина рекомбінантного білка, яка несе His-послідовність
IPTG	ізопропілтіогалактопіронозин
Ni-NTA	нітрилтриоцтова кислота, хелатована Ni ²⁺
NTP	нуклеозидтрифосфат
SDS	додецил сульфат натрію
TyrRS	тирозил-тРНК синтетаза
а. з.	амінокислотний залишок
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase — mediated dUTP — biotin Nick — End Labeling), або термінальне дезоксиуридинове мічення кінців
TNF, ФНП	фактор некрозу пухлин
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота
МД	молекулярна динаміка
МТТ	колориметричний тест для оцінки метаболічної активності клітин
НК	нуклеїнова кислота
о. а.	одиниці активності
ДАБ	діамінобензидин
ПААГ	електрофорез в поліакріламідному гелі
тРНК	транспортна РНК
УФ	ультрафіолетовий

ВСТУП

Актуальність теми. Ендотеліальний та моноцитаактивуючий поліпептид II (EMAP II) є продуктом протеолітичного розщеплення мультифункціонального білка p43, що входить до складу аміноацил-тРНК синтетазного комплексу (кодосоми) вищих еукаріотів [1] і є його обов'язковим компонентом [2]. Рівень EMAP II відіграє важливу регуляторну роль в індивідуальному розвитку за допомогою модуляції ангіогенезу і, як наслідок, кровопостачання тканин і органів, а також ендотеліально-мезенхімальних взаємодій [3]. Крім того, він бере участь в ембріогенезі та деяких патологічних процесах, виконує допоміжну роль при апоптозі клітин [4]. Подальші дослідження EMAP II показали, що він має антипухлинні та протизапальні активності [5, 6]. У нормі EMAP II експресується в клітинах різних тканин, але, як правило, його експресія є значно вищою в пухлинах [7]. При цьому клітини різних пухлин відрізняються за рівнем його експресії. EMAP II експресується в інфільтруючих в пухлину макрофагах, служить медіатором, що залучає в пухлину макрофаги, а також є модулюючим фактором експресії ендотеліального фактора судинного росту VEGF, що обумовлює адгезію молекули ICAM -1, фактора некрозу пухлин TNF [8] і ряду клітинних рецепторів. Встановлено, що EMAP II і TNF α проявляють синергізм при впливі на пухлинну тканину [8].

Найбільш помітна роль EMAP II пов'язана з патологічними процесами, в першу чергу, з гострою імунною відповіддю і онкогенезом [8, 9]. У зв'язку з цим в ряді країн ведуться масштабні експериментальні дослідження біологічних властивостей EMAP II.

Слід зазначити, що до цього часу EMAP II ще не застосовується як протипухлинний препарат в клінічній онкології, оскільки не проведені його доклінічні та клінічні випробування. Однією з причин є відсутність налагодженої методики отримання цього цитокіна в препаративних кількостях як нового біотехнологічного продукту, а також здатність білка до агрегації.

Білкові препарати пропонують багато нових терапевтичних опцій, в основному направлених на лікування важких хронічних та онкологічних захворювань. Основною проблемою таких лікарських засобів, є нестабільність макромолекул білків [10, 11]. Для подолання цієї проблеми в фармакології використовують додаткові хімічні речовини [12], одними з яких є декстрини та циклодекстрини, які в якості допоміжних агентів здатні знизити рівень агрегації білкової компоненти, підвищити стійкість до протеолітичних ферментів крові та шлунково-кишкового тракту та збільшити розчинність [13]. Відомо застосування декстрану для захисту та стабілізації структури білків альбуміну, стрептокінази, аспарагіну, інсуліну, гемоглобіну [14]. Фармацевтичні речовини напроксен, даунорубіцин, мітоміцин [15] і цисплатин були функціоналізовані декстраном як ефективні препарати. Зважаючи на це, актуальною є біотехнологічна розробка стабільного комплексу протипухлинного цитокіна ЕМАР II з декстарном 70.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась у рамках тем наукових досліджень 2.2.4.28: «Дослідження нанокмпозитних комплексів білків апарату трансляції вищих еукаріотів тирозил-тРНК синтетази, ЕМАР II та АІМР/p43: фундаментальні та прикладні аспекти» (2018-2022), номер державної реєстрації 0117U002878; «Фундаментальні основи технології отримання нових антипухлинних цитокінів ЕМАР II та АІМР1/p43 та їх нанокмпозитних комплексів» (2015-2019), номер державної реєстрації 0111U000518. Викладені у дисертації положення є складовою частиною комплексних досліджень кафедри мікробіології та імунології ННЦ «Інституту біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка в рамках бюджетної теми «Механізми реалізації адаптаційно-

компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015), номер державної реєстрації 11БФ036-01.

Мета та завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи було проведення оптимізації бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II, отримання гомогенного препарату рекомбінантного білка ЕМАР II високого ступеня чистоти в препаративних кількостях, біотехнологічна розробка нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 для стабілізації білка та дослідження його характеристик.

Відповідно до мети роботи було поставлено наступні завдання:

1. Провести підбір оптимальних умов бактеріальної експресії ЕМАР II з метою оптимізації процесу отримання цього білка; провести очистку та отримати в препаративній кількості рекомбінантний цитокін ЕМАР II.
2. Дослідити вплив температури на стабільність білка ЕМАР II у складі нанокмпозитного комплексу з декстраном 70.
3. Вивчити агрегаційні властивості поліпептиду ЕМАР II у вільному стані та у складі нанокмпозитного комплексу з декстраном 70.
4. Провести біомедичні дослідження нанокмпозитного комплексу, визначити вміст ендотоксинів в нанокмпозитному комплексі ЕМАР II.
5. Дослідити вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на чутливість клітин до фактору некрозу пухлин α .
6. Визначити ступінь токсичності створеного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на мишах лінії Balb/c.
7. Дослідити вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на ксенотрансплантанти аденокарциноми простати людини у мишей лінії СВА.

Об'єкт дослідження: ендотеліальний моноцит активуючий поліпептид II.

Предмет дослідження: нанокмпозитний комплекс ЕМАР II з декстраном 70 та його біологічна активність.

Методи дослідження: бактеріальна експресія рекомбінантних білків, трансформація бактеріальних клітин, афінна хроматографія на Ni-NTA агарозі,

електрофоретичні дослідження, спектрофотометрія, флуоресцентна спектроскопія, робота з культурами клітин, лазерна кореляційна спектрометрія, робота з тваринами, визначення ендотоксинів методом гель-тромб тесту (LAL-тест), отримання ксенографтів пухлин, методи комп'ютерного моделювання, докінгу та молекулярної динаміки, статистичний аналіз та ін.

Наукова новизна одержаних результатів. У ході роботи вперше створено нанокмпозитний комплекс ендотеліального та моноцитаактивуючого поліпептида II (EMAP II) з декстраном 70. Визначено оптимальні умови експресії рекомбінатного білка EMAP II в бактеріальній системі. Показано стабілізацію білка EMAP II у комплексі з декстраном 70 шляхом взаємодії амінокислотних залишків EMAP II: Arg12, Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166 з декстраном 70. Запропонований можливий механізм агрегації цитокіна EMAP II та механізм її запобігання. Проведено низку експериментів щодо встановлення біологічних властивостей нанокмпозитного комплексу EMAP II з декстраном 70.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано та створено термостабільний комплекс EMAP II з декстраном 70, що дозволить в майбутньому проводити доклінічні дослідження його як потенційного протипухлинного комплексу. Оптимізовано бактеріальну експресію цитокіну EMAP II та отримання білка високого ступеня чистоти в препаративних кількостях.

Особистий внесок здобувача. Всі дослідження виконувались за безпосередньої участі здобувача. Автор самостійно підібрав та провів аналіз наукової літератури за темою дисертації. Здобувач особисто підготував та оформив описи патентів на корисні моделі. Більшість представлених експериментів, а також обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто здобувачем. Отримані результати обговорено та опубліковано в спільних публікаціях. Комп'ютерне моделювання та докінг проводили спільно

з м.н.с. Д. М. Ложко, дослідження агрегаційних властивостей проводили на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна, вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на продукцію TNF досліджували спільно з к.б.н., н.с. О.С. Богорад-Кобельською, вплив ЕМАР II на проліферацію культур клітин досліджували спільно з к.б.н. К.В.Коцаренко, вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на апоптоз культур клітин досліджували спільно з к.б.н. Т.О. Голобородько, протипухлинну активність ЕМАР II та його комплексу на тваринах досліджували спільно з к.б.н. Л.І. Поляковою. Здобувачем самостійно запропоновано та створено комплекс ЕМАР II з декстраном 70, досліджена його активність, проведена оптимізація експресії рекомбінатного цитокіна ЕМАР II та показана стабілізація білка ЕМАР II шляхом утворення комплексу з декстраном 70. Автор висловлює подяку д.б.н., проф., член-кор. НАН України Корнелюку О.І. за керівництво, допомогу в плануванні експериментів та обговоренні отриманих результатів. Автор щиро вдячний співробітникам відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за корисні поради під час планування досліджень та обговорення результатів.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертації були апробовані на засіданнях відділу білкової інженерії та біоінформатики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Результати досліджень було також представлено та обговорено на 13-ти конференціях: X Український біохімічний з'їзд (13-17 вересня 2010р, Одеса, Україна), FEBS Special Meetings Jak Stat Signaling: From Basics to Disease (10-13 February 2010, Vienna, Austria), VI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (21-24 вересня 2010, Львів, Україна), Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (24-26 березня 2011, Харків, Україна), 15 Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых "Биология наука XXI века"(Пушино 2011г., Россия), 36 th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's

medicine" (25 - 30 June 2011, Torino (Turin), Italy), П'ята Конференція молодих вчених інституту молекулярної біології і генетики НАН України, *присвячена 130-річчю від дня народження О.О. Богомольця*, (24-25 травня, 2011, Київ, Україна), The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology Advances and Perspectives", (14-17 September, 2011, Ukraine); X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (2-4 грудня 2015, Харків, Україна), XI міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016, Україна); XII Український біохімічний конгрес (30 вересня-4 жовтня 2019, Тернопіль, Україна).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 23 наукові праці, з них 8 статей у фахових журналах, 2 патенти на корисні моделі та 13 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 213 найменувань. Дисертацію викладено на 153 сторінках стандартного машинопису, вона містить 22 рисунки, 5 таблиць та 2 додатки. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано на рисунках та представлено в таблицях.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Цитокін ЕМАР II

1.1.1. Історія відкриття ЕМАР II та загальна характеристика.

Цитокіни включають велику родину невеликих сигнальних білків, які впливають майже на кожен біологічний процес, включаючи ембріональний розвиток, запальні процеси, неспецифічну інфекційну реакцію, когнітивні функції, старіння, клітинний ріст, виживаність, диференціацію та ін.[16]. Ці молекули продукуються однією клітиною і продовжують діяти на іншу клітину з метою змінити функцію клітини-мішені. Різниця з гормонами полягає в тому, що цитокіни являють собою продукти більшості клітин, не будучи частинкою тканини або клітини. На відміну від класичних гормонів, які діють на певні органи-мішені, цитокіни впливають на різні типи клітин та органів. Крім того, як правило, кожна з клітин-продуцентів рідко секретує один цитокін. До того ж, цитокіни контролюють більш широкий спектр властивостей клітин-мішеней порівняно з гормонами [17].

ЕМАР II був виявлений як один з чинників, які модулюють відповідь ендотеліальних клітин на дію фактора некрозу пухлин TNF α . В 1992 році вперше описано виділення тоді невідомого поліпептида, з молекулярною масою біля 22 кДа зі стандартного культурального середовища клітин фібросаркоми миші, індукованої метилхолантреном А. Виділений білок індукував прокоагуляційну активність тканинного фактору в ендотеліальних клітинах і викликав міграцію моноцитів і гранулоцитів. Йому було запропоновано назву ендотеліальний та моноцитаактивуєчий поліпептид II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II, ЕМАРII) [18]. В організмі людини та тварин спостерігається експресія ЕМАР II секреторними епітеліальними клітинами, нейроендокринними клітинами, нейронами і клітинами імунного нагляду.

Відносно високий рівень експресії ЕМАР II виявлений в тканинах щитовидної, підшлункової та слинних залоз, наднирників, в епітелії тонкого і товстого кишечника [7]. Описана наявність ЕМАР II в лімфоїдній тканині селезінки, лімфатичних вузлах та пееєрових бляшках кишечника, в периваскулярній мікроглії головного мозку, в моноцитах і макрофагах [19]. Певний рівень синтезу р43 (попередника ЕМАР II) спостерігається в поперечно-смугастій м'язовій тканині [20]. Відзначено, що експресія ЕМАР II частіше виявляється в тканинах з високим рівнем обміну речовин [7]. У нормі ЕМАР II бере участь в ембріогенезі, залучаючи моноцити в ділянки ембріона, що піддаються апоптозу [21] і виконує функцію фактора, що регулює розвиток судин [22]. Експресія ЕМАР II спостерігається в епітелії, нейронах, кровоносних судинах і ділянках епітеліально-мезенхімальної взаємодії [3]. В ряді експериментів мРНК ЕМАР II виявлена в ділянках формування тканин, в яких методом TUNEL (TdT-dUTP terminal nick-end labelling) виявляється багато апоптотичних клітин. Такі області були виявлені в тимусі і сім'яниках [21]. Здатність ЕМАР II впливати на ангиогенез пояснює його роль у формуванні легень. У постнатальному розвитку і в дорослому стані рівень ЕМАР II в легенях низький, крім нетривалого сплеску, що корелює з термінами дозрівання судин [22].

При клонуванні кДНК ЕМАР II людини і миші було показано, що передбачуваний трансльований з мРНК продукт, що утворюється, має молекулярну масу близько 34 кДа. Було припущено, що білок, масою 22 кДа утворюється в результаті процесингу поліпептиду-попередника з молекулярною масою 34 кДа - ргоЕМАР - II [23]. Клонування кДНК, що кодує білок р43 з мультиферментного т-РНК синтетазного комплексу виявило, що р43 за виключенням його короткої N-кінцевої частини є ргоЕМАР II [24]. Були отримані дані по імунологічному перехрещенню р43 та ЕМАР – II [25]. В той же час ргоЕМАР/р43 є одним з важливих допоміжних компонентів тРНК-синтетазного комплексу [26]. Внутрішньоклітинна 34 кДа форма-попередник ЕМАР II є білком, що експресується у всіх типах клітин та представлена

істотною частиною мультиферментним комплексом тРНК-синтетази або тирозинової тРНК-синтетази [27].

Протеолітична модифікація білка-попередника p43 супроводжується відщепленням ЕМАР II - домена від ділянки послідовності p43 за участю каспази 7 апоптотичного каскаду [41, 42, 37] по сайту ¹⁴¹ASTD↓¹⁴⁵S [43, 21] чи іншим шляхом при гіпоксії клітини [31]. Вивільнюючись у міжклітинний простір, розщеплений p43 (ЕМАР II) стимулює хемотаксис фагоцитів і очищення від клітинних залишків.

Послідовність ЕМАР II в філогенезі структурно і функціонально пов'язана з аміноацил-тРНК синтетазами. ЕМАР II проявляє гомологію до кофакторів аміноацильовання Trbp бактерій [32] і G4p1/Arc1p [33] дріжджів. PheRS бактерій, а також MetRS бактерій [27], дріжджів [34], рослин [33], і *Caenorabditis elegans* [34], містять ЕМАР II-подібні домени. Показана роль ЕМАР II-подібного домену у зв'язуванні тРНК MetRS [35] і роль p43 у зниженні константи Міхаеліса ArgRS [36]. Відповідно до одного з припущень ЕМАР II-домен може бути реліктом домену древніх синтетаз, який зв'язував мініспіралі РНК, що відігравали роль тРНК [35].

Кристалічна та просторова структури ЕМАР II добре відомі (рис.1.1.). У складі білка виявлено ОВ-фолд домен. Послідовність білка, яка відповідає за цитокінову активність (Ser153 – Thr164), локалізована в β1 стренді [37].

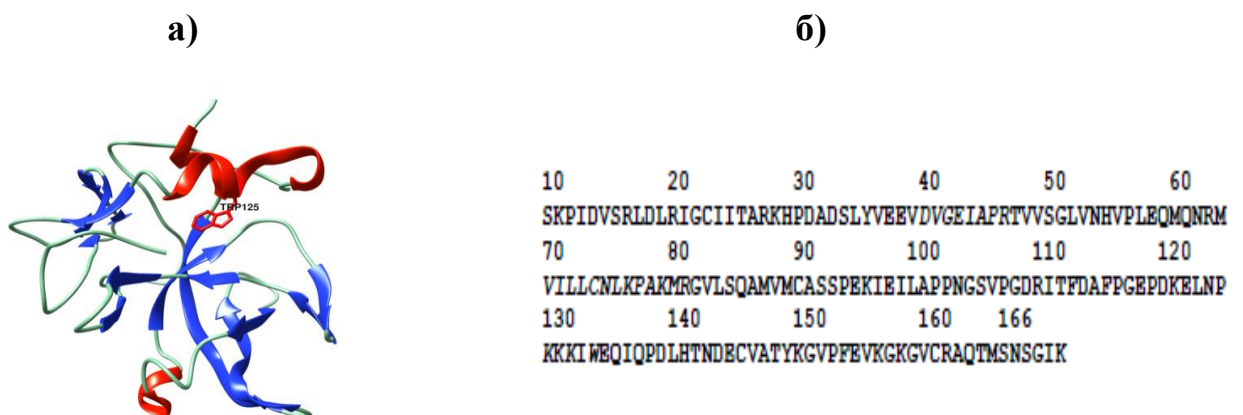


Рис.1.1. Просторова структура ЕМАР II (а) визначена методом рентгеноструктурного аналізу (Protein Data Bank код 1EUI) та амінокислотна послідовність ЕМАР II (б).

Залежно від концентрації ЕМАР II може бути хемоатрактантом нейтрофілів та моноцитів, медіатором відповіді на запалення [53], інгібувати проліферацію ендотеліальних клітин, розмноження лімфоцитів [54], індукувати апоптоз [38]. ЕМАР II виявляє антиангіогену дію [39], індукує експресію фактора некрозу пухлин (TNF) [40] та інтерлейкіну-8, викликає апоптоз ендотеліальних клітин [20, 52].

ЕМАР II вивільняється з клітин (як попередник ЕМАР II так і зрілий білок) у відповідь на різні форми клітинних стресів, включаючи нестачу глюкози і гіпоксію. Все ще існує невизначеність щодо того, яка з форм ЕМАР II, зріла чи попередник, має більш потужну цитокінову активність [42].

В нормі ЕМАР II синтезується в багатьох органах та тканинах: в імунокомпетентних клітинах та органах імунної системи, в секреторному епітелії, в нейроендокринній системі та ендокринних залозах, в нейронах та глії.

1.1.2. Ефекти ЕМАР II на ендотеліальні клітини та клітини лімфоїдного походження. Спочатку ЕМАР II був описаний як білок з молекулярною масою близько 22 кДа, що здатен посилювати прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин людини [18]. ЕМАР II збільшує прокоагуляційну активність ендотеліальних клітин і моноцитів. Механізм дії полягає в посиленні експресії мРНК тканинного чинника (тромбопластину), як показано методом ОТ-ПЦР і моноспецифічними антитілами до тканинного чинника [43]. Він викликає збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , за рахунок його перерозподілу з внутрішньоклітинних депо, посилює секрецію чинника Вон-Віллебранта, транслокацію Р-селектину на поверхню цитоплазматичної мембрани а також утворення і секрецію Е-селектина.

ЕМАР II викликає у моноцитів і лейкоцитів позитивний хемотаксис з вираженою концентраційною залежністю, призводить до перерозподілу запасів Ca^{2+} всередині клітини і дозозалежному підвищенню активності внутрішньоклітинної мієлопероксидази [44].

При дослідженні пухлин було висловлено припущення, що клінічне значення ЕМАР II полягає в інгібуванні ангиогенезу і пригніченні росту первинних і вторинних пухлин без впливу на нормальні тканини. Останні дослідження показали, що ЕМАР II викликає дозозалежне інгібування проліферації та ініціює апоптоз в лімфоцитах; таким чином, лімфоцити є мішенями цитотоксичної активності ЕМАР II [55, 56, 57].

Щодо механізму дії ЕМАР II слід відмітити, що в ендотеліальних клітинах цей білок різко підвищує експресію TNF та його рецептора. Можливо, ЕМАР II бере участь у транспортуванні цього рецепторного білка із апарату Гольджі до клітинної мембрани сенсibiliзуючи при цьому пухлинні та ендотеліальні клітини до дії TNF. Виявлено синергізм в дії ЕМАР II та TNF на апоптоз, що пов'язано з реалізацією через один і той же фермент – протеїнкіназу JNK [60] а також в пригніченні експресії VEGF в пухлинній тканині [8].

Декілька досліджень вказують на роль TNF α в ангиогенному сигнальному шляху AIMP1/p43 – білка-попередника ЕМАР II. AIMP1/p43 викликає вражаюче збільшення експресії TNF α , потужного регулятора як про-, так і антиангиогенної активності [48]. Що стосується проангиогенної активності, TNF α підвищує експресію VEGF через активацію NF- κ B [49] і, можливо, шляхом стимуляції секреції YARS і TARS. І навпаки, TNF α також індукує апоптоз в ендотеліальних клітинах, надаючи антиангиогенну активність [50]. AIMP1/p43-стимульована секреція TNF α ініціює фосфорилування і активацію ERK1/2, що відомий як ангиогенний сигнал. Необхідність активації ERK1/2 для регулювання AIMP1/TNF α було підтверджено з використанням інгібітора MEK U0126, який, як було показано, послаблює індукцію TNF α [48]. Таким чином, активація TNF α ERK1/2, ймовірно, сприяє ініціації проангиогенної фази сигнального шляху AIMP1/p43 і ЕМАР II. Проте, більш високі концентрації або тривала секреція AIMP1/p43 чи ЕМАР II посилює поверхневе представлення рецептора TNF 1 (TNFR1) на ендотеліальних клітинах, тим самим полегшуючи

індукований TNF α апоптоз через домен смерті TNFR1 [46]. На додаток до своєї ролі в запальних процесах, кілька різних досліджень показали, що ЕМАР II може брати участь у канонічних ангіогенних шляхах. ЕМАР II інгібує міграцію ендотеліальних клітин, порушуючи взаємодію між FN1 і альфа5-бета1 інтегринами [51]. Аналізи на основі ELISA тестів показали, що ЕМАР II безпосередньо взаємодіє з VEGFR1 і VEGFR 2, інгібуючи зв'язування VEGF [52]. ЕМАР II інгібуючи VEGFR запобігає фосфорилуванню сигнальних медіаторів, включаючи АКТ, ERK1/2, p38MAPK і Raf, а також VEGF-залежну міграцію ендотеліальних клітин [53]. Слід відзначити, що більшість з перерахованих вище функцій були досліджені при концентраціях ЕМАР II, які індукують інгібіторну частину двофазної відповіді ЕМАР II. Тому в нормальних умовах можливо, що ці інгібіторні ефекти відкладені відносно початкової індукції ангіогенезу, пов'язаної з сигналізацією на основі VEGF і гіпоксії [53].

1.1.3. Протипухлинна активність ЕМАР II. ЕМАР II бере участь в патогенезі багатьох захворювань, так чи інакше пов'язаних з запальною відповіддю і аутоімунними процесами, але найбільш дослідженою і найбільш значущою для медицини є його роль в онкогенезі [63, 64, 65]. Як правило, ЕМАР II експресується в пухлинах, але клітини різних пухлин відрізняються за рівнем його експресії [15, 66]. ЕМАР II експресується в інфільтруючих в пухлину макрофагах [58], служить медіатором, що повертає в пухлину макрофагів [59], а також фактором, модулюючим експресію ендотеліального фактора судинного росту VEGF, що обумовлює адгезію молекули ICAM -1, фактора некрозу пухлин TNF і ряду клітинних рецепторів [20, 18, 21].

Протипухлинна дія ЕМАР II експериментально показана на різних типах пухлин [60]. При вивченні рівня експресії ЕМАР II в чотирьох різних лініях меланоми людини було виявлено відмінність в рівнях мРНК більш ніж в 2,5 рази, а також відмінність в рівнях біологічної активності ЕМАР II в 5,8 разів. При цьому, чутливість цих ліній до геморагічної дії TNF α також була різною і

знаходилася в чіткій кореляції з рівнем експресії ЕМАР II [43]. Внутрішньочеревне введення ЕМАР II мишам, що мають карциному Люїса або карциному молочної залози людини, призводило до пригнічення зростання і зменшення об'єму імплантанта. У експериментах з макрометастазами карциноми Люїса введення ЕМАР II також ефективно призводило до пригнічення зростання останніх [8, 16]. Іншими вченими було показано цитотоксичний вплив ЕМАР II на клітини гліоми мозку [67, 68].

Раніше нами спільно з Інститутом ендокринології та обміну речовин ім.В.П.Комісаренка АМН України також було досліджено вплив ЕМАР II на ріст ракової пухлини передміхурової залози та показано здатність цього білка інгібувати ріст трансплантованим мишам ксенографтів аденокарциноми простати людини. Виражена протипухлинна активність ЕМАР II підтверджена даними гістологічного дослідження. В ксенографтах, які піддавалися впливу ЕМАР II, проявлялась виражена лімфоїдна інфільтрація, підсилення апоптозу та некрозу, який, скоріш за все, обумовлений активацією TNF та результатом прозапальних цитотоксичних реакцій. Індукція апоптозу проявлялась як в появі апоптичних тілець, так і в збільшенні кількості флуоросціюючих клітин з фрагментованої ДНК (TUNEL метод) [65, 69].

Відомо, що ЕМАР II регулює продукцію TNF α за допомогою рецептору TNFR при взаємодії з CD23 [48]. Зв'язки TNF α з ангіогенезом і запаленням добре встановлені в літературі [66]. Особливий інтерес представляє дозозалежний ефект TNF α , при якому даний фактор так само як і ЕМАР II при низьких концентраціях стимулює ангіогенез, а при більш високих концентраціях інгібує його [6].

1.1.4. ЕМАР II і апоптоз. Властивість ЕМАР II інгібувати неоангіогенез та стимулювати апоптоз пухлинних клітин привела до думки а чи не може ЕМАР II бути використаний в якості протипухлинного лікарського засобу. В дослідях на тваринах успішно показано протипухлинний вплив ЕМАР II при терапії

гліоми [67], саркоми [20, 73], раку шлунку [69] та інших видів злоякісних пухлин [61] як в режимі монотерапії, так і в комбінації з TNF [68].

Так само як і TNF α , EMAP II здатний викликати апоптоз [53, 35, 66]. При обробці ендотеліальних клітин протягом 24 годин цитокіном в концентрації 20 мкг/мл розвивалася морфологічна картина, яка характерна для апоптозу, що також було підтверджене TUNEL – методом. При цьому обробка клітин циклогексимидом в концентрації 30 мкг/мл посилювала ефект EMAP II. У іншому дослідженні спостерігалось посилення здатності EMAP II індукувати апоптоз при кисневому голодуванні культури клітин [8, 61, 15].

Як відомо, апоптоз відіграє значну роль в ході ембріонального розвитку багатоклітинних організмів. Вивчення диференціальної експресії EMAP II виявило, що він відіграє певну роль в ході розвитку ембріона. Співставляючи отримані дані з даними про здатність викликати апоптоз у ендотеліальних клітин, був зроблений висновок про те, що EMAP II відіграє роль негативного регулятора ангиогенезу при розвитку легенів [75, 63]. Пізніше була вивчена диференціальна експресія EMAP II в різних тканинах ембріона миші, що розвивається. Вперше в ході розвитку експресія EMAP II спостерігалася в нейроепітеліальних клітинах на 8-9 день після зачаття. У подальшому його експресія в центральній і периферичній нервових системах, що розвиваються, набувала широкого характеру. На пізніших стадіях експресія EMAP II виявлялася в печінці, серці і стромальній тканині аорти. В легенях, шлунково-кишковому тракті, нирках і сечостатевої системі експресія виявлялася лише в мезенхімо-епітеліальних з'єднаннях. У дорослому стані експресія EMAP II проявляється лише в периваскулярних ділянках, що підтримує гіпотезу про EMAP II, як статичного модулятора формування кровоносних судин та ангиогенезу [34, 14, 66].

Murray et al, виявили, що EMAP II викликає дозозалежне інгібування проліферації і апоптозу в Т-лімфоцитах і мітогенактивованих мононуклеарних клітинах периферичної крові і являє собою компонент нового

імуносупресивного шляху в солідних пухлинах [72]. Пізніше ті ж автори пов'язували здатність ЕМАР II індукувати смерть лімфоцитів з гіпоксією при колоректальному раку [57, 55].

Виявилось, що при високих концентраціях ЕМАР II викликає апоптоз ендотеліальних клітин *in vitro* та інгібує ангиогенез пухлини. ЕМАР II викликає апоптоз клітин ендотелію шляхом індукції Fas-асоційованого домена клітинної смерті та зниження рівня Bcl-2, який інгібує апоптоз. Цілком можлива участь цього цитокіну у неоваскулогенезі при хронічній місцевій гіпоксії та інших патологічних станах. Доведено підсилення експресії ЕМАР II при гіпоксії [32, 6, 9].

Для координації судинного росту і підвищення імунного нагляду можуть служити низькі концентрації ЕМАР II (близько 0,1-1 нМ) [74]. В той же час, у відносно високих концентраціях (порядка 10 нМ) ЕМАР II впливає на тканини, в які так чи інакше потрапляє, в цілому деструктивну дію, засновану на підвищенні експресії деяких ефекторних факторів (тканинного фактора в судинному епітелії), апоптозу (наприклад, при введенні в пухлину) або аутоімунному пошкодженні (як посередник імунної відповіді) [75].

1.1.5. ЕМАР II і ангиогенез. Як ЕМАР II, так і повнорозмірний АІМР1 регулюють ангиогенез у різних дослідженнях. Однак характер цього регулювання не є прямим, оскільки обидва проявляють дозозалежні і двофазні характеристики [21, 24, 78]. Низькі концентрації (від 0,25 до 1 нМ) як ЕМАР II, так і АІМР1 індукують міграцію ендотеліальних клітин в досліді проміжної міграції. І навпаки, концентрації 10 нМ і вище демонструють залежне від дози інгібування в одному і тому ж експерименті і, здається, пов'язані з індукцією апоптозу, специфічного для ендотеліальних клітин [76]. Важливо відмітити, що ефект ЕМАР II залежить від дози/концентрації. В високих дозах проявляється антиангіогенний вплив та інші властивості, що протидіють росту пухлинних тканин такі як підсилення апоптозу, прокоагулятивна активність та ін. Штучна стимуляція апоптозу в культурі ракових клітин приводить до значного

збільшення секреції p43, а через декілька годин в міжклітинній рідині з'являється зріла форма ЕМАР II. Також необхідно відмітити різке (більш ніж в 2 рази) збільшення експресії TNF, макрофагів, молекул клітинної адгезії, прозапальних хемокінів та цитокінів. Експерименти з ЕМАР II виявили антиангіогенні відповіді в досліджах трубчастого кільця і аортального кільця щурів при концентраціях 20 мкг/мл (0,6 мкМ) і більше [8]. Причина цього двофазного сигналіngu може бути пов'язана з різною чутливістю специфічних каскадів кіназ [76].

ЕМАР II - потужний антиангіогенний фактор, відіграє значну роль у розвитку судинних легеневих артерій і бере участь в інгібуванні неоваскуляризації легенів та епітеліального морфогенезу дихальних шляхів [22]. Було визначено, що ЕМАР II має значні антиангіогенні властивості [4, 63]. Його антиангіогенний потенціал був додатково встановлений, коли було виявлено, що ЕМАР II пригнічує місцевий ріст пухлини, значно знижує кількість мікросудин та індукує більш високу частоту судинного тромбозу [5]. Важливо, що саме в цих дослідженнях було зазначено вплив ЕМАР II на не ендотеліальні клітини, оскільки також було помічено зменшення проліферації пухлинних клітин [67]. На додаток до судинної регуляції пухлини, введення ЕМАР II помітно знизило рівень індукованого вірусом простого герпесу ангіогенезу тим самим знижуючи тяжкість ураження стромальних кератитів очей [77]. Ці дослідження свідчать про те, що ЕМАР II є ангіостатичним медіатором, який пригнічує неоваскуляризацію [54].

На додаток до ролі ЕМАР II у зміні фізіології ангіогенезу, було описано, що він проявляє тимчасові запальні властивості [5, 54, 10, 56]. ЕМАР II також регулює продукцію запальних молекул, таких як TNF, інтерлейкін-8 та сприяє адгезії моноцитів. Цікаво, що повнорозмірна АІМР1 є більш потужним індуктором міграції клітин та апоптозу, ніж розщеплена до пептиду ЕМАР II, що свідчить про роль всього білка в сигнальних шляхах [78].

1.2. Агрегація білків

Терапевтичні засоби на основі білків стають все більш важливим класом фармацевтичних препаратів, які мають ряд переваг перед препаратами з невеликими молекулами [79]. Препарати на основі протеїнів проявляють більшу специфічність щодо мішеней, а також меншу токсичність [80]. Білкові терапевтичні засоби використовуються для широкого спектру медичних застосувань, включаючи гормональну терапію, онкологію, аутоімунні порушення і як протиінфекційні агенти [79]. Одним із складних аспектів фармацевтичної розробки терапевтичних засобів на основі білків є лабільний характер їхньої структурної цілісності більш високого порядку, що, в свою чергу, робить цей клас препаратів дуже сприйнятливим до деградації під час виготовлення, зберігання та введення [83, 84, 85].

Агрегація білків - один з факторів, який заважає при дослідженні білків *in vitro* та є досить розповсюдженою проблемою в біотехнологічних та фармацевтичних розробках.

Дослідження проблеми агрегації білків є актуальним напрямом сучасної біології [84]. Агрегація білків - це незворотна збірка білкових молекул, що утворюють олігомери з нативними або неприродними білковими структурами, які можуть бути розчинними або нерозчинними [85]. Деякі механізми формування агрегатів недостатньо зрозумілі, але можливо реєструвати кінетику утворення агрегатів під час обробки та зберігання препаратів. Крім того, внаслідок різноманітної природи та складу агрегати білків можуть бути різних розмірів, від нанометрів до сотень мкм [86], при цьому необхідні численні комплементарні аналітичні методи для моніторингу та кількісної оцінки фізичної нестабільності білків [89, 90].

Агрегацію білків зручно класифікувати за наступними критеріями: *in vitro* чи *in vivo*, впорядкована чи невпорядкована [85]. Тому корисність високопродуктивних біофізичних аналізів для моніторингу як конформаційної

стабільності білка, так і агрегації білків при широкому спектрі експериментальних умов набуває все більшого значення.

При характеристиці біотерапевтичних засобів агрегації приділяється особлива увага як важливому аспекту якості препаратів. Оскільки, при виробництві білкових препаратів, саме затність до агрегації може слугувати для подальшої непригодності таких засобів. Агрегація білків виникає в процесі виробництва білкових терапевтичних засобів як при експресії та очистці білків так і в процесі приготування лікарських засобів на їх основі. Агрегати білків можуть викликати зниження ефективності лікарських засобів, а також імуногенну реакцію у пацієнтів [89], оскільки у білків більше шансів викликати імунну відповідь у пацієнтів, що є важливою безпекою питання [90]. Саме тому агрегати білків вважається найважливішим аспектом якості при розробці біопрепаратів [91]. При порушенні нативної структури білки стають функціонально неактивними, менш стабільними та підвищується здатність до агрегації, що може призвести до широкого спектру патологічних станів клітини та цілого організму [92]. Таким чином, розробка, регулювання та виробництво білкових терапевтичних засобів вимагають дуже складних аналітичних методів для контролю якості [90]. Білки за своєю суттю нестійкі молекули і можуть бути структурно змінені теплом, тривалим зберіганням, денатурантами, органічними розчинниками, киснем, зміною рН та іншими факторами, які є частиною виробничого процесу [93].

Одним з ефективних засобів боротьби з проблемою агрегації є використання лігандів, що цьому запобігають [96, 97]. Ці допоміжні речовини широко використовують під час виробництва, очистки та приготування лікарських форм білкових препаратів [98, 99, 89].

На сьогодні для вирішення цілого спектру дослідницьких та прикладних задач в медицині та біології застосовують ряд фізичних та біологічних методів, таких як атомно-силова та електронна мікроскопія, методи статичного та динамічного світорозсіювання та інші [96]. Серед них методи статичного та

динамічного світорозсіювання є досить простими та доступними. Вони дозволяють досліджувати частинки в рідинах в широкому діапазоні розмірів. Завдяки неінвазивності методів світорозсіювання, а також можливості їх застосування без порушення цілості зразків, дані методи є незамінними при дослідженні розчинів біологічних макромолекул [97]. Вказані методи дозволяють успішно досліджувати процеси агрегації та дисоціації макромолекул, оцінювати їх молекулярну масу та форму [102, 103, 100], визначати розміри білків та їх агрегатів, вивчати процеси за участі білків в водних розчинах залежно від концентрації солей (включаючи і важкі метали, рН) [10].

Найбільш поширена ідея про механізм агрегації білків в розчині полягає в тому, що частково розгорнуті стани протеїнів (які також називаються станом розплавленої глобули або станами А, якщо білок є денатурованим кислотою) зі зниженою, але все ще істотною вторинною структурою і чітко зниженою третинною структурою піддаються гідрофобним взаємодіям і згодом агрегують [105, 87]. Для пригнічення агрегації в розчині необхідно максимізувати дві фізичні властивості білка: конформаційну та колоїдну стабільність. Конформаційна стабільність може бути збільшена шляхом вибору сприятливих умов розчину. Важливим фактором, що приводить до таких умов, є відповідний рН розчину. Іншим важливим фактором, який впливає на конформаційну стабільність білків і, отже, прискорює агрегацію в розчині є температура. Високі температури прискорюють агрегацію [101]. Часто агрегація починається значно нижче температури, яку експериментально визначають як температуру плавлення білка (температура, при якій 50% молекул білка розгортаються під час термічного переходу) [102], підтверджуючи припущення, що агрегати не утворюються з повністю розгорнутих мономерів, але що певна фракція частково розгорнутого мономера є достатньою для стимулювання агрегації [103]. Термічна стабільність білків дуже мінлива. На конформаційну стабільність також може впливати зв'язування з лігандами. Зв'язування лігандів

з нативним станом білків зсуває складну рівновагу процесів утворення конгломератів в бік більшої популяції нативних білкових молекул. Отже, схильність білка до агрегації буде зменшена [109, 110].

Третім основним фактором індукції агрегації білків вважаються процеси заморожування та відтавання (F / T) [106]. F / T процеси відбуваються на декількох етапах під час виготовлення, обробки, зберігання та аналітики білкових фармацевтичних препаратів [106, 112]. Наприклад, ліофілізовані розчини білків зазвичай зберігаються при -70°C в якості проміжного етапу при виробництві комерційних фармацевтичних препаратів в зв'язку з тим, що вони в ліофілізованому стані більш стабільні порівняно зі зберіганням в рідкому стані. Для подальшої обробки об'ємні розчини знову розморожують [108]. Тому важливим етапом при розробці біопрепаратів для медичного застосування є дослідження стабільності активних речовин при дії температур.

Вплив взаємодії білок-ліганд на стабільність білка, як правило, контролюється за допомогою ряду встановлених аналізів у фазі розчину. Щоб зрозуміти природу утворення біомолеку, важливо ідентифікувати партнерів по зв'язуванню цих молекул та охарактеризувати силу взаємодій. Це привело до використання самих різноманітних біофізичних методів для вивчення зв'язування ліганда, які зазвичай засновані на спектроскопічних властивостях молекул або на зміні енергії зв'язування. Зв'язування ліганда з білком може значно стабілізувати білок від розгортання.

Більшість лігандів стабілізують білки при зв'язуванні, при цьому температура плавлення білка підвищується [109].

1.3. Декстран 70 - властивості та будова

Наномедицина стала перспективним засобом поліпшення терапевтичних показників і зниження системної токсичності традиційної

хіміотерапії. Внаслідок цього для збільшення ефективності препаратів FDA схвалено більш ніж 20 терапевтичних наночастинок [98, 114, 91].

Декстран відноситься до сімейства природних полісахаридів, які широко використовуються в клінічних і доклінічних дослідженнях з добре охарактеризованим профілем безпеки навіть при дуже високих дозах [111]. Коли Пастер вперше в 1861 році виділив декстрин він, звичайно, не очікував, що ця проста структура, синтезована бактеріями може знайти такі широкі застосування в медицині [112]. Декстран складається з α - (1 \rightarrow 6) і частково α - (1 \rightarrow 3) зв'язаних одиниць D-глюкози з різними гілками в залежності від бактеріального штаму, що продукує декстран. Декстран – це полімер глюкози із різною ступінню полімеризації, в залежності від якої виконує різні функції при введенні в організм [113]. Декстран застосовувався клінічно протягом більш ніж п'яти десятиліть як замітник плазми, а також як антитромболітичний засіб [114]. Як бактеріоподібний біополімер [115], декстран може бути синтезований з сахарози або з малкодекстринів. Тим часом декстран піддається ферментативній деградації декстраназою, яка існує в тканинах ссавців (включаючи людські).

Відомо, що молекула декстрану покращує структурну стабільність ліофілізованих продуктів, стабільність білків та відновлення активності ферментів після ліофілізації. Декстран часто використовують як допоміжну речовину та наповнювач для ліофілізації білків [116]. Декстран можна використовувати як кріопротектор у поєднанні з DMSO, гліцерином та ін. Він часто використовується як розчин для зберігання та підготовки органів до трансплантації. Декстран широко використовується в фармацевтичних препаратах для перорального застосування. Його застосовують для твердості та консистенції речовини під час обробки, наприклад сублімаційної сушка. Декстран також може використовуватися для зміни профілю розчинення лікарських препаратів.

Декстрини протягом десятиліть мали ярлик GRAS (загально визнаний як безпечний) від FDA США, який був оновлений у 2013 році.

Біосумісність декстрану була добре задокументована; таким чином, декстран широко досліджувався в біомедичних і фармацевтичних галузях [120, 121, 122]. Декстрини зазвичай використовують для зниження судинного тромбозу, зменшення запальної реакції, запобігання ішемії при реперфузійних травмах при трансплантації органів [120], де декстран діє як поглинач м'яких реактивних форм кисню. Для лікування дефіциту заліза використовують похідні залізо-декстрану [121], діетиламіноетил-декстран знижує рівень холестерину і тригліцеридів, а декстран-сульфат може бути використаний як покриття для підвищення біосумісності неорганічних систем [122]. Декстран також застосовується в наномедицині, новій дисципліні, яка застосовує субмікронні частинки для терапевтичних і діагностичних цілей [123]. Даний полісахарид також використовується для захисту і стабілізації унікальної структури білків альбуміну, стрептокінази, аспарагіну, інсуліну, гемоглобіну [127, 128].

Медичний декстран доступний в діапазоні молекулярних розмірів від 5,9 до 77,0 нм. Наявність широкого діапазону розмірів в поєднанні з нейтральним зарядом робить декстран ідеальним лігандом для застосування в фармакологічній практиці [109, 129]. Синтетичні і природні полімерні матеріали, що використовуються для таргетної медицини повинні бути біосумісними. Через біосумісність, біодеградацію і місця розпізнавання клітинної поверхні, полісахариди є популярним класом сполук для використання в якості доставки лікарських засобів [104]. Полісахариди декстран, хітозан і целюлоза мають велику кількість реакційноздатних гідроксильних груп і змінну молекулярну масу, що сприяє їх структурній різноманітності. Біополімери, такі як хітозан, володіють функціональністю за рахунок їх аміногруп; хімічна модифікація може перетворювати деякі амінні групи в інші групи і таким чином змінювати початкові функціональні

характеристики молекули [117]. На відміну від інших полісахаридів, включаючи хітозан, альгінат і гіалуронову кислоту, які мають різні функціональні групи, декстран має тільки гідроксильні групи.

Декстран не має поверхневого заряду, забезпечуючи додаткову перевагу для системи доставки лікарських засобів, оскільки системи без поверхневого заряду можуть зменшити адсорбцію білка плазми і збільшити швидкість неспецифічного поглинання клітин [127]. Присутність великої кількості гідроксильних груп полегшує введення лікарського засобу в основу полімеру. Фармацевтичні речовини напроксен, даунорубіцин, мітоміцин С [15] і цисплатин [128] були функціоналізовані декстраном як ефективні препарати. Повністю водорозчинний і гідрофобно модифікований декстран утворює міцели, які можуть бути використані для захоплення лікарського засобу [114]. В цілому, результати показують, що конструювання наноструктур декстрану з лікарськими препаратами на основі комбінаторних принципів є перспективним підходом для доставки широкого спектру протипухлинних препаратів [13]. Декстран може бути модифікований з урахуванням різних функціональних можливостей і формувати від нано- до макроструктурованих каркасів, і ці каркаси знайшли різні застосування в доставці ліків і тканинної інженерії [129]. Декстран в значній мірі використовується також як матеріал для покриття для захисту та поліпшення біосумісності [130] і для багатьох інших застосувань [126, 136].

1.4. Власна флуоресценція білків

На сьогодні, одним з найбільш чутливих та інформативних методів дослідження конформаційних змін білків в розчині є метод флуоресцентної спектроскопії [137, 48]. При флуоресцентному аналізі макромолекул використовують два типи молекул флуоресціюючих хромофорів: власні та

внесені. Білки містять тільки три власних флуорофори – залишки триптофана, тирозина та фенілаланіна. На практиці частіше за все використовують флуоресценцію триптофана [133]. Основна мета вивчення власної флуоресценції білків – одержання інформації про їх конформацію. Основною перевагою флуоресцентної спектроскопії є досить недороге необхідне обладнання та висока інформативність методу [134]. Зокрема, використання внутрішньої флуоресценції триптофану дає можливість вивчати будову і функцію білків без необхідності їх модифікації. Властивості спектрів випромінювання флуоресценції можуть опосередковано повідомляти про положення залишку триптофану всередині білка, тобто вторинної структури білка, третинної, та/або четвертинної структури, а також на зміни структури протеїну, наприклад, внаслідок зв'язування ліганду [135]. Зміни інтенсивності випромінювання флуоресценції чітко відображають зміни в оточенні триптофану. Контролюючи флуоресценцію триптофану, отримують інформацію про місцеве оточення триптофанових залишків у складних білках, а також оцінюють зміни оточення триптофану, наприклад, під час згортання/розгортання, структурної перебудови або зв'язування речовин, що дозволяє кількісно оцінювати такі процеси [136]. В той же час такі флуоресціюючі ароматичні амінокислоти як тирозин та фенілаланін поведуть себе по-іншому. Характеристики випромінювання цих залишків не значно залежать від місцевого оточення. Таким чином, виключно триптофан підходить для отримання інформації про структуру в межах білка. Проте спектр випромінювання триптофану, який контролюється для конкретного білка є сумою індивідуальних флуоресцентних емісійних спектрів всіх триптофанів, присутніх в білку, які можуть відрізнитися за своїми спектральними характеристиками. Таким чином, аналізи з використанням спектрів випромінювання триптофану є найбільш значущими, коли досліджують пептиди або малі білки, оскільки кількість залишків триптофану обмежена. В таких випадках інтерпретація спектрів і спектральних змін більш прямолінійна,

ніж у випадку білків, що містять множинні триптофани. Емісія флуоресценції триптофану може змінюватися, коли до розчину білка додають речовини і вони взаємодіють з протеїном (наприклад, зв'язування ліганду) та/або змінюють білок (наприклад, денатурація білка або гасіння флуоресценції [136]).

Цитокін ЕМАР II містить в своїй структурі тільки один залишок триптофану в положенні 125 (Trp125), котрий є природним флуоресцентним зондом в просторовій структурі білка [141, 11].

Флуоресценція білків збуджується в максимумі поглинання при 280 нм або більших довжинах хвиль. Поглинання білків при 280 нм пов'язано з тирозиновими та триптофановими залишками [138]. При довжинах хвиль >295 нм поглинає основним чином триптофан, і його флуоресценція може бути селективно збуджена в діапазоні 295 – 305 нм [139]. Флуоресцентні методи дають унікальні можливості вивчення збуджених станів молекул, динаміки швидких молекулярних процесів, структури и властивостей складних хімічних і біологічних об'єктів [140].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

Усі використані реагенти відповідають вимогам, прийнятим для застосованих методів.

У роботі були використані наступні реактиви і матеріали: ентерокіназа – «BioLabs», P8070S; 2-меркаптоетанол – «Merk» (Німеччина); додецилсульфат натрію – «Sigma» (США); персульфат амонію – «Bio-Rad» (США); дитіотриетол – «Fluka» (Швейцарія); трис – «Sigma» (США); акриламід та N,N-метиленбісакриламід – «Bio-Rad» (США); кумасі блакитний R-250 та кумасі блакитний G-250 – «Bio-Rad» (США); кумарова кислота, люмінол – «Sigma» (США); ЕДТА – «Serva» (Німеччина); TEMED – «Bio-Rad» (США); твін-20, тритон X-100 – «Serva» (Німеччина); бромфеноловий синій – «Bio-Rad» (США); нітроцелюлозні фільтри – «Hybond-C» «Amersham» (США); мембранні фільтри «Roth» з діаметром пор 22 мкм., альбумін сироватки бика – «Sigma» (США); L-глутамін (Sigma); HEPES (рН 7,4; Serva, Німеччина); фетальної телячої сироватки («Poly-Labo», France); ембріональна теляча сироватка (Sigma, США); живильне середовище RPMI-1640 (Biowhittaker, France) ; білкові маркери молекулярної маси для електрофорезу – «Bio-Rad» (США), IPTG – «Fermentas» (Литва); декстран-70 (Біотика АТ, Республіка Словаччина); набір реактивів «ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7100» (Chemicon Int., США-Канада, поживне середовище MEM (Serva); 96-лункові плоскодонні планшети (Sarstedt, Німеччина); актиноміцин D. Використовували також $MgCl_2$, NaCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaOH, KOH, C_2H_5OH , HCl, H_3PO_4 , H_2O_2 , трихлороцтову кислоту, оцтову кислоту, розчин параформальдегіду, діетиловий ефір, розчин Буена, гематоксилін та еозин,

версен, канаміцин, пеніцилін, гліцерин вітчизняного виробництва кваліфікації о.с.ч., трипановий синій. Використовували буферні розчини такого складу: PBS: 50 мМNa₂HPO₄, 150 мМNaCl; PBST: 50 мМNa₂HPO₄, 150 мМNaCl, 0,1 % Твін-20; TFB1 (10 мМКCl, 50 мМMnCl₂, 30 мМКAc, 10 мМ CaCl₂, 15 % гліцерину); TFB2 (10 мМMOPS, 10 мМКCl, 75 мМ CaCl₂, 15 % гліцерину). Компоненти поживних середовищ для бактеріальних культур – бактопептон “Merck” (Німеччина), екстракт кормових дріжджів НПО “Питательные среды” (Росія). Середовище LB (на 1 л): бактотриптон 10 г, дріжджовий екстракт 5 г, NaCl 10 г, рН 7,2-7,4. М'ясо-пептонний бульйон: пептон, суміш амінокислот, Na₂CO₃, NaCl. Мінімальне середовище А: глюкоза, тіамін, біотин, MgSO₄, CaCl₂, NH₄Cl, NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, солі заліза, цинку, міді, кобальту, бору, марганцю у якості мікроелементів. Агаризовані середовища готували з рідких шляхом додавання 15 г агару на 1 л рідкого середовища, агар “Oxoid” (Великобританія). Всі буферні розчини готували на основі води надвисокої очистки, отриманої за допомогою системи очистки води «Milipore» (США). Контроль рівню рН проводили за участі рН-метра компанії «Mettler Toledo» (США). Для бактеріальної експресії рекомбінантних білків використані штамп-продуценти, отримані на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE, експресуючий вектор pET30a “Novagene” (США). Плазмідні конструкції pET30a-EMAP II надані к.б.н. Дубровським О. Л.

При виконанні цієї роботи використано прилади і обладнання таких марок та виробників: термостати TC-80 (Україна), термостат з постійним рівнем CO₂ (5%), центрифуги K-23 “Janetcky” (Німеччина), “Sigma 1-13” (США), Eppendorf 5804 та Eppendorf 5417R, спектрофотометр BioMate 5 (Велика Британія), денситометр LKB UltraScan XL (Швеція), спектрофотометр флуоресцентний «Hitachi 850» (Японія), ультразвуковий дезінтегратор MSE 150W (Велика Британія), вертикальний планшетний спектрофотометр Multiscan Ascent (“Thermo Labsystems”, Фінляндія), рН-метр EB-74 (Білорусія), ваги “KERNABS” (Німеччина), автоматичні піпетки та дозатори LabSystems”

(Фінляндія), "Gilson" (Франція), прилад для напівсухого перенесення CSLSemiDryMiniSystem "CleaverScientificLtd" (США), джерело струму Stuart Scientific SI50, шейкер-інкубатор BioSanES-20 (Латвія), морозильники "Nord" (Україна), "Минск 17" (Україна), холодильник "Атлант" (Україна), кельвінатор ліофільна сушка, запаювач ампул. Всі експерименти проводилися з використанням високочистого скляного та стерильного пластикового посуду, наконечників одноразового використання («Deltalab», Іспанія) та автоматичних піпеток фірм «Eppendorf» та «Gilson».

В роботі було використано патоморфологічний матеріал дослідних груп мишей-самців лінії BALB/c, віком 2-3 місяці які отримували різну кількість нанокмпозитного протипухлинного препарату ЕМАР ІІ. Після забору матеріал одразу заморожували у рідкому азоті та зберігали при температурі – 70 °С до використання.

Тестування протипухлинної активності ЕМАР ІІ проводили на мишах лінії СВА, що полягає у гетеротрансплантації ксенографтів злоякісної пухлини. Зразки малігнізованих тканин були взяті у хворих під час радикальної простатектомії пухлин простати, що виконувалася в Київському обласному онкологічному центрі. Хворі не отримували неoadьювантну терапію. Тканини пухлин відносились до помірно диференційованих (6 балів за шкалою Гліссона).

Для дослідження здатності нанокмпозитного препарату ЕМАР ІІ впливати на проліферацію клітин використовували іморталізовану клітинну лінію 4BL6 (клітини, отримані з периферичної крові людини) та Нер-2 (перевивна клітинна лінія, отримана з аденокарциноми гортані людини).

Для вивчення впливу нанокмпозитного препарату на апоптоз використовували культури клітин раку простати людини лінії LNCaP (AmericanTypeCultureCollection).

Для встановлення здатності нанокмпозитного препарату впливати на продукцію фактору некрозу пухлин використовували перевивні лінії клітин

L929 (фібробласти зі сполучної тканини миші СЗН/An, сублінія “а”), отримані з Клітинного Банку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, а також PST (тестикули поросяти), отримані з колекції Інституту ветеринарної медицини УААН.

Визначення рівня індукованого ІФН у зразках середовища культивування проводили за допомогою методу мікротитрування на культурі клітин L929 проти тест-вірусу – вірусу везикулярного стоматиту (ВВС, штам Індіана, Депозитарій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України).

Вся робота з тваринами проведена згідно з правилами експертної комісії з біоетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

2.2. Бактеріальна експресія та очистка рекомбінантного білка ЕМАР II

2.2.1. Отримання компетентних клітин *Escherichia coli*. Для отримання високоефективних компетентних клітин використовували наступну методику [141]. Нічну культуру клітин *E. coli* BL21 (DE3)*pLysE* нарощували на середовищі LB. В 50 мл середовища LB, що містило 30 мкг/мл канаміцину, інокулювали 0,5 мл нічної культури і нарощували при 37°C і постійному перемішуванні на темостатованій качалці до досягнення оптичної густини $OD_{600} = 0,5$. Культуру охолоджували на льоду протягом 5 хв. Клітини осаджували центрифугуванням на центрифугі К-23 при 4000 об/хв, +4 °С протягом 10 хв. Надосадову рідину видаляли і всі подальші маніпуляції проводили на льодяній бані. Осад обережно ресуспендували в 15 мл охолодженого на льоду буферу TFB1 (10 мМ KCl, 50 мМ MnCl₂, 30 мМ KAc, 10 мМ CaCl₂, 15 % гліцерину) і інкубували на льоду 90 хв. Повторно осаджували клітини центрифугуванням на центрифугі К-23 при 4000 об/хв, +4 °С протягом 10 хв. Надосадову рідину видаляли і осад ресуспендували в 2 мл охолодженого на льоду буферу TFB2 (10 мМ MOPS, 10 мМ KCl, 75 мМ CaCl₂, 15 %

гліцерину). Отриману суспензію розділяли на аліквоти по 200 мкл і зберігали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в морозильній камері до використання.

2.2.2. Трансформація бактеріальних клітин плазмідною ДНК.

Трансформацію здійснювали за стандартною методикою [142]. Для цього аліквоту компетентних клітин (200 мкл) поміщали на льодяну баню до повного розморожування суспензії. Фрагмент ДНК, що кодує зрілу форму ЕМАР II людини (D146-K312), був клонований у плазміді рЕТ30a (Novagen), присутність відповідної вставки ДНК підтверджено секвенуванням нуклеотидної послідовності. Вносили в культуру 5-10 мкл ДНК рЕТ30a-ЕМАР II, яка кодує зрілу форму ЕМАР II людини та обережно перемішували. Зразок інкубували на льодяній бані протягом 30 хв, а потім поміщали на водяну баню ($+42\text{ }^{\circ}\text{C}$) на 90 сек для теплового шоку і швидко повертали на льодяну баню ще на 2 хв. Далі до зразка додавали попередньо нагріте до $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ середовище LB до кінцевого об'єму 1 мл і інкубували 1 год при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. 500 мкл клітинної суспензії висівали на чашку Петрі з агаризованим середовищем LB, що містило 30 мкг/мл канаміцину для селективного відбору позитивних клонів клітин. Бактерії вирощували в термостаті протягом ночі при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.3. Отримання гліцеринових стоків для бактеріальної експресії.

Проводили згідно наступної методики [142]: одиничну колонію культури *E. Coli BL21(DE3)* інокулювали в 2 мл середовища LB, яке містило 30 мкг/мл канаміцину, та культивували на термостатованій качалці при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 2-3 год. Культуру висівали на чашку Петрі з агаризованим середовищем з канаміцином методом штриха, що виснажується. Коли колонії ставали видимими, одиничну колонію інокулювали в 2 мл середовища LB з канаміцином і культивували до досягнення оптичної густини $\text{OD}_{600} = 0,5$. Далі до 1,8 мл бактеріальної суспензії додавали 0,2 мл 80 % гліцерину та перемішували. Отриману суспензію розділяли на аліквоти по 200 мкл і зберігали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в морозильній камері до використання.

2.2.4. Експресія бактеріальних культур для препаративного виділення рекомбінантних білків. З цією метою була використана стандартна схема експресії бактеріальних культур з деякими модифікаціями [143]. Рекомбінантний білок ЕМАР II експресовано в клітинах *E. coli BL21(DE3)*, що містили відповідну плазмідну ДНК - рЕТ30а-ЕМАР II. Одиничні колонії клітин *E. coli BL21(DE3)* інокулювали в 5 мл середовища LB, що містило антибіотик канаміцин, концентрацією 30 мкг/мл, і культивували при +37 °С, 120 об/хв впродовж ночі. У 500 мл свіжого середовища LB з канаміцином, інокулювали 5 мл нічної культури і інкубували за тих самих умов до моменту досягнення оптичної густини $A_{600} = 0,5-0,6$ в.о. Індукцію експресії білка проводили шляхом додавання до клітинної культури ізопропіл-тіо- β -галактопіранозиду, кінцева концентрація якого в клітинній культурі складала 1,25мМ. Культуру додатково інкубували протягом 4,5 годин при +37 °С, 120 об/хв. Після цього клітини осаджували шляхом центрифугування при 4000 об/хв, протягом 20 хв, супернатант видаляли, клітинний осад заморожували при -20°С.

Заморожений клітинний осад розморожували на льодяній бані, ресуспендували в 10 мл буферу для лізису (50 мМ NaPh, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол, 56 мкг/мл лізоцим) та проводили дезінтеграцію клітин шляхом ультразвукового озвучування (одинадцять розрядів по 10 с, 200-300 Вт). Лізат освітлювали шляхом центрифугування при 13000об/хв протягом 30 хв при +4°С.

2.2.5. Оптимізація процесу біосинтезу рекомбінантних білків. Оптимізацію бактеріальної експресії рекомбінантного білка ЕМАР II проводили аналогічно схемі експресії рекомбінантних білків, описаній вище, маніпулюючи такими параметрами, як час культивування бактеріальної культури до та після індукції синтезу цільових білків, кількість індуктора та склад поживного середовища.

Для індукції синтезу рекомбінантного білка в культуральне середовище додавали ізопропіл- β -тіогалактопіранозид (IPTG) до кінцевих концентрацій 0,5,

0,75, 1, 1,25, 1,5 мМ. Час культивування культур до індукції та після індукції експресії варіювали від 1 до 3 год та від 1 до 5 год відповідно.

Найбільш ефективної експресії білків досягали шляхом підбору оптимального середовище культивування бактеріальних культур. Для цього культури вирощували на середовищі LB, м'ясо-пептонному бульйоні та на мінімальному середовищі А.

2.2.6. Очистка рекомбінантних білків. Рекомбінантний білок очищували за допомогою афінної хроматографії на Ni-NTA агарозі. Супернатант наносили на Ni-NTA агарозну колонку, врівноважену буфером для лізису, та інкубували при помішуванні при +4°C протягом 60 хв. Після цього колонку промивали десятьма об'ємами буферу для промивки (50 мМ NaPh, рН 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазол, 5 мМ β-меркаптоетанол). Білки, зв'язані з колонкою, елюювали 5 об'ємами буферу для елюції (50 мМ NaPh, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазол, 5 мМ β-меркаптоетанол). Чистоту білків визначали за допомогою ПААГ в денатуруючих умовах, яка становила ~98%. Фракції, у яких було виявлено білок, об'єднали і поставили на діаліз (активний) проти 300 мл буферу для діалізу (50мМ натрій-фофатного буферу рН 8,0, 150мМ NaCl) впродовж 20 год. при +4°C.

2.2.7. Розщеплення рекомбінантного білка ентерокіназою. Вектор рЕТ30а містить 6His-tag та сайт розщеплення ентерокіназою DDDDK↓. Для відщеплення константної N-кінцевої амінокислотної послідовності, що кодується вектором рЕТ30а використовували ентерокіназу з використанням стандартної методики виробника (New England Biolabs) [144] та додатково очистили на колонці з Ni-NTA агарозою та діалізували описаними вище методами.

2.2.8. Визначення концентрації білка за методом Бредфорда. Визначення концентрації рекомбінантного білка ЕМАР II, а також нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 проводили за методом Bradford [145], з деякими модифікаціями. Реактив для визначення концентрації

готували таким чином: 100 мг барвника кумасі G-250 розчиняли в 50 мл 96 % етанолу, додавали 100 мл 85 % розчину фосфорної кислоти (вага/об'єм) та об'єм отриманого розчину доводили до 1 л (кінцева концентрація кумасі G-250 складала 0,01 %, етанолу – 4,7 %, фосфорної кислоти – 8,5 %). Калібрувальну криву будували, використовуючи як стандарт розчин БСА. Брали 0,1 мл розчину білка, додавали 1 мл реактиву та ретельно перемішували. Через 2 хв. визначали поглинання суміші при довжині хвилі 595 нм проти 1 мл розчину Бредфорда і 0,1 мл буфера, у якому був розчинений білок. Будували графік залежності поглинання A_{595} від концентрації стандарту. Концентрацію білка визначали по калібрувальній кривій. Спектрофотометричні вимірювання при визначенні концентрацій проводили на спектрофотометрі BioMate 5 (Велика Британія).

2.2.9. Спектрофотометричне визначення концентрації білка. Спектри УФ-поглинання рекомбінантного білка ЕМАР II та нанокмпозитного препарату ЕМАР II вимірювали за допомогою спектрофотометра BioMate 5 (Велика Британія) у кварцевих прямокутних кюветах з довжиною оптичного шляху 0,2 – 1 см. Концентрацію білків визначали спектрофотометричним способом по поглинанню світла на довжині хвилі 280 нм (A_{280}) з урахуванням довжини оптичного шляху (L) і коефіцієнта екстинкції білка (ϵ_{280}) за законом Ламберта-Бугера-Бера. Молярний коефіцієнт екстинкції при 280 нм ($\epsilon_{280} = 8730\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) та масовий коефіцієнт (A_{280} (1 мг/мл) = 0.375) розраховували з амінокислотної послідовності ЕМАР II (інструмент ProtParam, ExPASy, Swiss Port) і використовували для визначення концентрації рекомбінантного білка.

2.2.10. Електрофоретичне розділення білків в ПААГ. Електрофорез отриманих білкових препаратів (рекомбінантного ЕМАР II та нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70) та клітинних і субклітинних лізатів проводили у 15 % ПААГ в денатуруючих умовах за Леммлі [150]. До досліджуваних зразків додавали 1/4 об'єму буфера для зразків (500 мМ трис-НС1, рН 6,8; 2 % додецилсульфату натрію; 5 % 2-

меркаптоетанолу; 0,1 % бромфенолового синього). Зразки прогрівали (5 хв, 95 °С) і наносили на гель. Після електрофорезу гелі фарбували 0,2 % Coomassie brilliant R-250 в суміші 45 % етанол та 10 % оцтова кислота упродовж ночі при кімнатній температурі, або 30–60 хв при температурі 90 °С. Надлишок фарби відмивали буфером, що містив 10 % оцтової кислоти та 5 % етанолу при перемішуванні до появи чітких білкових зон.

2.3. Дослідження взаємодії білка ЕМАР II з декстраном 70 методом флуоресцентної спектроскопії

Для дослідження взаємодії рекомбінантного білка ЕМАР II з декстраном 70 проводили титрування білка у буфері, який містив 50 мМ Na-фосфат, рН 7.5, 150 мМ NaCl. Декстран 70 (Біотика АТ, Республіка Словаччина) розчиняли у аліквоті білка (буфер: 50 мМ Na-фосфат, рН=7,5, 150 мМ NaCl,) та протягом 2 год перемішували при кімнатній температурі. Спектри флуоресценції реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), який обладнаний термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварцевій кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Спектральна ширина щілин монохроматора при збудженні флуоресценції та її реєстрації становила 5–10 нм. Збудження флуоресценції проводили при 280 нм, реєстрацію флуоресценції - в діапазоні 300–400 нм під кутом 90° до напрямку пучка збуджуючого світла при температурах від 23 до $54^{\circ}\text{C} \pm 0,01^{\circ}$. Реєстрацію впливу температури на стабільність комплексів вказаних рекомбінантних білків проводили за допомогою спектрофлуориметра JASCO (Японія), обладнаним термостатованим кюветотримачем. Аналогічні досліди проводили і для β -циклодекстрину. Для зниження впливу випадкових факторів спектри флуоресценції білків визначали не менше трьох разів.

2.4. Біотехнологічна розробка нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70

Попередньо методами спектрофотометричного, флуориметричного та біоінформатичного аналізу нами було встановлено, що комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70 утворюється при додаванні їх в співвідношенні концентрацій 1:1. Очищений препарат ЕМАР ІІ стерилізували методом холодної фільтрації через мембрани «Roth» з розміром пор 0,22 мкм., які мають мінімальне зв'язування білків і використовували для приготування сухого стабільного препарату.

Для створення нанокмпозитного комплексу до розчину рекомбінантного білка ЕМАР ІІ в 50 мМ Na-фосфатному буфері, рН 7,5 з 150 мМ NaCl з концентрацією 100 мкг/мл додали 1,5% декстрану 70, порошок (субстанція) у подвійних поліетиленових мішках для виробництва стерильних лікарських форм («Biotika», Словаччина) та перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год. По 1 мл. розчину комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 стерильно розливали в ампули. Ампули з комплексом ЕМАР ІІ заморозили в декілька циклів при -80°C протягом 96 год. та ліофілізували.

Режим ліофільного висушування нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ:

1. Заморожування препарату до температури -20°C .
2. Встановлення на плиту (попередньо охолоджена) в приладі для ліофільної сушки.
3. Охолодження до -30°C у вакуумі.
4. Охолодження до -70°C . Швидкість охолодження $10^{\circ}\text{C}/\text{год}$. Вакуум 100 mTorr.
5. Інкубація в зазначених умовах 1 год.
6. Зниження температури до -20°C , а потім до -10°C . Кожна стадія по 10 годин.
7. Нагрівання до температури $+5^{\circ}\text{C}$. Тривалість - 10 годин.
8. Запаювання ампул в атмосфері азоту. Тиск $760 \pm 50\text{mbar}$.

2.5. Дослідження агрегаційних властивостей цитокіна ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70

З метою вивчення розмірів білка ЕМАР II та його наноконкомпозитного комплексу з полісахаридом декстраном 70 у розчині, проводили дослідження методом фотонної кореляційної спектроскопії на лазерному кореляційному спектрометрі “ZetaSizer-3” (Malvern Instrument, Великобританія). Лазерний кореляційний спектрометр “ZetaSizer-3” обладнаний He-Ne лазером ЛГН-111 (P = 25 мВт, $\lambda = 633$ нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм.

Реєстрацію та статистичну обробку лазерного випромінювання, розсіяного від розчину ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70, проводили 5-разово протягом 60 с в діапазоні температур від +20°C до +55°C під кутом розсіювання 90°.

Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Для дослідження наноконкомпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 методом фотонної кореляційної спектроскопії на лазерному кореляційному спектрометрі використовували наступні концентрації складових: ЕМАР II з концентрацією 0,6 мг/мл (6,87 мкМ) та декстран 70 з концентрацією 50 мг/мл (7,1 мМ). Стехіометрія зв'язування декстрана 70 з білком становить близько 1:1. Стехіометрія зв'язування (n) та константа зв'язування (Kd) були обчислені програмою OriginPro 8.0 згідно наведеного нижче рівняння:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log(K_a) + n \log([\beta - L])$$

де F₀ та F – інтенсивність флуоресценції білка при максимальній довжині хвилі в присутності ліганду та без нього відповідно, K_a – константа асоціації, а n – стехіометрія комплексу. Числові значення досліджуваних величин були

отримані за допомогою функції Analysis \rightarrow Fitting \rightarrow Fit Linear. Рівняння отримано в результаті обчислень

$y = a + bx$, де y та x відповідають виразам $\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right)$ та $\log(L\beta - L)$, в той час як a та $b = \log(K_a)$ та n відповідно.

Лазерний кореляційний спектрометр “ZetaSizer-3” обладнаний He-Ne лазером ЛГН-111 ($P = 25$ мВт, $\lambda = 633$ нм). Діапазон вимірювання приладу становить від 1 нм до 20 мкм. Робота даного спектрометру основана на аналізі кореляційних характеристик флуктуації інтенсивності динамічно розсіяного світла при проходженні лазерного променя через середовище.

2.6. Біоінформатичний аналіз

Моделювання комплексу ЕМАР II з декстраном 70 здійснювали за допомогою програми Auto Dock Vina [146]. Для проведення докінгу використано просторову структуру ЕМАР II, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (PDBID: 1EUJ) [32]. Візуалізацію та аналіз отриманих комплексів проводили з використанням програмного забезпечення UCSF Chimera [147] та MGLTools [146]. Молекулярну структуру декстрану представлено у вигляді невеликого фрагменту полісахариду, побудованого із залишків α -D-глюкопіранози. Моделювання взаємодії між просторовими структурами ЕМАР II проводили за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 [148] та SymmDock [149]. Візуалізацію, аналіз просторової структури а розрахунок радіусу гірації здійснювали у програмному забезпеченні UCSF Chimera [147].

2.7. Дослідження вмісту ендотоксинів у нанокмпозитному комплексі ЕМАР II з декстраном 70

Для проведення ЛАЛ-тесту [150] змішували рівні кількості ЛАЛ-реактиву (Endosafe®, США) та досліджуваного зразка. Ці реакційні суміші інкубували протягом 1 години при 37°C. Якщо утворюється гель результат вважають позитивним. Це означає, що концентрація ендотоксину дорівнює або є вищою, ніж чутливість ЛАЛ-реактиву. Якщо гель не утворюється результат негативний. Це означає, що концентрація ендотоксину нижча, ніж чутливість ЛАЛ-реактиву.

Перед початком аналізу слід провести розрахунок максимально допустимого розведення. Гранично допустима доза ендотоксина була початково встановлена тестом на кролях. Встановлена границя ендотоксина, згідно Державної фармакопеї України [151], яка викликає пірогенну реакцію в тілі людини становить 5 МОЕ/кг.

Розрахунок гранично допустимої дози ендотоксину для фармацевтичних препаратів:

(К/М)*активність препарату.

Для розрахунку максимально допустимого розведення (МДР) застосовується термін λ – заявлена чутливість лізату для гель-тромб тесту (в нашому випадку 0,03 МОЕ).

МДР = $K(\text{максимально допустима доза ендотоксину}) * \text{активність препарату} / \text{чутливість лізату} = 5 * 10 / 0,03 = 160$

МДР = 1:160

При проведенні нами визначення кількості ендотоксинів в нанокмпозитному перапараті ЕМАР II було вирішено зробити такі розведення:

1. без розведення (чутливість лізату 0,03МОЕ)
2. розведення 1:160 (відповідає 5 МОЕ/кг)
3. розведення 1:1600 (відповідає 0,5 МОЕ/кг)

2.8. Вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на продукцію TNF α та інтерферону

В експериментах використовували перевивні лінії клітин L929 (фібробласти зі сполучної тканини миші С3Н/Ап, сублінія “а”), отримані з Клітинного Банку Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, а також PST (тестикули поросяти), отримані з колекції Інституту ветеринарної медицини УААН.

Клітини вирощували у моношаровій культурі у скляних флаконах у поживному середовищі 199 з 0,68 мМ L-глютаміну, з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, 25 мМ HEPES та 1 мкг/мл канаміцину при 37°C в умовах постійного рівня CO₂ (5%). Клітини пересівали у розведеннях 1:3 – 1:10 використовуючи 0,02% версен кожні 2 – 3 доби. Оптимальна щільність клітин при пересіванні складала $1 - 3 \times 10^4$ клітин/см².

До моношару клітин вносили ЕМАР II у концентрації 100 мкг/мл та декстран 70 у концентрації 354 мкг/мл з послідовним дворазовим розведенням та вирощували клітини впродовж 24 годин при 37°C. Для визначення кількості клітин з ушкодженою мембраною у контролі та після інкубації з дослідними сполуками, до моношару клітин додавали 0,5% розчин трипанового синього. Токсичність речовини визначали за величиною її максимально витримуваної концентрації (МВК). За величину МВК приймали таку концентрацію сполуки, що призводила до загибелі не більше 10% клітин порівняно з контролем. У якості контролю використовували клітини, не оброблені дослідними сполуками.

Для вивчення здатності нанокмпозитного препарату впливати на продукцію культурами клітин інтерферону (ІФН) та TNF α використовували культури клітин L929 та культуру клітин PST, що знаходяться у логарифмічній фазі росту з часом генерації 24 години. Клітини знімали з поверхні флаконів за допомогою 0,02% версену, ресуспендували у поживному середовищі та

доводили їх концентрацію у суспензії до 5×10^4 клітин/мл. У 96-лункові плоскодонні планшети (Sarstedt, Німеччина) вносили по 100 мкл вказаної суспензії та інкубували впродовж 24 годин в термостаті з постійним рівнем CO_2 (5%) при 37°C до утворення повного моношару клітин.

Для індукції інтерферону (ІФН) клітини L929 та PST культивували у присутності 0,188, 0,375, 0,75, 1,5, 3, 6, 12,5 та 25 мкг/мл препарату ЕМАР II та відповідних концентрацій декстрану-70 (від 354 до 2,77 мкг/мл з послідовним дворазовим розведенням) впродовж 24 годин. Для індукції $\text{TNF}\alpha$ використовували клітини PST.

Визначення рівня індукovanого ІФН у зразках середовища культивування проводили за допомогою методу мікротитрування на культурі клітин L929 проти тест-вірусу – вірусу везикулярного стоматиту (ВВС, штам Індіана, Депозитарій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України) [152].

У 96-лункові планшети зі сформованим одноденним моношаром клітин L929 вносили зразки середовища культивування у співвідношенні 1:8 з послідовним дворазовим розведенням (кінцеве розведення 1:64). Через 24 години клітини обробляли ВВС у дозі 100 TCID_{50} (цитопатичної дії). За титр ІФН приймали величину, обернену максимальному розведенню препарату, що викликала захист 50% клітин у моношарі від цитопатичної дії (ЦПД) вірусу та виражали в \log_2 (розведення)⁻¹.

Біологічну активність $\text{TNF}\alpha$ у середовищі культивування клітин визначали за цитотоксичною дією на культуру первинних мишачих фібробластів L929. Для вивчення продукції $\text{TNF}\alpha$ на сформований одноденний моношар клітин L929 вносили зразки середовища культивування клітин PST з нанокмпозитним препаратом ЕМАР II у співвідношеннях від 1:8 до 1:64. Далі у всі лунки вносили актиноміцин D з кінцевою концентрацією 1 мкг/мл, залишаючи контрольні лунки. Лунки з поживним середовищем використовували у якості контролю клітин, а лунки з актиноміцином D, але без

додавання зразків середовища культивування, – у якості контрольних за актиноміцином D. Планшети інкубували при 37 °С у вологій атмосфері, що містить 5% CO₂, впродовж 24 годин. Поживне середовище видаляли. Для встановлення цитотоксичної дії на клітини L929 до лунок додавали 0,2% розчин кристалічного фіолетового. Результат враховували за допомогою вертикального планшетного спектрофотометру Multiscan Ascent ("Thermo Labsystems", Фінляндія) при довжині хвилі 540 нм. Індекс цитотоксичності вираховували як ЦІ = (a-b)/a * 100%, де a та b – показники оптичної густини контрольних клітин та клітин, оброблених зразками середовища культивування, відповідно. Досліди проводили у 3 повторах.

2.9. Визначення токсичності нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70

2.9.1. Визначення гострої токсичності створеного біотехнологічного продукту. Вся робота з тваринами проведена згідно з правилами Етичного комітету Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Для встановлення гострої токсичності - ЛД 50 нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 використовували 30 самців-мишей лінії BALB/c, віком 2-3 місяці. Нанокмпозитний комплекс ЕМАР II одноразово підшкірно вводили мишам в дозах 300, 1000 та 10 000 мкг/кг маси тіла, що перевищує терапевтичну дозу в 30, 100 та 1000 разів відповідно. Оцінювались наступні показники загальної дії та токсичності: 14-добова летальність (реєструвалась щоденно); клінічна картина: загальний стан тварин, поведінка, збудливість та спонтанна рухова активність тварин; динаміка маси тіла (реєструвалась щоденно); загальний неврологічний статус: стан м'язевої сили (хвотальний рефлекс), м'язевий тонус, порушення пози тіла та координації рухів, стан дихання; стан вегетативних функцій: екзофтальмії, порушень

дефекації та діуреза; макроскопічне дослідження внутрішніх органів при розтині етаназованих тварин.

Неперервне спостереження за тваринами проводили протягом перших 8 годин після введення комплексу. В подальший період їх стан відмічали двічі на день протягом 14 днів.

Патоморфологічні прояви токсичності визначали при аутопсії в кінці експерименту при макроскопічному дослідженні внутрішніх органів тварин. План експерименту передбачав розрахунок ЛД₅₀ методом пробіт-аналіза по Літчфільду-Уілксона при наявності летальності тварин після введення нанокompозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70.

2.9.2. Визначення хронічної токсичності нанокompозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70. Для оцінки ступеня функціонального типу кумуляції використовували самців-мишей лінії BALB, віком 2-3 місяці. Дослід передбачає щоденне введення в організм тварин однакових доз препарату, взятих в певних частинах від середньосмертельної дози.

Нанокompозитний комплекс ЕМАР II з декстраном 70 підшкірно вводили мишам в дозах 300, 1000 мкг/кг маси тіла, що перевищує терапевтичну дозу в 30 та 100 разів відповідно. Загальну дію комплексу ЕМАР II з декстраном 70 оцінювали по динаміці маси тіла тварин при зважуванні 2 рази на тиждень.

Вегетативний статус оцінювали по стану слизових, шерстяного покриву, наявності саливації, діареї, охайності тварин.

В кінці експерименту проводили патоморфологічне дослідження внутрішніх органів після аутопсії. Внутрішні органи (серце, печінка, легені, нирки, наднирники, селезінку) виділяли, зважували.

2.10. Протипухлинні властивості цитокіна ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 на моделі трансплантованих фрагментів аденокарциноми простати людини

Тестування протипухлинної активності цитокіна ЕМАР II проводили на 27 мишах лінії СВА (маса тіла 18-22 г) розведених у віварії інституту ендокринології та обміну речовин при дотриманні біоетичних вимог гуманного ставлення до тварин нефро-субкапсулярним методом (підкапсулярний тест Богдена), що полягає у гетеротрансплантації ксенографтів злоякісної пухлини, в даному випадку аденокарциноми людини, під капсулу нирки мишей лінії СВА. Миші утримувались у стандартних умовах віварію на стандартному харчовому раціоні.

Видалену під час простатектомії пухлинну тканину доставляли в лабораторію в охолоджену середовищі MEM (Serva), що містить сольову суміш Хенкса і буфер HEPES. Пухлину нарізали на шматочки масою $1 \text{ мг} \pm 0,02$ і трансплантували під капсулу однієї з нирок мишей (по 2 ксенографти). Мишей внутрішньочеревинно наркотизували хлоралгідратом у розрахунку 400 мг/кг та вводили під капсулу нирки шматочки пухлини.

Після триденного періоду вільного росту пухлини мишам вводили підшкірно в об'ємі близько 0,2 мл розчин рекомбінантного білка ЕМАР II в дозах 5, 10, 100 мкг/кг маси тіла, в ізотонічному розчині натрію хлориду, а контрольним тваринам - розчинник впродовж подальших трьох днів. Через 24 години після останньої ін'єкції мишей знеживлювали диетиловим ефіром. Далі проводили розтин та вилучали ксенографти з-під капсули нирки. Вилучені трансплантати зважували та вираховували середній приріст маси ксенографтів. Після цього трансплантати фіксували в 4 % параформальдегіді для гістологічного або в розчині Буена для гістохімічного дослідження, заливали в парафінові блоки та готували серійні зрізи, які фарбували гематоксиліном та еозином або гематоксиліном та реактивом Шиффа. Протипухлинний ефект

оцінювали за ступенем гальмування росту ксенографтів порівняно з контрольною групою. Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики. Істотним вважали зменшення приросту маси ксенографта в групі мінімум на 25 %. Достовірність різниці ($P < 0,05$) оцінювали за критерієм *t* Стьюдента.

Для проведення досліджень протипухлинних властивостей нанокмпозитного комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70 на моделі трансплантованих фрагментів аденокарциноми простати людини мишам лінії СВА проводили всі описані вище етапи роботи. Дослідні групи тварин отримували нанокмпозитний препарат ЕМАР ІІ, розчинений в стерильній дистильованій воді в мікродозах 1-10 мкг/кг.

2.11. Вплив цитокіна ЕМАР ІІ та його комплексу з декстраном 70 на проліферацію та апоптоз культур клітин

Для вивчення здатності цитокіна ЕМАР ІІ та його комплексу з декстраном 70 впливати на проліферацію та виживаність клітин використовували культури клітин Нер-2 –лінії раку гортані та 4ВL6 – іморталізованої клітинної лінії з периферичних клітин крові людини. Клітини культивували в стандартному ростовому середовищі DMEM з додаванням 10% ембріональної сировотки великої рогатої худоби та антибіотиків (пеніциліна та стрептоміцина) в термостаті з постійним рівнем CO₂ (5%) при 37°C до утворення повного моношару клітин.

В дослідному варіанті клітини інкубували протягом 24 годин в середовищі DMEM без сировотки з додаванням комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70. Середовище DMEM після обробки видаляли та заміняли ростовим середовищем. До та після обробки культур клітин комплексом ЕМАР ІІ з декстраном 70 моношар клітин відмивали розчином PBS або середовищем DMEM.

В контрольному варіанті клітини знаходились в середовищі без сыворотки. Комплекс цитокіну ЕМАР II використовували в діапазоні концентрацій 0,2-20 мкг/мл.

Візуалізацію рівня виживаності культури проводили з використанням реакції трансформації живими клітинами (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолою броміда (МТТ) у формазаан [153] за допомогою вертикального планшетного спектрофотометру Titertek“Multiscan” при довжині хвилі 540 нм.

2.12. Статистичний аналіз

Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою пакета статистичних програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Для порівняння показників досліджуваних груп використовували U-критерій Мана-Вітні (Mann-WhitneyU-test) або t-критерій Стьюдента. Значення $p < 0,05$ розглядали як критерій значущості різниці.

Результати представлено у вигляді Me [25; 75] (Me – медіана; 25 і 75 – 1-й та 3-й квартилі) або у вигляді середніх значень з вказівкою на середні квадратичні відхилення відповідно.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Оптимізація бактеріальної експресії, отримання, очищення та розщеплення ентерокиназою рекомбінантного цитокіна ЕМАР II

Вивчення процесу біосинтезу еукаріотичних та рекомбінантних білків в прокаріотичних клітинах приваблює значний інтерес дослідників [154], що значною мірою обумовлено виявленням механізмів залучення цих білків до виникнення та розвитку різних захворювань, розробкою та створенням медичних препаратів нового покоління на основі цих білків та ін. Сучасні генноінженерні біотехнології широко використовуються для отримання рекомбінантних білків в препаративних кількостях як нових терапевтичних препаратів для медицини.

Для досягнення ефективної експресії рекомбінантних білків в прокаріотичних системах необхідна розробка оптимальної системи експресії для кожного білка, оскільки універсальної стратегії оптимізації експресії клонуваних генів не існує. Тому підбір оптимальних умов культивування штамів-продуцентів та параметрів виділення і очистки даних білків є необхідною умовою для досягнення високих рівнів виходу цільових продуктів [160, 111, 95].

Відомо, що ЕМАР II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II) – мультифункціональний цитокін, який утворюється в злоякісних пухлинах ссавців завдяки посттрансляційному процесингу білка р43.

Виявлена здатність ЕМАР II пригнічувати міграцію ендотеліальних клітин, стимулювати їх апоптоз, впливати на активність моноцитів, нейтрофілів і макрофагів, сприяючи запальним процесам в пухлинах [4, 61].

Ці факти доводять множинність функцій одного білка та показують наявність зв'язку між білковим синтезом та іншими фізіологічними процесами, що протікають в клітині. Але на даний момент достеменно невідомо за допомогою яких механізмів різні білки залучаються до процесів, участь в яких не є їх прямою функцією.

Першим етапом дослідження було встановлення умов високого рівня експресії рекомбінантного білка ЕМАР II людини в бактеріальній системі *Escherichia coli* шляхом здійснення підбору оптимальних умов культивування бактеріальної культури *E. coli* BL21(DE3)pLysE та експресії цільового білка. Бактеріальні системи експресії найбільш широко використовуються серед інших систем білкової експресії завдяки їх простоті та дешевизні. Серед переваг бактеріальних систем зазначаються проста фізіологія, швидкий ріст та розмноження, високий вихід цільового продукту [156]. Експресія білків в *E. coli* часто залишається кращим вибором серед бактеріальних систем експресії, оскільки генетика *E. coli* та система експресії на її основі найкраще вивчені серед інших систем і, крім того, кишкова паличка легко піддається маніпуляції різноманітними генетичними методами [157].

Оптимізація умов культивування штамів-продуцентів рекомбінантних білків є важливою проблемою сучасної молекулярної біотехнології. Одночасне використання традиційних методів оптимізації зі специфічними підходами, які застосовуються для рекомбінантних штамів, може суттєво підвищити вихід цільового продукту. Система бактеріальної експресії в експресуючих плазмідах серії рЕТ на основі РНК-полімерази фага Т7 є однією з найбільш ефективних прокариотичних систем експресії [156]. На відміну від більшості бактеріальних та еукаріотичних РНК-полімераз, Т7 РНК полімераза складається з однієї субодиниці, і в той же час здатна здійснювати повний цикл транскрипції при відсутності додаткових білкових факторів. Найчастіше в ролі продуцента в таких системах виступає штам *E. coli* BL21(DE3)pLysE [133]. Ген РНК-полімерази фага Т7 під контролем lacUV5 промотора локалізується в

бактеріальній хромосомі, куди він інтегрований в складі фага λ . Індукція синтезу фагового фрагмента та наступна високоефективна транскрипція цільового гену в складі рекомбінантної плазміди спостерігаються після додавання в середовище культивування індуктора експресії ШПГ [158].

При проведенні оптимізації умов культивування штаму-продуценту цитокіна ЕМАР II ми враховували такі фактори, як концентрація індуктора (ШПГ), фаза росту клітин штаму-продуцента, час додавання індуктора, склад культурального середовища, час культивування штаму-продуцента після додавання індуктора ШПГ. Однією з проблем при експресії білків є підбір оптимального часу індукції, оскільки рання індукція призводить до більш низького виходу біомаси та цільового продукту. При пізній індукції спостерігається високий вихід біомаси та низький рівень накопичення рекомбінантного білка. Не менш важливу роль відіграє і концентрація індуктора, що додається. Для експресії цитокіна ЕМАР II максимальна кількість білка спостерігалась за умови додавання в середовище культивування індуктора на другу годину росту культури ($ОГ_{600}=0,7-0,9$), що пояснюється ймовірним досягненням культурою найбільш сприятливої фази росту – логарифмічної фази росту (рис. 3.1).

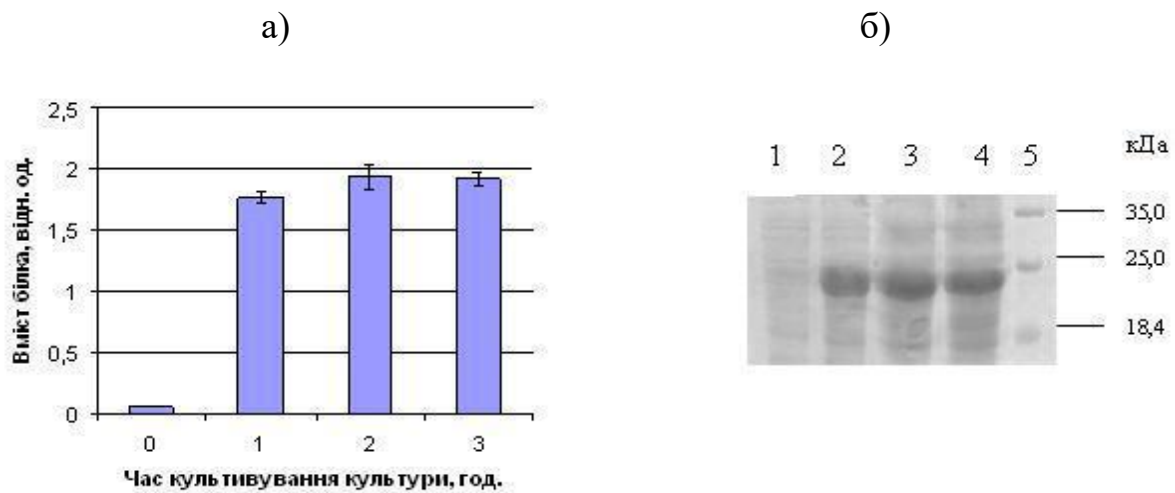


Рис. 3.1. Рівень експресії білка EMAP II залежно від часу культивування бактеріальної культури до індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих при різному часі культивування. 1– 4 – лізати до індукції (0, 1, 2, 3 год. культивування до індукції відповідно); 5 – білковий маркер молекулярної маси ("Fermentas", Литва).

Нами проведено дослідження рівня бактеріальної експресії білка EMAP II в залежності від концентрації індуктора IPTG та часу культивування культури *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE після індукції. При підвищенні концентрації індуктора до 1,25мМ спостерігалось зростання рівня експресії цільового білка, проте при подальшому збільшенні кількості IPTG ця тенденція втрачалась і спостерігався спад рівня експресії (рис.3.2).

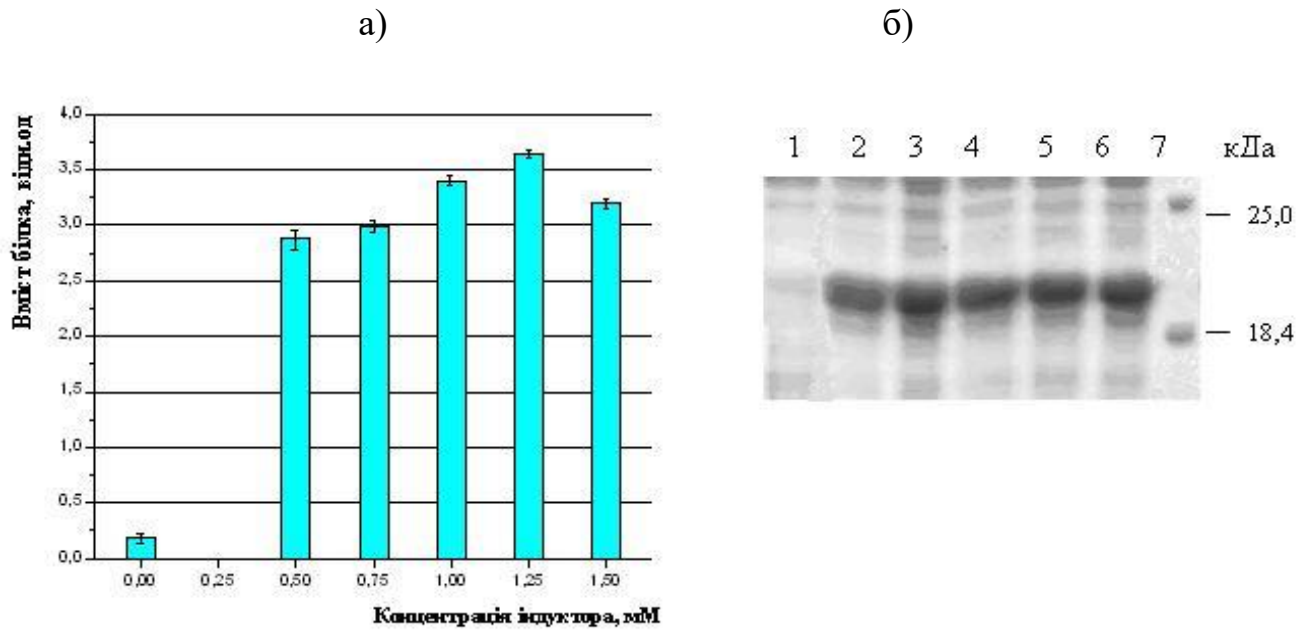


Рис. 3.2. Рівень експресії білка EMAP II залежно від кількості IPTG: а) залежність виходу білка від кількості індуктора; б) електрофореграма білків, отриманих при додаванні різної кількості IPTG. 1 – лізат до індукції; 2 – 6 – лізати після індукції (0,5 мМ, 0,75 мМ, 1 мМ, 1,25 мМ, 1,5 мМ IPTG відповідно, 7 - білковий маркер молекулярної маси ("Fermentas", Литва);

При дослідженні рівня експресії EMAP II в залежності від часу культивування культури після індукції нами встановлено, що найбільший приріст експресії цільового білка спостерігався при культивуванні культури 4,5 год. Подальше культивування бактеріальної культури приводило до незначного зниження біосинтезу цільового білка та суттєвого збільшення синтезу бактеріальних білків (рис. 3.3).

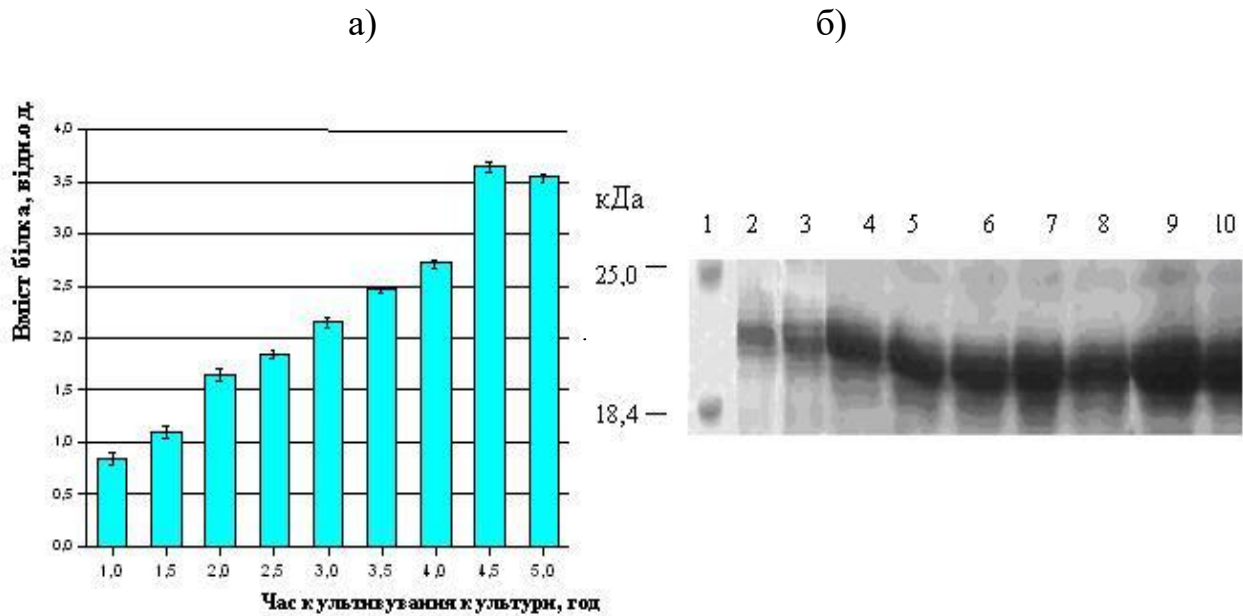


Рис. 3.3. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від часу культивування культури після індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих при різному часі культивування. 1 – білковий маркер молекулярної маси ("Fermentas", Литва); 2 – 10 – лізати після індукції (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5 год. культивування після індукції відповідно).

Слід зазначити, що накопичення в біомасі клітин цільового продукту при культивуванні рекомбінантних штамів-продуцентів залежить великою мірою від якості та складу субстратів. Якщо ростове середовище для бактеріальної культури підбрано оптимально, це дозволяє отримати найбільш високий рівень виходу цільового білка. Нами проведено культивування бактеріальної культури на різних поживних середовищах. В результаті проведеного дослідження встановлено, що найвищий рівень експресії рекомбінантного білка ЕМАР II спостерігався при вирощуванні на мінімальному середовищі А (рис.3.4). Це дуже вигідно при культивуванні штаму-продуценту у великих кількостях та промисловому культивуванні. Найнижчий рівень експресії цільового продукту спостерігався при культивуванні штаму-продуценту на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) (рис. 3.4).

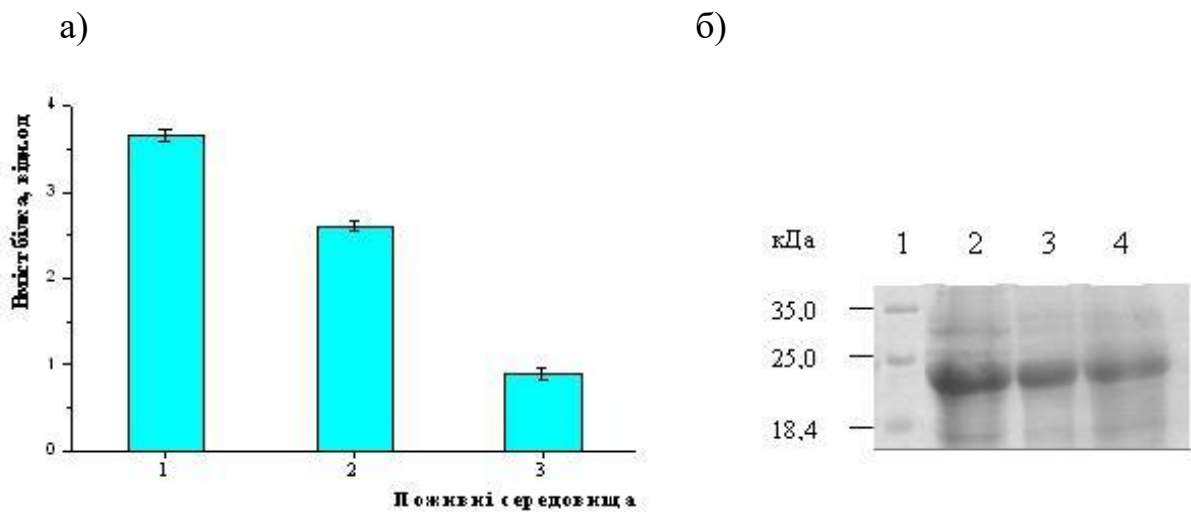


Рис. 3.4. Рівень експресії білка EMAP II залежно від середовища культивування бактеріальної культури: а) залежність виходу білка від середовища культивування: 1 - мінімальне середовище А; 2 - середовище LB; 3 – МПБ; б) електрофореграма білків, отриманих з різних середовищ: 1 – білковий маркер молекулярної маси ("Fermentas", Литва); 2 – мінімальне середовище А; 3 -середовище LB; 4 – МПБ.

Після проведення бактеріальної експресії здійснювали афінну очистку рекомбінантного білка EMAP II за допомогою металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA агарозі. Концентрація білка після хроматографічного очищення складала 1,112 мг/мл для білка EMAP II із чистотою близько 95%.

В результаті проведеної роботи по підвищенню рівня експресії рекомбінантного цитокіна EMAP II шляхом здійснення підбору оптимальних умов культивування бактеріальної культури було отримано згідно електрофоретичних даних рекомбінантний цитокін EMAP II із чистотою високого рівня. (рис. 3.5).

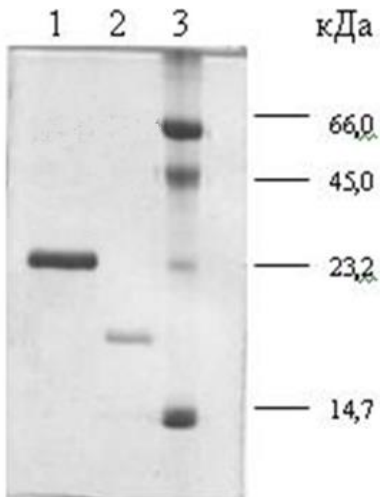


Рис. 3.5. Електрофоретичний контроль чистоти білка ЕМАР ІІ (15%-ий розділюючий гель). 1 - рекомбінантний білок ЕМАР ІІ; 2 - ЕМАР ІІ після розщеплення ентерокіназою; 3 - білковий маркер (лізоцим, ЕМАР ІІ, овальбумін, бичачий сивороточний альбумін).

Отриманий рекомбінантний білок ЕМАР ІІ специфічно розщеплювали ентерокіназою та додатково очищали ЕМАР ІІ від відщепленого фрагмента повторною металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA-агарозі. В результаті отримували високочищений білок ЕМАР ІІ, який використовували в біомедичних дослідженнях, в тому числі для інгібування росту ксенографтів раку простати людини, імплантованих під капсулу нирки мишей та створення нового нанокомпозитного препарату ЕМАР ІІ. На рис. 3.6 представлено спектр поглинання світла рекомбінантним цитокином ЕМАР ІІ, який додатково підтверджує високу ступінь чистоти отриманого білка та відсутність в препараті домішок нуклеїнових кислот. Також представлено спектр інтенсивності флуоресценції ЕМАР ІІ при довжині хвилі 280 нм, при якій поглинають світло Туг та Trp, та спектр при довжині хвилі 296 нм, при якій поглинає лише триптофан. Максимум емісії флуоресценції даних спектрів вказують на нативність структури рекомбінантного білка.

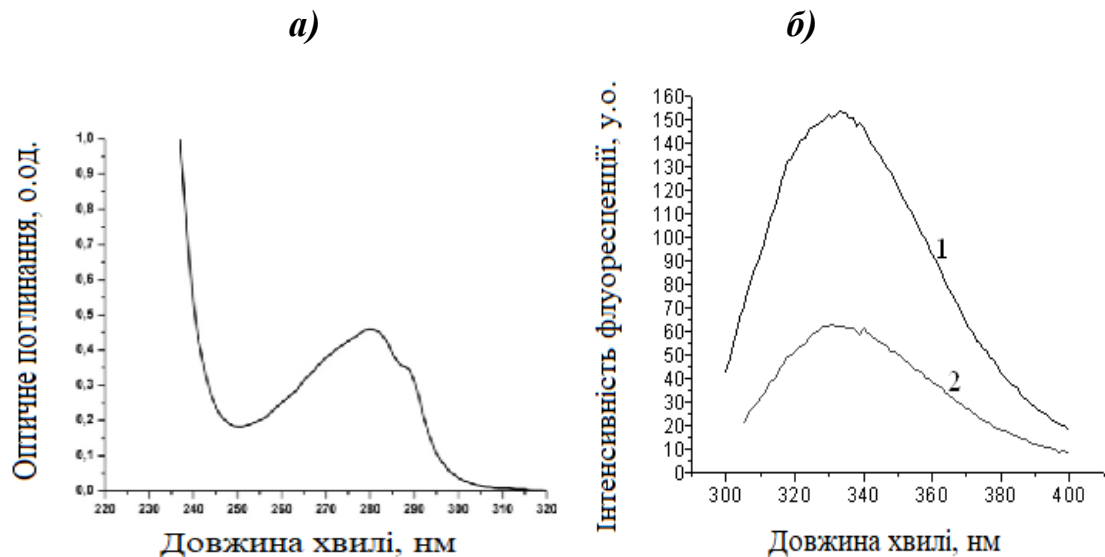


Рис. 3.6. Спектр поглинання світла білком ЕМАР II (а) та характеристика триптофанової флуоресценції білка ЕМАР II (б. 1. емісія флуоресценції білка ЕМАР II при $\lambda_{\text{Ex}}=280$ нм, 2. емісія флуоресценції білка ЕМАР II при $\lambda_{\text{Ex}}=296$ нм).

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Бабенко Л.А.,** Скоробогатов О.Ю., Дубровський О.Л., Корнелюк О.І. (2010) Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *E.coliBL21(DE3)pLysE*. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3 (11), 21-31. DOI: 10.18524/2307-4663.2010.3(11).98933.

2. **Бабенко Л.А.,** Скоробогатов О.Ю. (2010 вересень) Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *E.coliBL21(DE3)pLysE*. - VI Міжнародна наукова конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, Україна. - *Збірник тез*, 2010, С.143-144.

3.2. Дослідження взаємодії білка ЕМАР II з декстраном 70 методом флуоресцентної спектроскопії

При титруванні білка ЕМАР II розчином декстрану 70 спостерігається падіння інтенсивності флуоресценції білка з підвищенням концентрації ліганда, що може свідчити про міцне зв'язування ліганда з рекомбінантним білком і утворення специфічного комплексу (рис. 3.7).

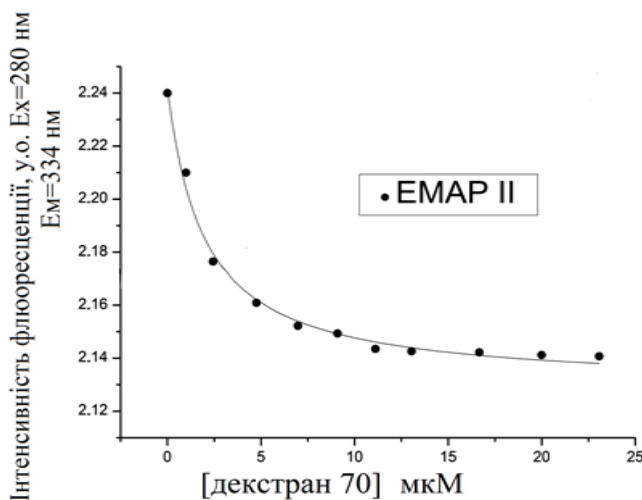


Рис. 3.7. Залежність інтенсивності флуоресценції білка ЕМАР II від концентрації декстрану 70 у розчині, λ_{EX} 280 нм, λ_{EM} 334 нм. Буфер 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, рН 7,5, температура 25 °С. Початкова концентрація ЕМАР II 10 μ М, декстрана 70 – 100 μ М.

За отриманими залежностями розрахована константа дисоціації (K_d) для ЕМАР II із декстраном 70, яка складає $1,97 \pm 0,17 \mu$ М. Стехіометрія зв'язування декстрана 70 з білком становить згідно даних на рис 3.7 близько 1:1, що підтверджує формування специфічного комплексу.

При реєстрації спектру флуоресценції ЕМАР II в залежності від температури в діапазоні 22 - 65 °С виявлено зсув максимуму флуоресценції від 334 до 345 нм (рис. 3.8), що відповідає максимуму флуоресценції триптофану в

частково розгорнутих білках. Це обумовлено тим, що при підвищенні температури в молекулі ЕМАР II спостерігаються локальні конформаційні переходи, пов'язані з експонуванням залишку Trp на поверхні білка. Температура локального конформаційного переходу в ЕМАР II становить $43 \pm 1^\circ\text{C}$ (визначена як температура в точці напівпереходу між двома станами).

При дослідженні впливу декстрана 70 на стабільність білкової глобули ЕМАР II встановлено, що при підвищенні температури максимум емісії флуоресценції ЕМАР II зсувається до 345 нм, тоді як локальний конформаційний перехід в оточенні Trp125 спостерігається при $49 \pm 1^\circ\text{C}$ (рис. 3.8), що свідчить про стабілізацію структури ЕМАР II у комплексі.

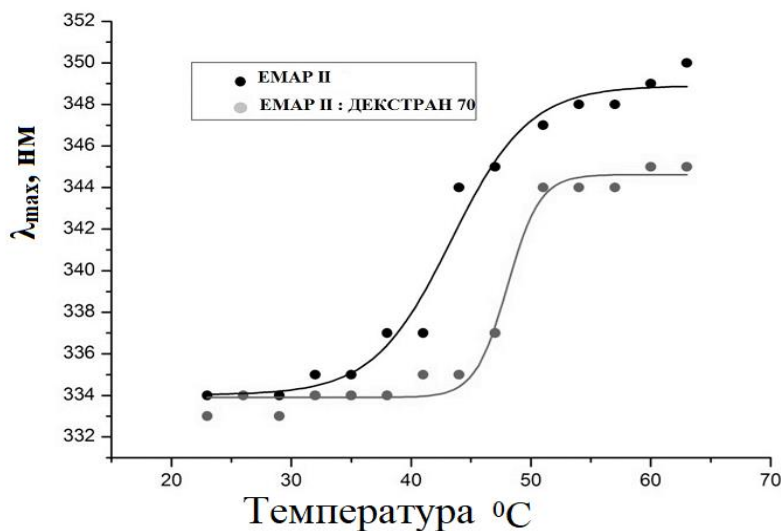


Рис. 3.8. Температурна залежність значення довжини хвилі в максимумі емісії для вільного ЕМАР II та ЕМАР II у комплексі із декстраном 70. Буфер: 50 mM NaPh-buffer, pH 7.5, 150 mM NaCl. λ_{EX} 280 нм.

Встановлено, що декстран 70 специфічно зв'язується з досліджуваним рекомбінантним білком. Стехіометрія зв'язування декстрана 70 з білком ЕМАР II становить близько 1:1, що підтверджує формування специфічного комплексу.

Показано, що препарати одержаного комплексу є більш стабільними до дії високих температур порівняно з вільним білком ЕМАР II.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **L. A. Kolomiets**, N. V. Vorobyova, D. M. Lozhko, V.N. Zayets, A. I. Kornelyuk. (2020) Stabilization of AIMP1/p43 and EMAP II recombinant proteins in the complexes with polysaccharide dextran-70. *Pharmacological Reports*, 72(1), 238-245. DOI: 10.1007/s43440-019-00016-x.

2. **Коломієць Л.А.**, Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І. (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного цитокіну ЕМАР II. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3 (47), 6 - 18. DOI: 10.18524/2307-4663.2019.3(47).182815.

3. Корнелюк О.І., **Бабенко Л.А.**, Козлов О.В., Резніков О. Г., Чайковська Л.В., Полякова Л.І. Нанокмпозитний протипухлинний препарат: патент на корисну модель № 64374; заявл.18.03.2011, Опубл. 10.11.2011, Бюл. № 21.

4. **Л.А. Бабенко**, О.В.Козлов, Л.В.Чайковська, Л.І.Полякова, О. Г.Резніков, О. І.Корнелюк. (2011 березень) Створення нанокмпозитного препарату ЕМАР II та дослідження його протипухлинної активності. - Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини», 24-26 березня, Харків, Україна. - *Збірник тез*, 2011, С. 25-26.

5. **L.A.Babenko**, A. G. Reznikov, L. V.Chaykovskaya, A. I. Kornelyuk. (2011 June) Investigation of anticancer activity of EMAP II based nanocomposite complex. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy. - *Abstract book*, 2011, P.196.

6. Kotsarenko K., **Babenko L.**, Ruban T., Lylo V., Kochubey T., Kornelyuk A., Lukash L. (2011 September) Study of EMAP II based nanocomposite complex affect on the survival of human cell *in vitro*. - The 4th International IMBG Conference for

Young Scientists "Molecular Biology Advances and Perspectives", 14-17 September, Kyiv. - *Abstract book*, P. 99.

7. Воробйова Н. В., **Коломієць-Бабенко Л. А.**, Ложко Д. М., Нестеренко Є. В. (2016 жовтень) Дослідження формування комплексів рекомбінантних білків АІМР1/Р43 та ЕМАР ІІ людини із декстраном-70. - ХІ міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, Україна. - *Збірник тез*, 2016, С. 29.

3.3. Вплив декстрана 70 на агрегацію білка ЕМАР ІІ

На відміну від синтетичних препаратів, біопрепарати є потенційно імуногенними. Навіть відносно невеликі відмінності в структурі діючої речовини можуть значно впливати на імуногенність лікарського засобу [159]. Агрегація білка була визнана однією з головних проблем при розробках та успішній комерціалізації білків або препаратів на їх основі [87, 164].

Дослідження агрегаційних властивостей ЕМАР ІІ та його комплексу з декстраном 70 проводили на отриманому за допомогою афінної хроматографії на Ni-NTA агарозі високоочищеному білку ЕМАР ІІ.

На початковому етапі роботи була проведена оцінка розміру полісахариду декстрана 70 у розчині при кімнатній температурі методом динамічного розсіювання світла. Аналіз спектрів показав, що гідродинамічний діаметр полімерного вуглеводу знаходиться в діапазоні 0,4 – 4 нм.

Температурне плавлення цитокіна ЕМАР ІІ та його комплексу з декстраном 70 вивчали в діапазоні температур 20 - 55 °С. Досліджуваний інтервал температур відповідає, на наш погляд, граничним температурним умовам використання та збереження білкових лікарських препаратів.

Було встановлено, що при кімнатній температурі в розчині білка ЕМАР ІІ присутні значні по розмірам осередки розсіювання світла з розмірами 20-40 нм, що, ймовірно, обумовлено процесом утворення агрегатів білка різного розміру,

оскільки теоретично розрахований комп'ютерним методом діаметр одної молекули ЕМАР II становить близько 3 нм. При подальшому підвищенні температури спостерігається плавлення білка, що супроводжується постійним зростанням розмірів агрегатів під впливом температури (рис. 3.9).

Наступним кроком було дослідження розмірів комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у розчині при різних температурах. З залежності на рис. 3.9 видно, що розміри комплексу ЕМАР II з декстраном 70 при зростанні температури значно відрізняються від розмірів білка ЕМАР II. При підвищенні температури відбувається значне зростання гідродинамічного діаметру молекул вільного цитокіна у розчині. В той же час з підвищенням температури розмір частинок комплексу ЕМАР II з декстраном 70 не змінюються і така тенденція зберігається до температури 55 °С. Ці дані свідчать, що комплекс ЕМАР II–декстран 70 є досить стабільним і не руйнується при високих температурах і що полісахарид декстран 70 стабілізує білкову глобулу ЕМАР II та перешкоджає процесу агрегації.

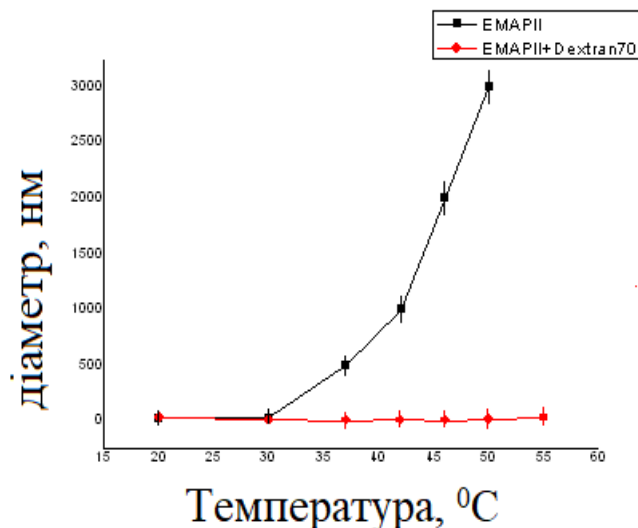


Рис. 3.9. Розподіл розмірів білка ЕМАР II та комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у розчині за різних температур.

Отримані дані відносно того, що полісахарид декстран 70 стабілізує білкову глобулу ЕМАР II та перешкоджає процесам агрегації, є важливим результатом роботи, який може бути в перспективі використаний в фармацевтичній промисловості при створенні стабільних рекомбінантних терапевтичних білків. Крім того, нанокмпозитний комплекс ЕМАР II з декстраном 70 може бути використаний для подальших доклінічних досліджень з метою застосування у фармакологічній практиці як протипухлинний та антиангіогенний комплекс.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Коломієць Л.А.,** Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І. (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного цитокіну ЕМАР II. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3 (47), 6 - 18. DOI: 10.18524/2307-4663.2019.3(47).182815.

2. Воробйова Н. В., **Коломієць-Бабенко Л. А.,** Ложко Д. М., Нестеренко Є. В. (2016 жовтень) Дослідження формування комплексів рекомбінантних білків АІМР1/Р43 та ЕМАР II людини із декстраном-70. - XI міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, Україна. - *Збірник тез*, 2016. С. 29.

3. **Коломієць Л.А.,** Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І. (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного цитокіну ЕМАР II. - XII Український біохімічний конгрес, 30 вересня-4 жовтня, Тернопіль, Україна. - *Медична та клінічна хімія*, 2019, Т.21, № 3 (80), С.272.

3.4. Біоінформатичний аналіз

Щоб з'ясувати природу формування агрегатів білка ЕМАР II спільно з м.н.с. віділу білкової інженерії та біоінформатики Ложко Д.М. проводили комп'ютерне моделювання взаємодії між окремими мономерами білка за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 та SymmDock. Для комп'ютерного моделювання було використано просторову структуру ЕМАР II, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (ProteinDataBank код 1EIJ). Амінокислотна послідовність цитокіна ЕМАР II представлена на рис.3.10.

```

10           20           30           40           50           60
SKPIDVSRLDLRIGCIITARKHPDADSLYVEEV DVGEIAPRTVVSGLVNHNHVPLEQMQRNM
70           80           90           100          110          120
VILLCNLKP AKMRGVLSQAMVMCASSPEKIEILAPPNGSVPGDRITFDAFFGEPDKELNP
130          140          150          160          166
KKKIWEQIQPDLHTNDECVAITYKGVPFVKGKGVCRQQTMSNSGIK

```

Рис. 3.10. Амінокислотна послідовність ЕМАР II. Неструктурована ділянка ³⁴DVGEIAPR⁴¹ та амінокислотні залишки, що входять до триптофанової “кишені” виділені курсивом та підкреслені.

Аналіз просторових структур виявив, що одну з ключових ролей у формуванні контакту між різними молекулами ЕМАР II відіграє неструктурована петля ³⁴DVGEIAPR⁴¹ молекули білка (в амінокислотній послідовності ЕМАР II виділена), яка при взаємодії з іншою молекулою білка блокує гідрофобну триптофанову “кишеню” на його поверхні (рис. 3.11). Отримані результати по докінгу та моделюванню утворення агрегатів ЕМАР II вказують на те, що можливий механізм перешкоджання агрегації ЕМАР II декстраном 70 полягає у зв'язуванні полісахариду з неструктурованою петлею ³⁴DVGEIAPR⁴¹ та гідрофобною триптофановою "кишенею" в структурі білка.

Взаємодія між неструктурованою петлею і амінокислотним оточенням триптофанового залишка має гідрофобний характер, що може забезпечувати достатній рівень енергії зв'язування між ними, а просторова структура петлі $^{34}\text{DVGEIAPR}^{41}$ відповідає формі триптофанової “кишені”.

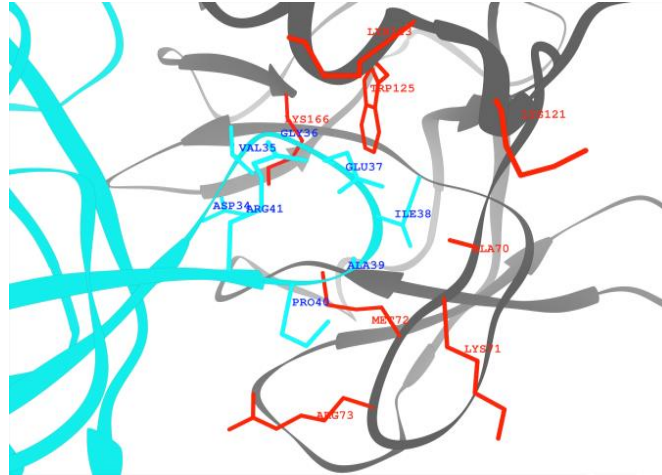


Рис. 3.11. Формування молекулярних контактів між молекулами ЕМАР ІІ в процесі утворення агрегатів білка. На одній молекулі ЕМАРІІ зображена неструктурована петля $^{34}\text{DVGEIAPR}^{41}$ (виділена синім кольором), а на іншій молекулі ЕМАР ІІ зображені амінокислотні залишки (виділені червоним кольором), що входять до триптофанової “кишені”.

Завдяки цьому результати моделювання комплексів ЕМАР ІІ обома веб-серверами є практично ідентичними (рис. 3.12, 3.13). Таким чином, аналіз отриманих результатів свідчить, що ймовірним початковим механізмом утворення агрегатів ЕМАР ІІ у розчині при підвищених температурах є гідрофобна взаємодія між молекулами білка.

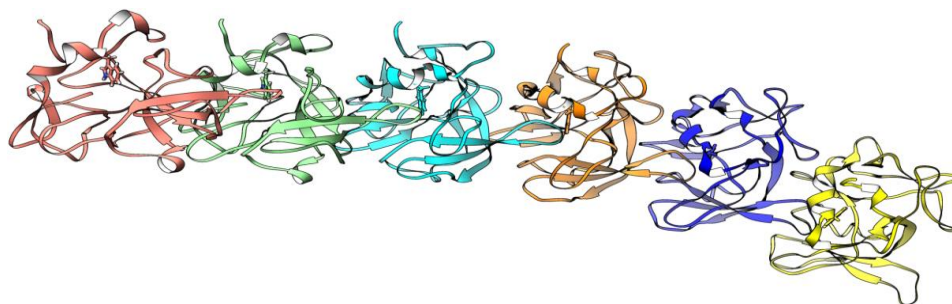


Рис. 3.12. Модель просторової структури агрегатів ЕМАР ІІ, отриманої в результаті макромолекулярного докінгу окремих молекул ЕМАР ІІ за допомогою веб-сервера Cluspro 2.0. Різними кольорами виділені молекули ЕМАР ІІ, які взаємодіють між собою, утворюючи агрегат.

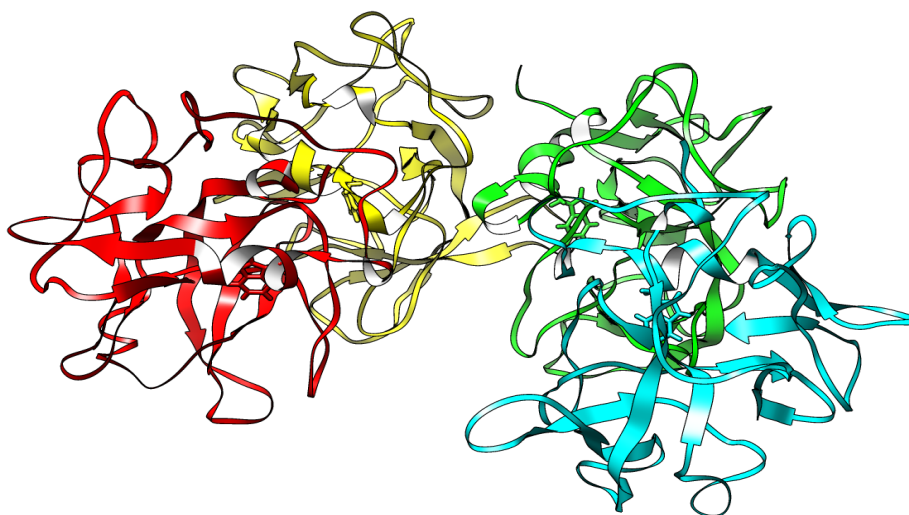


Рис. 3.13. Модель просторової структури агрегатів молекул ЕМАР ІІ, отриманої в результаті макромолекулярного докінгу двох молекул ЕМАР ІІ за допомогою веб-сервера SymmDock. Різними кольорами виділені молекули ЕМАР ІІ, які взаємодіють між собою, утворюючи агрегат.

З метою виявлення потенційного сайту зв'язування декстрана 70 з поверхнею білка ЕМАР ІІ та за для з'ясування механізму стабілізації протипухлинного комплексу ЕМАР ІІ декстраном 70 проводили гнучкий докінг в програмі AutoDockVina. Молекулярну структуру декстрану представлено у вигляді невеликого фрагменту полісахариду, побудованого із залишків α -D-глюкопіранози (рис. 3.14).

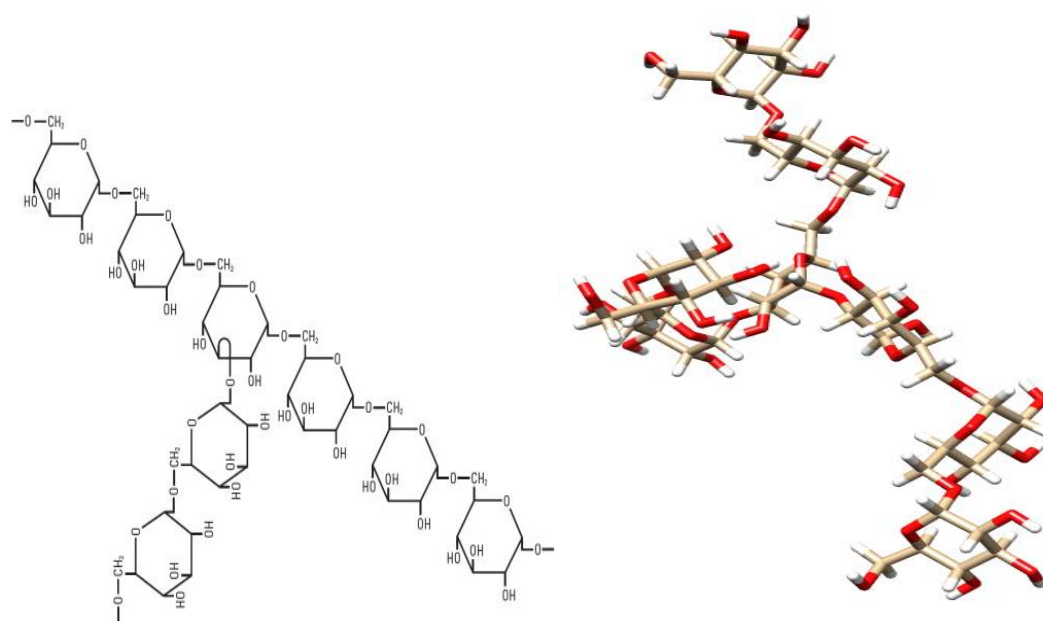


Рис. 3.14. Структурна формула декстрана, представлена у вигляді фрагменту полісахариду.

В результаті комп'ютерного моделювання докінгу (рис. 3.15) встановлено, що зв'язування декстрана з ЕМАР II відбувається в “кишені” на поверхні білка, де локалізований Trp125. Зв'язування декстрана з ЕМАР II призводить до блокування локальних конформаційних переходів в оточенні Trp125, внаслідок чого відбувається стабілізація білка у розчині. Згідно моделей у зв'язуванні декстрана 70 з ЕМАР II залучені такі залишки, як Arg12, Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166.

Аналіз структури комплексу декстрана 70 з білком показав, що афінність зв'язування декстрана (ΔG_{Free}) з ЕМАР II становить -6.4 ккал/моль. Результати по розрахунку енергії зв'язування добре корелюють з експериментальними даними по флюоресценції, що вказує на достовірність комп'ютерного моделювання.

В результаті експериментальних та біоінформатичних методів досліджень розроблена технологія отримання комплексу білка ЕМАР II з декстраном 70 (Додаток Б).

Результати досліджень, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **L. A. Kolomiets**, N. V. Vorobyova, D. M. Lozhko, V.N. Zayets, A. I. Kornelyuk. (2020) Stabilization of AIMP1/p43 and EMAP II recombinant proteins in the complexes with polysaccharide dextran-70. *Pharmacological Reports*, 72(1), 238-245. DOI: 10.1007/s43440-019-00016-x.

2. **Коломієць Л.А.**, Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І. (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного цитокіну ЕМАР II. *Мікробіологія і біотехнологія*, 3 (47), 6 - 18. DOI: 10.18524/2307-4663.2019.3(47).182815.О.Ю.

3. Скоробогатов, **Бабенко Л.А.**, О. І.Корнелюк. (2011 березень) Визначення імуногенних ділянок рекомбінантного білка ЕМАР II біоінформатичним методом. . - Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини», 24-26 березня, Харків, Україна (Опубл. в *Збірник тез*, 2011. С. 158-159).

4. Воробйова Н. В., **Коломієць-Бабенко Л. А.**, Ложко Д. М., Нестеренко Є. В. (2016 жовтень) Дослідження формування комплексів рекомбінантних білків AIMP1/P43 та ЕМАР II людини із декстраном-70. - XI міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», Харків, Україна. (Опубл. в *Збірник тез*, 2016. С. 29).

5. **Коломієць Л.А.**, Ложко Д.М., Чуніхін О.Ю., Заєць В.М., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І. (2019) Вплив декстрану-70 на агрегацію протипухлинного

цитокіну ЕМАР II. - XII Український біохімічний конгрес, 30 вересня-4 жовтня, Тернопіль, Україна. (Опубл. в *Медична та клінічна хімія*, 2019, Т.21, № 3 (80), С.272).

6. Корнелюк О.І., **Бабенко Л.А.**, Козлов О.В., Резніков О. Г., Чайковська Л.В., Полякова Л.І. Нанокмпозитний протипухлинний препарат: патент на корисну модель № 64374; заявл.18.03.2011, Опубл. 10.11.2011, Бюл. № 21.

7. **Коломієць Л.А.**, Малина А.Е., Корнелюк О.І. Спосіб стабілізації протипухлинного цитокіна ЕМАР II: патент на корисну модель № 141271; заявл.24.10.2019, Опубл. 25.03.2020.

3.5. Пірогенність комплексу ЕМАР II з декстраном 70

Важливе занепокоєння, яке стосується розробки та ліцензування білкової терапевтики - це ризик утворення антитіл до медичних препаратів. Тому оцінка імуногенності зараз є невід'ємною частиною розвитку, ліцензування та використання цього класу продукції [90]. Фактори, що впливають на імуногенність терапевтичного білка часто пов'язані з виробничим процесом [161]. На імуногенність білкового продукту впливає кілька факторів, основними з яких є присутність домішок клітини-господаря (клітини, ДНК, ліпіди, віруси або ендотоксини) та білкові агрегати [162].

Ендотоксини, джерелом яких є грамнегативні мікроорганізми, є найбільш розповсюдженою причиною пірогенних токсичних реакцій при забрудненні ними лікарських засобів [163]. Ці ендотоксини є ліпополісахаридами. Згідно Державної фармакопеї України [151], проведено визначення кількості ендотоксинів в комплексі ЕМАР II з декстраном 70 методом гель-тромб тесту. Встановлено, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 містить менше, ніж 0,5 МОЕ / кг, але більше 0,03 МОЕ / кг ліпополісахаридів. Дозволений вміст

ліпополісахаридів Державною фармакопеею України є 5 МОЕ / кг. Таким чином, така мізерна кількість ендотоксинів не впливає на продукцію культурами клітин фактору некрозу пухлин та інших біологічних властивостей.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **L.A.Kolomiets-Babenko**, O. S. Bohorad-Kobelska, N. L. Kovalchuk, M. Ja. Spivak, A. I. Kornelyuk. (2016) Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon. *Biotechnologia Acta*, 9 (5), 18-23. DOI: 10.15407/biotech9.05.018.

2. **Коломієць Л.А.**, Ковальчук Н.Л. (грудень 2015) Визначення вмісту ендотоксинів у нанокompatитному препараті EMAP II методом гель-тромб тесту. – X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 2-4 грудня 2015, Харків, Україна. - *Збірник тез*, 2015. С. 128.

3.6. Вплив комплексу EMAP II з декстраном 70 на продукцію TNF α

3.6.1. Токсичність комплексу EMAP II з декстраном 70 на культурі клітин. Токсичність нанокompatитного комплексу EMAP II з декстраном 70 та декстрану 70 зокрема, визначали на культурах клітин L929 та PST. Для оцінки токсичності речовин використовували показники МВК (максимально витримувана концентрація) та СС50(цитотоксична концентрація препарату, що призводить до 50% деструкції моношару клітин порівноно з контролем). У якості контролю використовували клітини, не оброблені дослідними речовинами).

Як видно з табл. 3.1, МВК та СС50 на обох клітинних лініях для комплексу EMAP II збігаються та становлять 25,00 та 50,00 $\mu\text{g}/\text{ml}$, відповідно. Чутливість клітин до декстрану 70 відрізнялася на різних клітинних лініях.

Дозу CC50 для декстрану 70 не визначали через те, що деструкція 50% моношару не спостерігалася.

Таблиця 3.1

Токсичність нанокompatитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 та декстрану 70 *in vitro*

Клітинна лінія	Комплекс ЕМАР II з декстраном 70		Декстран 70
	МБК, $\mu\text{г/мл}$	CC50, $\mu\text{г/мл}$	МБК, $\mu\text{г/мл}$
L929	25,0 [25,0 – 50,0]	50,0 [50,0 – 100,0]	177,0 [177,0 – 354,0]
PST	25,0 [25,0 – 50,0]	50,0 [50,0 – 100,0]	88,5 [88,5 – 177,0]

Примітки: результати представлені як медіана та інтерквартильний інтервал [25% центиль – 75% центиль].

3.6.2. Продукція ІФН під дією нанокompatитного комплексу ЕМАР II.

Визначення продукції інтерферону проводили у зразках середовища культивування клітин, оброблених комплексом ЕМАР II з декстраном 70 у концентраціях від 25,0 до 0,2 $\mu\text{г/мл}$, та окремо декстраном 70. Титр інтерферону, індукованого препаратом ЕМАР II, визначали шляхом мікротитрування зразків на культурі клітин L929 проти 100 ТЦД₅₀ тест-вірусу ВВС (вірус везикулярного стоматиту).

При використанні комплексу ЕМАР II з декстраном 70 та окремо декстрану 70 в зразках середовища продукції ІФН виявлено не було.

3.6.3. Продукція TNF- α під дією комплексу ЕМАР II з декстраном 70.

Біологічну активність TNF- α у середовищі культивування культури клітин L929 визначали за цитотоксичною дією на цю культуру клітин, яку виражали через індекс цитотоксичності (%) та у перерахунку на нг/мл. Перерахунок у нг/мл здійснювали як описано [164], використовуючи

апроксимаційну формулу $Y=3,985\ln(X)+75,341$. Звідси, $X=\exp((Y-75,341)/3,985)$.

Комплекс ЕМАР II з декстраном 70 стимулює продукцію TNF- α культурою клітин PST у діапазоні концентрацій від 1,6 до 25,0 $\mu\text{г/мл}$ (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Продукція TNF- α клітинами PST під дією нанокompозитного комплексу ЕМАР II.

Концентрація препарату ЕМАР II, $\mu\text{г/мл}$	Індекс цитотоксичності, %	Вміст TNF- α , нг/мл
0,2	2,83	$1,25 \times 10^{-8}$
0,4	12,61	$1,46 \times 10^{-7}$
0,8	13,72	$1,92 \times 10^{-7}$
1,6	32,00	$1,89 \times 10^{-5}$
3,1	76,46	1,32
6,3	76,16	1,23
12,5	69,55	0,23
25,0	46,71	$0,76 \times 10^{-3}$
50,0	5,22	$2,28 \times 10^{-8}$

Згідно з отриманими результатами, декстран 70 не виявив здатності впливати на продукцію TNF- α (рис.3.16).

Оцінивши дані, можна зробити висновок про те, що продукція TNF- α під дією комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у діапазоні концентрацій 0,8 – 25,0 $\mu\text{г/мл}$ значно перевищує продукцію TNF- α під дією декстрана 70 і ця різниця є достовірною ($p < 0,05$). Концентрація декстрана 70 відповідає його концентрації у комплексі з ЕМАР II.

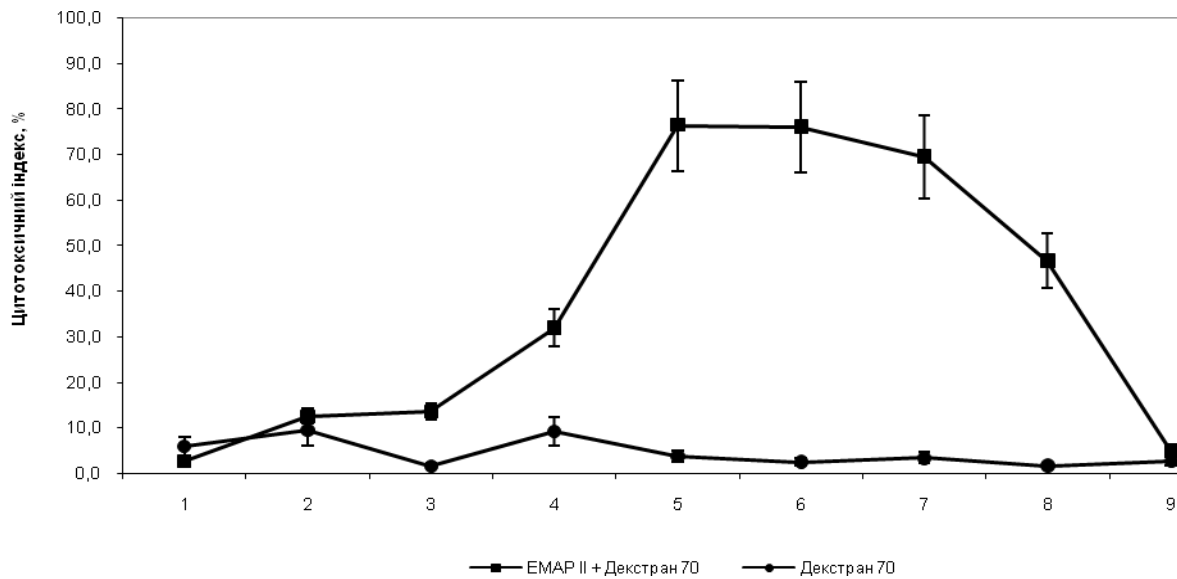


Рис. 3.16. Індекс цитотоксичності під дією нанокмпозитного комплексу EMAP II з декстраном 70 та безпосередньо декстрану 70 на моделі культури клітин L929

Примітки: По осі X відкладено концентрації EMAP II + декстран-70: 1 – 0,2+0,69; 2 – 0,4+1,38; 3 – 0,8+2,77; 4 – 1,6+5,53; 5 – 3,1+11,06; 6 – 6,3+22,13; 7 – 12,5+44,25; 8 – 25,0+88,5; 9 – 50,0+177,0 $\mu\text{г}/\text{мл}$, а також декстрану-70: 1 – 0,69; 2 – 1,38; 3 – 2,77; 4 – 5,53; 5 – 11,06; 6 – 22,13; 7 – 44,25; 8 – 88,5; 9 – 177,0 $\mu\text{г}/\text{мл}$.

Як показано на рис. 3.16, продукція TNF- α у зразках середовища культивування клітин PST оброблених комплексом EMAP II з декстраном 70 відбувається за рахунок цитокіну EMAP II, а не за рахунок декстрану 70.

В результаті проведених досліджень, можна зробити висновок про те, що комплекс EMAP II з декстраном 70 здатен викликати індукцію TNF- α в культурах клітин PST при досить низьких концентраціях (1,6 – 25,0 $\mu\text{г}/\text{мл}$). Продукції інтерферону комплекс EMAP II з декстраном 70 не викликає. Дослідження з декстраном 70 показали, що полімер служить лише покриттям для комплексу і не впливає на продукцію TNF- α . В свою чергу TNF- α індукує апоптоз активованих клітин та бере участь у процесі відновлення пошкодженої

в результаті запалення тканини. Висока доза TNF- α знищує судинну систему пухлини і підвищує поглинання медикаментів пухлиною. Тому надзвичайно важливим є наявність якомога більшої кількості TNF-рецепторів в пухлинному ендотелії.

EMAP II вперше виявлений як один із факторів, що здатен модулювати відповідь ендотеліальних клітин на дію фактору некрозу пухлин (TNF- α). TNF- α в кров'яному системному руслі вибірково викликає тромбоз мікроциркуляторного русла деяких злоякісних пухлин за рахунок збільшення концентрації на мембрані ендотеліоцитів тканинного фактора тромбопластину, що призводить до некрозу пухлини [5, 20]. Отже, можливе використання комплексу EMAP II з декстраном 70 може бути важливим при розробці препаратів для терапії різноманітних новоутворень за рахунок посилення впливу TNF- α на пухлини.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. L.A.Kolomiets-Babenko, O. S. Bohorad-Kobelska, N. L. Kovalchuk, M. Ja. Spivak, A. I. Kornelyuk. (2016) Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon. *Biotechnologia Acta*, 9 (5), 18-23. DOI: 10.15407/biotech9.05.018.

3.7. Визначення гострої та хронічної токсичності комплексу EMAP II з декстраном 70 на мишах лінії Balb/c

Раніше під час дослідження *in vivo* впливу рекомбінантного EMAP II на розвиток ксенографтів аденокарциноми простати людини в організмі дорослих мишей лінії СВА було показано, що препарат в дозах 10, 100 та 200 мкг/кг ваги тварин у разі систематичного введення протягом 3 днів інгібує дозозалежним чином розвиток пухлини, але не виявляє токсичного ефекту на організм контрольних тварин [56]. Аналогічні дані були отримані під час вивчення дії

EMAP II на розвиток клітин С6 гліоми криси в організмі мишей у разі щоденного введення препарату цитокіну протягом 12 днів у дозах 8 та 80 мкг/кг [169, 72]. Було показано, що період напіввиведення EMAP II з плазми піддослідних мишей у разі внутрішньовенного введення становить 47 хвилин [8]. Вивчення впливу комплексу EMAP II з декстраном 70 на клітини раку простати людини лінії LNCaP вперше виявило цитотоксичну дію препарату на ракові клітини *in vitro* в дозах 1 та 10 мкг на мл середовища. Було показано, що інгібуючий ефект комплексу пов'язаний з розвитком апоптозу ракових клітин в культурі [38]. Водночас вплив комплексу EMAP II з декстраном 70 на організм тварин ще невідомий. Тому було вирішено протестувати його дію на тварин на модельному об'єкті та визначити межі можливої токсичності препарату. Як модельний об'єкт у роботі було взято мишей лінії Balb/c. Для вивчення токсичної дії цитокінового комплексу на організм мишей ми виходили з активно діючої на ракові клітини згідно з літературними даними дози 10 мкг/кг, яку перевищували у разових дозах до 1000 раз і до 100 раз перевищували дози для визначення хронічного впливу комплексу на тварин. Експериментальні дослідження токсичного впливу нанокмпозитного препарату EMAP II на мишах показали, що в разі введення препарату в разових дозах 300–10 000 мкг/кг не спостерігається загальнотоксичної дії препарату, і він не спричинює загибель тварин. Одразу після введення препарату спостерігалася спонтанна рухлива збудливість. При цьому миші зберігали координацію рухів. Не було порушень дефекації, сечовипускання та інших ознак нейротоксичності. Стан слизових, шерстяний покрив та охайність залишалися без змін. Протягом наступних 14 діб спостереження за тваринами не виявлено змін в поведінці та загальному стані тварин. Спостерігалася і позитивна динаміка маси тіла. Зважування робили на 1, 7 та 14-ту добу після введення препарату. Результати зважування трьох піддослідних груп мишей, кожна з яких складалася з 6 особин, наведені в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Динаміка маси тіла тварин в різних групах після введення нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70

	група I (300 мкг/кг)	група II (1000мкг/кг)	група III (10 000мкг/кг)	контроль
1 доба	23,57±2,3	24,17±1,4	24,23±0,8	24,07±1,2
7 доба	24,67±2,5	25,58±1,2	25,82±1,5	25,73±1
14 доба	27,62±1,2	27,2±0,9	28,33±1,1	27,77±0,6

Аутопсія після завершення дослідження впливу нанокмпозитного комплексу на організм тварин включно до 10 000 мкг/кг ваги не виявила патологоанатомічних ознак токсичності препарату в органах мишей. Не спостерігалось також суттєвого впливу препарату і на подальшу життєдіяльність тварин.

Під час дослідження хронічної токсичності нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на мишах було проаналізовано масові коефіцієнти внутрішніх органів тварин. Макроскопічне дослідження внутрішніх органів мишей показало, що комплекс не викликає у піддослідних тварин патологічних декструктивних змін в їх органах. Не було виявлено різниці у вазі контрольних та піддослідних мишей. Дані експерименту наведено в табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Дослідження маси внутрішніх органів тварин після введення нанокompatитного комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70

	група І (300 мкг/кг)	група ІІ (1000 мкг/кг)	контроль
серце	0,25±0,02	0,24±0,02	0,24±0,01
печінка	1,98±0,05	1,82±0,03	1,8±0,02
нирки	0,37±0,05	0,36±0,02	0,37±0,02
селезінка	0,14±0,02	0,14±0,03	0,15±0,02
легені	0,35±0,05	0,38±0,05	0,32±0,02

Таким чином, проведені нами дослідження з визначення впливу комплексу ЕМАР ІІ з декстраном на лабораторних мишах показали, що препарат не має вираженої токсичної дії на організм тварин. Ці дослідження відкривають можливості подальших біомедичних та структурно-функціональних досліджень нанокompatитного комплексу ЕМАР ІІ для застосування в перспективі в біомедицині.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. **Коломієць Л., Заєць В., Корнелюк О. (2018)** Дослідження впливу нанокompatитного комплексу цитокіну ЕМАР ІІ з декстраном 70 на організм мишей лінії Valb/c. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, серія біологія*, 2(76), 29-33. DOI: 10.17721/1728_2748.2018.76.29-33.

3.8. Протипухлинний ефект комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на моделі трансплантованих фрагментів аденокарциноми простати людини під капсулу нирки мишей

В експериментальних дослідженнях контрольна група включала 20 ксенографтів пухлин, трансплантованих під капсулу нирки мишей лінії СВА. У 55 % пухлин контрольної групи спостерігався суттєвий приріст маси ксенографтів (більше ніж 50 % порівняно з початковою масою гетеротрансплантанту). Середній приріст маси контрольних пухлин після шестиденного періоду спостереження складав 77,5 % (табл. 3.5). Різниця в прирості маси ксенографтів обумовлена гетерогенністю пухлини і переважанням в окремих випадках строми, що було підтверджено гістологічними дослідженнями. Ріст трансплантантів відбувався за рахунок активної проліферації злоякісних епітеліальних клітин, що вистилають ацинуси. В частини ксенографтів виявляли безліч тяжів і ацинусоподібні утворення, які містять веретеновидні клітини з овальними ядрами, в інших епітеліальні структури були слабо виражені (рис. 3.17).

Таблиця 3.5.

Вплив ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 на приріст маси ксенографтів аденокарциноми простати людини

№	Група тварин	Маса пухлини		Приріст маси, %	% від контролю	% гальмування росту
		Початкова (M±m, мг)	Кінцева (M±m, мг)			
1	Контроль	1,02±0,01	1,81±0,16	77,5	100	
2.	Кастрація	1,07±0,01	1,23±0,12	15,0	20,3	79,7
3.	ЕМАР II, 10мкг/кг	1,02±0,01	1,25±0,11	22,5	29,1	70,9
4.	ЕМАР II+декстран 70, 10мкг/кг	1,02±0,01	1,20±0,06	17,7	22,8	77,2

Хоча для підсадки брали однакові шматочки пухлини масою 1 мг, із-за неоднорідності тканин вони містили різну кількість епітеліальних утворень, які у вигляді тяжів, клітинних скупчень фіброзного чи ацинарного характеру пронизували тканини ксенотрансплантанта. Стромальна частина ксенотрансплантатів також була неоднорідна і варіювала від рихлої до щільно волокнистої. Ближче до периферичної частини ксенотрансплантанту епітеліальні клітини зазвичай утворюють щільні багат шарові скупчення. В центральній частині трансплантанту, особливо серед щільно волокнистої строми, епітеліальні клітини розташовуються більш рихло і в таких ділянках ріст епітеліальних клітин може бути уповільненим. На 7-му добу після підсадки навколо ксенотрансплантанту утворювався лейкоцитарний вал, спостерігали інфільтрацію строми лейкоцитами, які проникають і в епітелій. Необхідно відмітити, що краще зберігаються пухлинні клітини, які розташовані по периферії, особливо в тому випадку, коли строма щільна. В периферичній частині ксенотрансплантанту спостерігається утворення капілярів. В центральних ділянках ксенотрансплантантів з щільноволокнистою стромою спостерігалася фрагментація фібрилярного матеріалу, що може свідчити про некротичні перетворення. В центрі двох ксенотрансплантантів в щільній сполучній тканині спостерігалася зона некрозу.

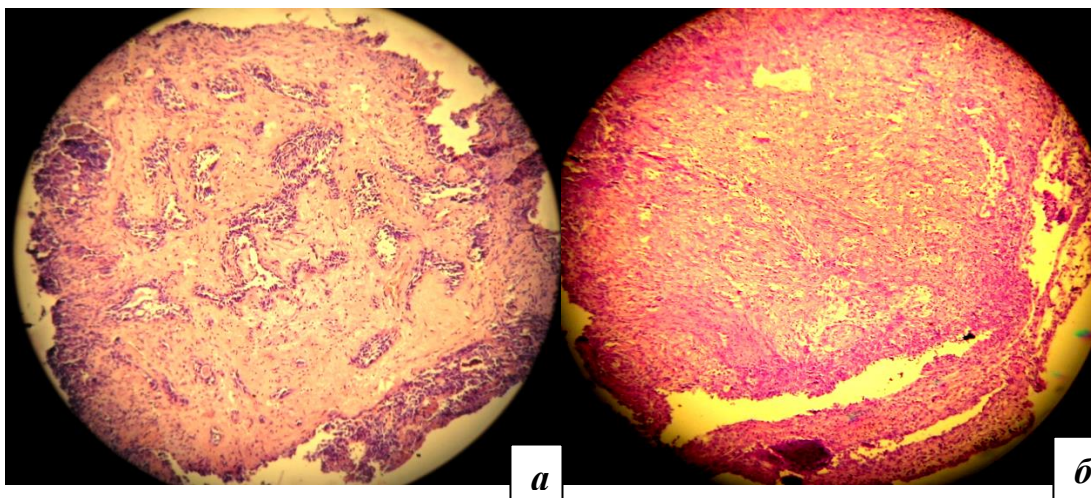


Рис. 3.17. Ксенотрансплантанти контрольної групи з великою (а) та незначною (б) кількістю епітеліальних структур (гематоксилін-еозин, об.20).

Наші результати досліджень корелюють з даними літератури. Нерівномірність приросту маси контрольних ксенографтів характерна і для інших досліджуваних пухлин, зокрема пухлин раку молочної залози, раку шлунка, меланоми та ін. [169, 170].

Щоб визначити залежність пухлин від андрогену ми підсажували зразки тканин кастрованим мишам. Результати показали, що середній приріст маси ксенографтів в цій групі становить 15,0 % (табл. 3.5.). У 89 % ксенографтів цієї групи приріст становив менше 50 % від початкової маси. Варто зазначити, що у 55 % із них спостерігалась повна атрофія пухлини. Ці дані вказують на те, що пухлини належать до андрогензалежних.

При дослідженні протипухлинної активності цитокіна ЕМАР II в дозі 10 мкг/кг встановлено, що приріст маси ксенографтів в середньому складав 23,4 %, а при використанні комплексу ЕМАР II з декстраном 70 –17,7 %, тобто спостерігалось сповільнення росту пухлин на 71-77 % відповідно. У 58 % ксенографтів спостерігали повний регрес пухлин (приріст маси ксенографтів варіював від –0,35 до +0,20 мг). Аналогічна ситуація спостерігалась і в групі з використанням комплексу ЕМАР II з декстраном 70.

В 67 % випадків пухлини не збільшувалися в об'ємі (приріст маси ксенографтів становив -0,25 до +0,20 мг).

Гістологічні дослідження показали, що під впливом якцитокіну ЕМАРII, так і його комплексу з декстраном 70 в дозі 10 мкг/кг спостерігаються виражені деструктивні зміни. В ксенотрансплантатах збільшувалася кількість епітеліальних клітин з гіперхромними ядрами та ущільненою цитоплазмою порівняно з контролем. Варто відмітити, що частина клітин зберігала нормальну будову.

Загалом прослідковується такий же характер розташування епітелію, як і в контрольній групі – в центральній частині ксенографтів з щільноволокнистою стромою в ацинусоподібних порожнинах епітелій більш рихлий (рис. 3.18, а), епітеліальний шар в периферичній зоні складається з щільно розташованих

клітин (рис. 3.18, б), але на відміну від контролю частина клітин містить гіперхромні ядра. Серед епітеліальних клітин була відмічена наявність лейкоцитів.

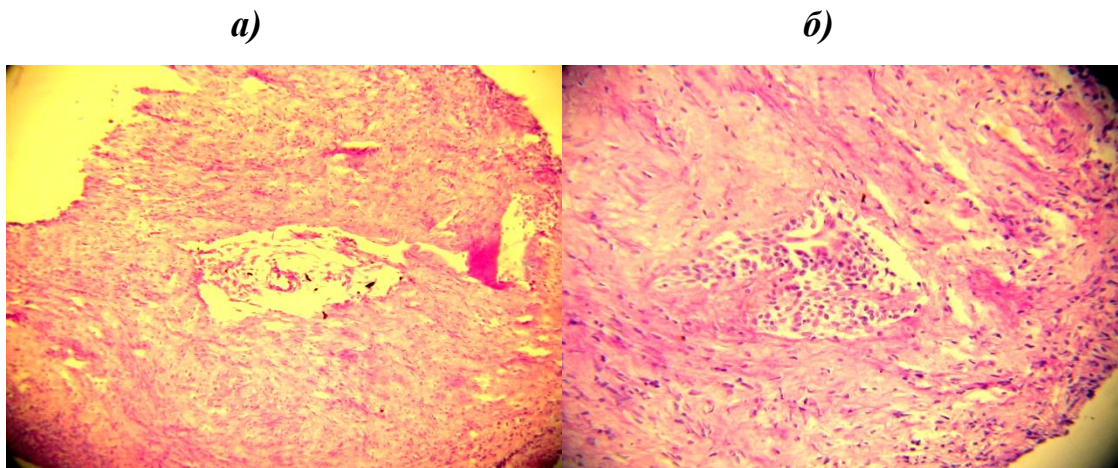


Рис. 3.18. Гістологічна будова ксенотрансплантантів аденокарциноми простати під впливом ЕМАР II 10 мкг/кг (гематоксилін- Шифф, об.40).

Ефекти були близькі до посткастраційних (рис. 3.19). Перевагою досліджень ліофільної форми комплексу ЕМАР II є наявність в комплексі декстрана 70 в якості стабілізатора просторової структури білка. Вплив ЕМАР II на аденокарциному простати можна оцінювати як призупинку цитокіном пухлинного росту. Виражену протипухлинну активність ЕМАР II відмічали й інші дослідники на тваринах при експериментальній терапії меланоми [59], саркоми [68], гліоми [55, 76], раку шлунку та деяких інших злоякісних новоутворень [8]. Автори пов'язують таку реакцію з антиангіогенною активністю ЕМАР II [16, 4, 54]. Ключовим механізмом впливу ЕМАР II на пухлинні клітини простати людини, як було показано раніше [56] є стимуляція апоптозу пухлинних клітин, що підтверджено даними гістологічного (конденсація хроматину та посвітління ядер, поява апоптозних тілець) та гістохімічного досліджень, зокрема вивчення фрагментації ДНК методом TUNEL.

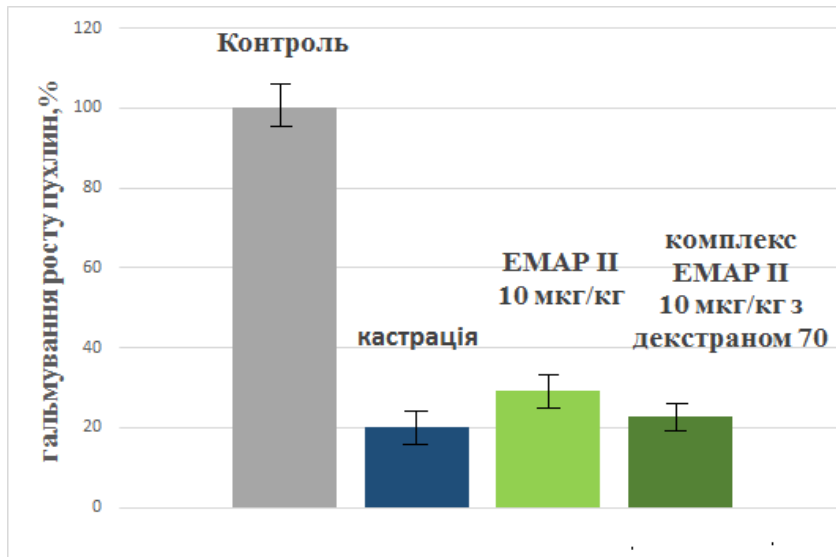


Рис. 3.19. Вплив цитокіну ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 на приріст маси ксенографтів аденокарциноми простати людини у мишей в відсотках відносно контролю

Приведені дані можуть представляти практичну цінність узв'язку з поширеністю раку передміхурової залози. Як показують результати наших досліджень комплекс ЕМАР II з декстраном 70 проявляє таку ж протипухлинну активність відносно ксенографтів аденокарциноми простати людини у мишей як і чистий цитокін ЕМАР II.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Л.В.Чайковская, Л.И.Полякова, О.В.Сачинская, **Л.А.Бабенко**, А.И. Корнелюк, А.Г.Резников. (2011) Тестирование противоопухолевой активности нанокompозитного комплекса рекомбинантного цитокинподобного полипептида ЕМАР-II на ксенотрансплантатах андрогензависимого рака предстательной железы человека. *Эндокринология*, 16 (2), 160-168.

2. Корнелюк О.І., **Бабенко Л.А.**, Козлов О.В., Резніков О. Г., Чайковська Л.В., Полякова Л.І. Нанокмпозитний протипухлинний препарат: патент на корисну модель № 64374; заявл.18.03.2011, Опубл. 10.11.2011, Бюл. № 21.

3. **Бабенко Л.А.**, Чайковська Л.В., Резніков О. Г., Корнелюк О. І. (2010 вересень) Дослідження протипухлинної дії цитокіна ЕМАР II на ксенотрансплантанти аденокарциноми простати людини у мишей лінії СВА. - Матеріали Х Українського біохімічного з'їзду, 13-17 вересня, Одеса. - *Ukr. Biochem. J.*, 2010, (Спеціальний випуск), том 82, №4, С.49.

4. **Babenko L.A.**, Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Reznikov A.G., Kornelyuk A. I. (2010 February) Antitumor activity of II protein. - FEBS Special Meetings JakStat Signaling: From Basics to Disease, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria. - *Abstract book*, 2010, P.53).

5. **Л.А. Бабенко**, О.В.Козлов, Л.В.Чайковська, Л.І.Полякова, О. Г.Резніков, О. І.Корнелюк. (2011 березень) Створення нанокмпозитного препарату ЕМАР II та дослідження його протипухлинної активності. - Міжнародна наукова конференціяї студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини», 24-26 березня, Харків, Україна. - *Збірник тез*, 2011. С. 25-26.

6. **L.A.Babenko**, A. G. Reznikov, L. V.Chaykovskaya, A. I. Kornelyuk. (2011 June) Investigation of anticancer activity of EMAR II based nanocomposite complex. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy. - *Abstract book* 2011, P.196.

3.9. Вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на проліферацію культур клітин

З метою визначення потенційної цитотоксичності цитокіна ЕМАР II було досліджено вплив вказаного цитокіну на ріст культури клітин людини 4BL6 та

Нер-2. Результати МТТ-тесту цих досліджуваних ліній клітин представлені на рис. 3.20.

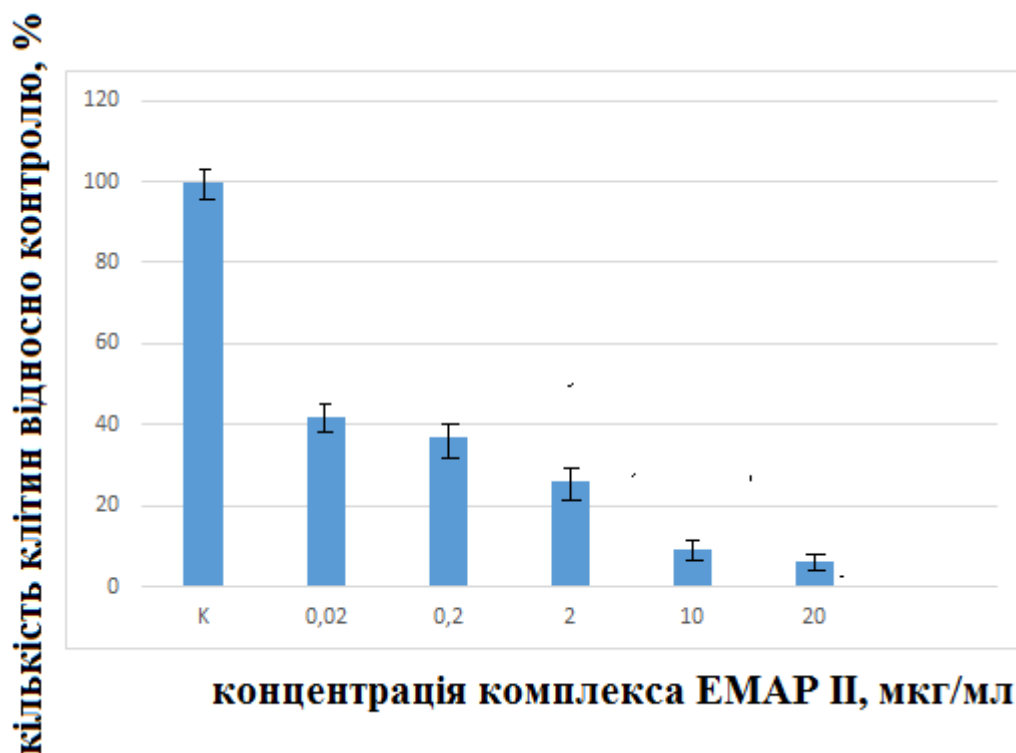


Рис. 3.20. Цитотоксичний вплив комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на культуру клітин Нер-2 *in vitro*

Як показують представлені результати, цитокін ЕМАР II призводить до зниження кількості клітин в моношарі, що може свідчити про його здатність впливати на клітинну проліферацію, яка, ймовірно, пов'язано із здатністю індукувати апоптоз [62, 171]. Лінія клітин 4BL6 виявилася більш чутливою до дії цитокіна: виражене зниження числа клітин в моношарі під впливом ЕМАР II спостерігалось вже при концентрації 0,8 мкг/мл. Обробка клітин цитокіном ЕМАР II в більш низьких концентраціях не призводила до статистично достовірного зниження кількості живих клітин. При концентрації цитокіна 10 мкг/мл спостерігали зниження числа досліджуваних клітин до 60% по відношенню до контролю. В той же час для лінії ПК-1 не було виявлено значного зниження кількості клітин під впливом ЕМАР II в діапазоні

концентрацій від 0,04 до 10 мкг/мл. Як зазначалося раніше, ефект ЕМАР II залежить від концентрації. Представлені результати показують, що оптимальна концентрація для цитокіну ЕМАР II на культурах клітин становить 10 мкг/кг.

Результати, викладені у підрозділі, опубліковано в наступних роботах:

1. Lylo V., Matsevich L., Kotsarenko E, **Babenko L.**, Kornelyuk A., Lukash L. (2011) Activation of gene expression of the O⁶ –methylguanidine-DNA-transferase repair enzyme upon the influence of ЕМАР II cytokine in human cells *in vitro*. *Cytology and Genetics*, 45 (6), 373-378. DOI: 10.3103/S0095452711060053.

2. **Бабенко Л.А.**, Коцаренко Е.В., Лыло В.В., Мацевич Л.Л., Рубан Т.А., Корнелюк А.И., Лукаш Л.Л.. (2011) Изучение влияния нанокompозитного препарата ЕМАР II на пролиферацию и выживаемость иммортализованных клеток. - Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века, Пушино, Россия. - *Сборник тезисов*, 2011, С.300.

3. Коцаренко К. В., Лыло В. В., Мацевич Л. Л., Рубан Т. А., **Бабенко Л. А.**, Корнелюк А. И., Лукаш Л. Л. (2011 травень) Вплив цитокінів на експресію гена *MGMT* в клітинах людини *in vitro*. - П'ята Конференція молодих вчених інституту молекулярної біології і генетики НАН України, присвячена 130-річчю від дня народження О.О. Богомольця, 24-25 травня Київ, Україна. - *Біополімери і клітина*, 2011. № 4. С. 318.

4. Kotsarenko K., **Babenko L.**, Ruban T., Lylo V., Kochubey T., Kornelyuk A., Lukash L. (2011 September) Study of ЕМАР II based nanocomposite complex affect on the survival of human cell *in vitro*. - The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology Advances and Perspectives", 14-17 September, Kyiv. - *Abstract book*, P. 99.

5. Т.О. Голобородько, Л.І. Полякова, Г.В. Соткіс, О.І. Корнелюк, **Л.А.Бабенко**, Я.М. Шуба, О.І. Резніков. (2010) Поліпептид ЕМАР II гальмує

ріст і стимулює апоптоз клітин лінії LNCaP раку простати людини. *Журнал АМН України*, 16(4), 681-690.

6. Goloborodko T., Polyakova L., Sotkis A., Moriev R., Kornelyuk A., **Babenko L.A.**, Shuba Y., Reznikov A. (2011 June) Effect of recombinant protein EMAP II on proliferation and apoptosis in the prostate cancer LNCaP cell line. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy (Опубл. *Abstract book* 2011, P.209).

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Використання білків в якості терапевтичних засобів зробило революцію в лікуванні багатьох захворювань [159]. Виробництво білка для структурних та біофізичних досліджень, функціональних аналізів, досліджень *in vitro* та *in vivo*, а також для застосувань в якості ліків у фармації та біотехнології в останні роки переросло в зрілу дисципліну. Завдяки зростанню акценту на біофармацевтичні препарати, зріс попит на білки, що застосовуються для структурних та біофізичних досліджень та підвищився інтерес до інноваційних підходів щодо експресії, очищення та характеристики рекомбінантних білків [88]. Адміністрація з контролю за продуктами харчування та лікарськими засобами Сполучених Штатів Америки (FDA) схвалила 59 нових лікарських засобів (42 нових хімічних та 17 біологічних) протягом 2018 року [173, 174]. Причому, відмічається зростання зареєстрованих на ринку Європи та Америки саме біологічних засобів, так як цей напрямок вважається дуже перспективним [170].

Експресія білків у *E.coli* часто залишається кращим вибором для їх напрацювання з ряду причин: ціна культуральних середовищ невисока, швидкий ріст культури та можливе отримання великої кількості бактеріальної біомаси з високим вмістом білка. Більш того, бактеріальна система експресії на основі *E.coli* широко вивчена, генетика *E.coli* добре відома, кишкова паличка легко піддається генетичним маніпуляціям [157]. Тому *E.coli* залишається домінуючою системою експресії для виробництва великої кількості активних фармацевтичних інгредієнтів, що використовуються в біофармацевтичних препаратах. За даними консультантів технологій BioProcess, у 2010 році загальне виробництво чистих білків як активних фармацевтичних інгредієнтів в біофармацевтиці склало 26,4 тонни. З них 68% були вироблені в бактеріальних

системах і 32% в системах ссавців [155]. Отже бактеріальні системи є основним вибором в галузі біотехнології для великих масштабів виробництва малих рекомбінантних білків, які не потребують посттрансляційних модифікацій [156].

Технології терапії на основі білків вперше були розроблені лише кілька десятиліть тому, але зараз домінують серед фармацевтичних продаж [162]. Це клас лікарських препаратів, який є основним компонентом сучасних фармакотерапій і включає деякі найдорожчі препарати на ринку. Одним із таких також є ЕМАР II, який коштує близько 3000 доларів за 1 мг. Білкові терапевтичні засоби не можуть бути повністю синтезовані хімічним процесом і їх в багатьох випадках потрібно отримувати в живих клітинах, або організмах [171]. Отже як вибір клітинних ліній, в тому числі і бактеріальних, для експресії білків, так і їх походження та умови культивування можуть впливати на стан та характеристики кінцевого продукту [172].

Розроблена та запропонована нами вітчизняна генно-інженерна технологія отримання рекомбінатного білка ЕМАР II в бактеріальній системі *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE дозволяє отримувати близько 70 мг цільового продукту з 1 л бактеріальної культури. В ході роботи було оптимізовано бактеріальну експресію рекомбінатного цитокіну ЕМАР II за таким показником як час експресії бактеріальної культури до індукції. Оптимальним виявився час експресії бактеріальної культури *E. coli* BL21(DE3)pLysE 2 год, що припадає на логарифмічну фазу росту культури, коли бактеріальні клітини активно діляться. Оптимізацію експресії рекомбінатного білка ЕМАР II оцінювали і за таким показником як кількість доданого індуктора білкового синтезу IPTG(ізопропілтіоґалактопіранозид) до культурального середовища. Оптимальною виявилась концентрація 1,25 мМ. При цій концентрації IPTG спостерігали найвищий рівень експресії цільового продукту. Оптимальним часом експресії бактеріальної культури *E.coli* після додавання індуктора встановлено 4,5 години. Середовище, культивування на якому бактеріальної

культури *E.coli BL21(DE3)pLysE* призводило до найвищого виходу рекомбінатного білка ЕМАР ІІ було мінімальне середовище А. Це пояснюється вмістом в цьому середовищі мікроелементів та наявністю достатньої кількості солей.

На наступному етапі досліджень було запропоновано вибрати в якості ліганда і стабілізатора рекомбінатного цитокіна ЕМАР ІІ декстран 70, оскільки він давно успішно застосовується в фармакологічній практиці і його профіль безпеки та токсичність добре відомі [177, 178, 127]. При підборі стабілізатора та ліганда для цитокіна ЕМАР ІІ було досліджено такі ліганди як β -циклодекстрин та декстран 70. На основі цих досліджень були запатентовані відповідні патенти на корисні моделі. Виходячи з результатів попередньої роботи, для подальших досліджень було вирішено обрати декстран 70. Використання білкових стабілізаторів є загальною стратегією для мінімізації агрегації білків. Значне пом'якшення агрегації білка може бути досягнуто шляхом посилення конформаційної стабільності [179, 180], колоїдної стабільності або розчинності [88, 181]. Цукри – одні із широко використовуваних класів білкових стабілізаторів, що запобігають агрегації білка [182, 183, 184]. У зв'язку з цим було проведено ряд досліджень по визначенню оптимальних концентрацій для утворення стабільного комплексу білок : ліганд декстран 70. Методами флуоресцентної спектроскопії встановили і розраховали константу дисоціації ЕМАР ІІ з декстраном 70, що становить $1,97 \pm 0.17 \mu\text{M}$. Стехіометрія зв'язування декстрана 70 з білком становить близько 1:1, що підтверджує формування специфічного комплексу. При додаванні декстрану 70 в розчин білка спостерігали зниження інтенсивності флуоресценції до утворення комплексу. Паралельно з цими експериментами проводили молекулярний докінг комплексу ЕМАР ІІ з декстраном 70, щоб виявити можливі сайти зв'язування ліганду з білком і підтвердити формування стійкого комплексу. В результаті комп'ютерного моделювання докінгу встановлено, що зв'язування декстрана з ЕМАР ІІ відбувається в “кишені” на

поверхні білка, де локалізований Trp125. Зв'язування декстрану з ЕМАР II призводить до блокування локальних конформаційних переходів в оточенні Trp125, внаслідок чого відбувається стабілізація білка у розчині. Аналіз структури комплексів декстрана з білками показав, що афінність зв'язування декстрана (ΔG_{free}) з ЕМАР II становить -6.4 ккал/моль. Результати по розрахунку енергії зв'язування добре корелюють з експериментальними даними по флуоресценції, що вказує на достовірність комп'ютерного моделювання.

Наступним кроком дисертаційної роботи було дослідження стабільності утвореного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 при підвищенні температури. При реєстрації спектру флуоресценції ЕМАР II в залежності від температури в діапазоні $23 - 65$ °C виявлено зсув максимуму флуоресценції від 334 до 345 нм. Такий зсув відповідає максимуму флуоресценції відповідає максимуму флуоресценції триптофану в денатурованих білках. Температура локального конформаційного переходу в ЕМАР II становить 43 ± 1 °C. При утворенні комплексу з декстраном 70 локальний конформаційний перехід в оточенні Trp125 спостерігається при 49 ± 1 °C, що свідчить про стабілізацію структури ЕМАР II у комплексі. Отриманий комплекс є більш стабільним до дії високих температур порівняно з вільним білком ЕМАР II.

Агрегація білка може спостерігатися на всіх стадіях виробничих процесів, таких як експресія білка [181], очистка білка [84], створення препарату [182], [86], ліофілізація [183] та зберігання [184]. Агрегація білка також може відбуватися під час [185] або після [186] введення білкових продуктів в практику. Показано, що агрегація білків асоціюється з амілоїдними захворюваннями [187], процесами старіння [188] та посиленою цитотоксичністю [189]. Агрегація білка в цілому може розглядатися як ряд послідовних і паралельних подій, починаючи з внутрішніх структурних змін у деяких випадках, і обов'язково за участі білок-білкових взаємодій на одному з рівнів, що призводить спочатку до утворення димеру або олігомеру білка,

подальшого його агрегатного росту або полімеризації, і, врешті-решт, утворення неподільних і видимих частинок через обмежену розчинність та / або осідання.

Оскільки агрегація терапевтичних білків на сьогодні є дуже гострою проблемою, було досліджено агрегаційні властивості цитокіна ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 при підвищенні температури методом динамічного розсіювання світла.

Динамічне розсіювання світла (DLS) - це важливий експериментальний метод, що широко використовується в фізиці, хімії, біології та інших областях науки, в тому числі і біофармацевтичній промисловості [190]. Знання розміру, форми та морфології частинок має велике значення при розробці нових фармацевтичних препаратів на основі білків. Його застосовують у фізиці, хімії, біології та інших областях науки. Цей перспективний метод дозволяє без внесення зовнішніх впливових чинників отримувати інформацію про розподіл часток по розмірам в полідисперсних розчинах, якими і є біологічні рідини [191]. Унікальність методу ДСР полягає в тому, що він може реєструвати утворення макромолекулярних комплексів в складних біологічних системах, не вдаючись до фракціонування або будь-яких інших процедур, які порушують нативні умови комплексоутворення, що дозволяє отримувати більш достовірну інформацію [192]. Радикальне збільшення динамічного світлорозсіювання зі збільшенням лінійних розмірів макромолекулярних утворень в поєднанні з можливістю оцінювати їх реальні розміри, дозволяє реєструвати та ідентифікувати утворення комплексів різними компонентами біологічних рідин, навіть коли їх кількість дуже невелика [193]. Метод динамічного розсіювання світла має кілька переваг: тривалість експерименту невелика, скромні затрати на його проведення, можливість аналізу даних, що містять широкий діапазон розподілу для частинок різних молекулярних мас. Метод динамічного розсіювання світла заснований на аналізі спектру розсіяного лазерного випромінювання на досліджуваному зразку. Після взаємодії лазерного променя

з досліджуваним зразком в розсіяному світлі є інформація про частки, на яких розсіялося лазерне випромінювання. Використовуючи теорію про те, як розсіюється світло, з аналізу розсіяного світла можна отримати інформацію про розмір, форму, розподіл частинок за розмірами та коефіцієнт дифузії. Метод є безконтактним [194] і дозволяє вимірювати розміри наночастинок від 0,5-1 нм до 5-6 мікрон.

Нами встановлено, що відбувається значне підвищення гідродинамічного діаметру часток вільного цитокіна у розчині. В той же час з підвищенням температури розмір частинок комплексу ЕМАР II з декстраном 70 не змінюються і така тенденція зберігається до температури 55 °С. Ці дані свідчать про те, що ЕМАР II у комплексі з декстраном 70 досить стабільний і не руйнується при високих температурах, а також що полісахарид декстран 70 стабілізує білкову глобулу ЕМАР II та перешкоджає процесу агрегації.

Типи взаємодій, що дають поштовх до початку процесів агрегації (олігомеризації) білка можуть включати електростатичні білок - білкові взаємодії, гідрофобні взаємодії [186, 199, 200], водневі зв'язки [201, 202] та/або Ван дер Ваальсові сили [199]. Білок-білкові взаємодії, як правило, залежать від концентрації. Збільшення концентрації білка суттєво зменшує середню міжбілкову відстань, ефективно "скупчуючи" білки один з одним, і сприяє асоціації мономерів в олігомери або кластери [200]. З іншого боку, агрегація деяких білків не залежить від концентрації [205, 206]. У цих випадках агрегація білків, ймовірно, обумовлена розгортанням білків, що сприяє їх взаємодії. Коли білкові агрегати збільшуються в розмірах, вони можуть з часом стати нерозчинними морфологічно різними частинками. Первинна послідовність і відносна кількість гідрофобних амінокислот білка потенційно можуть сильно впливати на швидкість агрегації та стабільність агрегатів [207, 193, 208]. Гідрофобні амінокислоти можуть утворювати схильні до агрегації ділянки в структурі білків або послідовності для утворення агрегату [209, 210]. Однак тенденцію до агрегації білка контролюють не тільки схильні до агрегації

пептидні послідовності. На агрегацію білка впливає температура, яка діє на ряд властивостей білка, зачіпаючи зокрема швидкість дифузії білка, білок-білкові взаємодії, розчинність білків/агрегатів, конформаційну стабільність та хімічну деградацію. Підвищення температури може прискорити процес агрегації білка також за рахунок збільшення кількості частково розгорнутих молекул білка [105, 211, 185].

В нашій роботі згідно результатів молекулярного докінгу та комп'ютерного моделювання показано, що рушійною силою в утворенні агрегатів білка ЕМАР II є гідрофобні взаємодії. При агрегації неструктурована петля ³⁴DVGEIAPR⁴¹ в амінокислотній послідовності молекули ЕМАР II взаємодіє з гідрофобною триптофаною “кишенею” на поверхні іншої молекули білка (рис. 3.11). Ця взаємодія між петлею ³⁴DVGEIAPR⁴¹ і амінокислотним оточенням триптофанового залишка двох цитокінів має гідрофобний характер і забезпечує достатній рівень енергії зв'язування між ними. Поступова взаємодія багатьох молекул ЕМАР II призводить до їх агрегації, яка значно збільшується при високих температурних станах.

Ліофілізація білкових препаратів є важливим інструментом стабілізації структури білків і набуває все більшого значення для фармацевтичного розвитку [208]. В ході виконання даної роботи було заліофілізовано першу партію комплексу ЕМАР II з декстраном 70 та запатентовано заявкою на корисну модель (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Ліофілізований наноккомпозитний комплекс ЕМАР ІІ з декстраном 70.

Важливе занепокоєння, яке стосується розробки та впровадження білкових препаратів - це ризик утворення антитіл до препаратів. Тому оцінка імуногенності є невід'ємною частиною розвитку, ліцензування та використання цього класу продукції [90]. Ендотоксин - тип пірогену, який можна знайти в грамнегативних бактеріях. Ліпополісахариди (ЛПС, ендотоксин) - складні та незамінні компоненти зовнішньої мембрани більшості грамнегативних бактерій. Вони представляють стимули для багатьох біологічних ефектів з патофізіологічним характером [209]. Ендотоксин може формувати стабільну взаємодію з іншими біомолекулами, тим самим ускладнюючи його видалення, особливо під час виробництва біофармацевтичних препаратів. Високочутливе та точне виявлення ендотоксинів є ключовим фактором у розробці біофармацевтичних препаратів, отриманих із грамнегативних бактерій. Механізм пірогенної дії бактеріальних ендотоксинів полягає у зв'язуванні цих ендотоксинів з білками, які циркулюють у крові та зв'язуванні з CD 14-рецепторами лейкоцитів, макрофагів, моноцитів, ендотеліальних та інших типів клітин. Активовані ліпополісахаридзв'язуючим білковим комплексом

мононуклеарні фагоцити продукують фактор некрозу пухлин, який, в свою чергу, активує синтез інтерлейкіну 1 β . Вивільнення бактеріальних ендотоксинів запускає цитокінний каскад реакцій та підвищує ендотеліальну адгезію для лейкоцитів. Бактеріальні ендотоксини володіють низкою небезпечних для організму людини та тварин ефектів: лихоманка з проявами септицемії, тромбоцитопенії та еритроцитозу, метаболічні порушення, ендотоксичний шок, анафілактичний шок при повторному введенні. Тому контроль за забрудненням ендотоксином ін'єкційних препаратів має вирішальне значення [210]. Стерильність та апірогенність є основними біологічними показниками якості лікарських засобів. При чому стерильність не виключає апірогенності. Саме тому контролю пірогенності лікарських засобів приділяється велика увага.

Оскільки виділення ЕМАР II проводиться в бактеріальній системі грамнегативної *E. coli*, важливим етапом було визначення вмісту ендотоксинів у нанокompatитному комплексі ЕМАР II з декстраном 70. В даний час більшість дослідників покладаються на звичайний метод виявлення ендотоксинів на основі ЛАЛ-тесту (*Limulus amoebocyte lysate test*) [211]. Цей тест дозволяє проводити тестування на ендотоксини *in vitro* і замінити тести на тваринах, наприклад, використання термічної реакції кроликів для оцінки пірогенності тестових зразків [163]. ЛАЛ реакція - це багатоступінчаста ферментативна реакція, яка ініціюється шляхом додавання рідини, що цікавить, у розчин ЛАЛ-аналізу у співвідношенні 1:1 [212]. Оскільки високий вміст ендотоксинів може стимулювати секрецію фактора некрозу пухлин [213], нами встановлено, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 містить допустиму для фармацевтичних препаратів кількість ендотоксину. Тому можна вважати, що мізерна кількість ендотоксину в комплексі не впливає на продукцію фактора некрозу пухлин у культурі клітин.

Під час біомедичних досліджень властивостей нанокompatитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 було встановлено, що нанокompatитний

комплекс не втрачає властивостей, які має чистий білок ЕМАР II. Зокрема, при дослідженні протипухлинної активності комплексу на трансплантовані мишам ксенографти пухлин передміхурової залози людини встановлено сповільнення росту пухлин на 71-77 % при використанні ліофілізованого нанокompatитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у концентрації 10 мкг/кг. Така ж ситуація спостерігалася і при введенні чистого цитокіна ЕМАР II. У 58 % ксенографтів спостерігали повний регрес пухлин. Ефекти були близькі до посткастраційних. Гістологічні дослідження показали, що під впливом як цитокіну ЕМАР II, так і його комплексу з декстраном 70 в дозі 10 мкг/кг спостерігаються виражені деструктивні зміни. В ксенотрансплантатах збільшувалася кількість епітеліальних клітин з гіперхромними ядрами та ущільненою цитоплазмою порівняно з контролем. Приведені дані можуть представляти практичну цінність узв'язку з поширеністю раку передміхурової залози. В цілому, як показують результати наших досліджень, комплекс ЕМАР II з декстраном 70 має таку ж протипухлинну активність відносно ксенографтів аденокарциноми простати людини у мишей як і чистий цитокін ЕМАР II.

В результаті проведених досліджень встановлено, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 здатен викликати продукцію TNF- α при досить низьких концентраціях (1,6 – 25,0 μ г/мл). Продукції інтерферону під впливом комплексу ЕМАР II виявлено не було. ЕМАР II вперше був виявлений як один із факторів, що здатен модулювати відповідь ендотеліальних клітин на дію фактору некрозу пухлин (TNF- α). ЕМАР II сенсibiliзує пухлину до руйнуючої дії фактору некрозу пухлин. В літературних джерелах показано, що після обробки пухлин ЕМАР II вона стає чутливою до терапії фактора некрозу пухлин альфа (TNF) [10]. Фактор некрозу пухлини- α , безперечно, є одним з найбільш ефективних протипухлинних клітинних факторів завдяки своїй сильній здатності викликати селективне знищення та пошкодження неоваскуляризації пухлини. Фактор некрозу пухлин чинить плейотропну дію при запаленні, проліферації клітин, їх диференціюванні та при апоптозі. Фактор

некрозу пухлин діє через два різних рецептора, TNF-R1 і TNF-R2, з TNF-R1 є членом сімейства рецепторів смерті, які містять домен смерті DD. Однак сам по собі фактор некрозу пухлин є досить токсичним і тому не застосовується для системної терапії [62]. В той же час, при обробці пухлин ЕМАР II стимулюється продукція фактора некрозу пухлин і пухлина стає чутливою до TNF- α . Ця здатність підтверджена нами і для створеного наноконструктивного комплексу ЕМАР II з декстраном 70. Отже, використання комплексу ЕМАР II з декстраном 70 може бути важливим при розробці препаратів для терапії різноманітних новоутворень за рахунок посилення впливу TNF- α на пухлини. Здатність впливати на проліферацію клітин комплексу ЕМАР II з декстраном 70 визначали на культурах клітин L929 та PST. Для оцінки токсичності речовин використовували показники МВК (максимально витримувана концентрація) та СС50. Доза СС50 – цитотоксична концентрація препарату, що призводить до 50% деструкції моношару клітин порівняно з контролем. МВК та СС50 на обох клітинних лініях для препарату ЕМАР II збігаються та становлять 25,00 та 50,00 $\mu\text{g}/\text{ml}$, відповідно.

В ході роботи було також досліджено здатність наноконструктивного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 викликати апоптоз клітин *in vitro*. Цитологічний аналіз культивованих клітин LNCaP (клітини раку простати людини лінії LNCaP - AmericanTypeCultureCollection) свідчить про цитотоксичний ефект ЕМАР II, який має дозозалежний характер і відбувається шляхом посилення апоптозу клітин LNCaP. Найбільш виражений апоптоз клітин культури клітин LNCaP спостерігався при обробці клітин в концентрації 10^{-3} mg/ml . Інші дослідники теж відмічали залежні від дози ефекти ЕМАР II на пухлини. Було показано, що при високих концентраціях цитокін проявляє антиангіогенний вплив та має ряд інших властивостей, що протидіють росту пухлинних тканин, таких як прокоагулятивна активність та посилення апоптозу [54]. Тоді як при низьких концентраціях спостерігається підвищення

лише прокоагулятивної активності. Проведені нами дослідження підтвердили ці твердження.

Оскільки токсичність речовин для медичного застосування є важливою характеристикою для впровадження в клінічну практику, нами були проведені дослідження з визначення токсичного впливу комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на тварин. На лабораторних мишах лінії Balb/c було показано, що вказаний комплекс не має вираженої токсичної дії на організм тварин. Ці дослідження відкривають можливості для подальших біомедичних та структурно-функціональних досліджень нанокмпозитного комплексу ЕМАР II з декстраном 70 для застосування в перспективі в біомедицині.

Отже, підводячи підсумки проведеної роботи, можна зробити висновки про те, що нами оптимізовано бактеріальну експресію рекомбінатного цитокіну ЕМАР II і що отриманий нами нанокмпозитний комплекс ЕМАР II з декстраном 70 володіє цитокіновою активністю, протипухлинною активністю, впливає на апоптоз клітин та їх проліферацію, має підвищену стійкість до утворення агрегатів при підвищенні температури, містить допустиму кількість ендотоксинів. Ці висновки дають змогу в подальшому проводити доклінічні випробування вказаного комплексу.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі вперше створено нанокмпозитний комплекс ендотеліального та моноцитаривуючого поліпептида II (EMAP II) з декстраном 70. Визначено оптимальні умови експресії рекомбінатного білка EMAP II в бактеріальній системі експресії. Запропонований можливий механізм агрегації цитокіна EMAP II та шляхи її запобігання в комплексі з декстраном 70. Декстран 70 стабілізує структуру цитокіна EMAP II в комплексі. Проведено низку експериментів щодо встановлення властивостей нанокмпозитного комплексу EMAP II з декстраном 70.

1. Розроблена генноінженерна технологія отримання протипухлинного цитокіна EMAP II в препаративних кількостях. Оптимізовані умови експресії EMAP II та показано, що найбільший вихід рекомбінантного білка спостерігається при культивуванні культури *E.coliBL21(DE3)pLysE* на мінімальному поживному середовищі А, час інкубації культури після індукції 4,5 год., оптимальна концентрація індуктора IPTG в середовищі 1,25 мМ.

2. Показана стабілізація цитокіна EMAP II в комплексі з декстраном 70. Створено температурностабільний комплекс цитокіна EMAP II з декстраном 70. Стехіометрія комплексу 1:1, $K_d = 1,97 \pm 0,17 \mu\text{M}$. При утворенні комплексу з декстраном 70 середня температура локального конфірмаційного переходу в EMAP II підвищується з 43 °С до 49 °С.

3. Вивчено агрегаційні властивості цитокіна EMAP II методом світорозсіювання. Показано, що полісахарид декстран 70 перешкоджає процесам агрегації білка в діапазоні температур 20 – 55 °С.

4. Тест на пірогенність показав, що комплекс EMAP II з декстраном 70 містить менше, ніж 0,5 МОЕ / кг, але більше 0,03 МОЕ / кг ліпополісахаридів.

5. Показано, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 в концентраціях 1,6 - 25 мкг/мл стимулює продукцію фактора некрозу пухлин та не впливає на продукцію інтерферону у культурі клітин.

6. Дослідження токсичності отриманого комплексу ЕМАР II з декстраном 70 на тваринах в концентраціях 300 мкг/кг, 1000 мкг/кг та 10000 мкг/кг показали, що він не викликає летального ефекту.

7. Проведено порівняння протипухлинної активності ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 на ксенографтах аденокарциноми простати людини у мишей в дозі 10 мкг/кг та показано інгібування росту пухлин на 71% та 77% відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. S. Quevillon, F. Agou, J. C. Robinson, and M. Mirande, “The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 51, pp. 32573–32579, 1997, doi: 10.1074/jbc.272.51.32573.
2. C. L. Wolfe, J. A. Warrington, S. Davis, S. Green, and M. T. Norcum, “Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII,” *Protein Sci.*, vol. 12, no. 10, pp. 2282–2290, 2009, doi: 10.1110/ps.03147903.
3. F. R. Zhang and M. A. Schwarz, “Pro-EMAP II is not primarily cleaved by caspase-3 and -7,” *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 282, no. 6 26-6, pp. 1239–1244, 2002, doi: 10.1152/ajplung.00141.2001.
4. A. Kornelyuk, M. P. R. Tas, A. Dubrovsky, and J. C. Murray, “Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase,” *Biopolym. Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 168–172, 1999, doi: 10.7124/bc.000516.
5. J. L. Thompson, J. A. Ryan, M. L. Barr, B. Franc, V. A. Starnes, and M. A. Schwarz, “Potential role for antiangiogenic proteins in the myocardial infarction repair process,” *J. Surg. Res.*, vol. 116, no. 1, pp. 156–164, 2004, doi: 10.1016/j.jss.2003.06.001.
6. J. M. Han, H. Myung, and S. Kim, “Antitumor activity and pharmacokinetic properties of ARS-interacting multi-functional protein 1 (AIMP1/p43),” *Cancer Lett.*, vol. 287, no. 2, pp. 157–164, 2010, doi: 10.1016/j.canlet.2009.06.005.
7. J. Clifford Murray *et al.*, “Immunohistochemical analysis of endothelial-monocyte-activating polypeptide-II expression in vivo,” *Am. J. Pathol.*, 2000, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64843-2.
8. A. C. Berger *et al.*, “Tumour necrosis factor receptor i (p55) is upregulated on endothelial cells by exposure to the tumour-derived cytokine endothelial

- monocyte- activating polypeptide ii (EMAP-II),” *Cytokine*, vol. 12, no. 7, pp. 992–1000, Jul. 2000, doi: 10.1006/CYTO.2000.0687.
9. Z. Zhou, B. Sun, S. Huang, D. Yu, and X. Zhang, “Roles of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional proteins in physiology and cancer,” *Cell Death Dis.*, vol. 11, no. 7, 2020, doi: 10.1038/s41419-020-02794-2.
 10. M. Hofmann, M. Winzer, C. Weber, and H. Gieseler, “Prediction of Protein Aggregation in High Concentration Protein Solutions Utilizing Protein-Protein Interactions Determined by Low Volume Static Light Scattering,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 6, pp. 1819–1828, 2016, doi: 10.1016/j.xphs.2016.03.022.
 11. C. J. Roberts, “Protein aggregation and its impact on product quality,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 30, pp. 211–217, 2014, doi: 10.1016/j.copbio.2014.08.001.
 12. K. D. Ratanji, J. P. Derrick, R. J. Dearman, and I. Kimber, “Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation,” *J. Immunotoxicol.*, vol. 11, no. 2, pp. 99–109, 2014, doi: 10.3109/1547691X.2013.821564.
 13. S. C. Abeylath and M. M. Amiji, “Bioorganic & Medicinal Chemistry ‘ Click ’ synthesis of dextran macrostructures for combinatorial-designed self-assembled nanoparticles encapsulating diverse anticancer therapeutics,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 19, no. 21, pp. 6167–6173, 2011, doi: 10.1016/j.bmc.2011.09.024.
 14. F. Wu, Z. Zhou, J. Su, L. Wei, W. Yuan, and T. Jin, “Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins,” pp. 1–8, 2013.
 15. M. Hashida, “Mitomycin C-dextran conjugate : a novel high molecular weight pro-drug of mitomycin C,” no. 10 ml, pp. 30–34, 1980.
 16. G. Ramesh, A. G. Maclean, and M. T. Philipp, “Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation , Neurodegeneration , and Neuropathic Pain,” vol. 2013, 2013.
 17. A. Yoshimura, M. Ito, S. Chikuma, T. Akanuma, and H. Nakatsukasa, “Negative regulation of cytokine signaling in immunity,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, no. 7, 2018, doi: 10.1101/cshperspect.a028571.

18. J. Kaoss *et al.*, “ Endothelial Monocyte-activating Polypeptide II a novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol 269 (40), pp. 25106- 25119, 1992.
19. H. J. Schluesener, K. Seid, Y. Zhao, and R. Meyermann, “Localization of endothelial-monocyte-activating polypeptide II (EMAP II), a novel proinflammatory cytokine, to lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis, neuritis and uveitis: Expression by monocytes and activated microglial cells,” *Glia*, vol. 20, no. 4, pp. 365–372, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1098-1136(199708)20:4<365::AID-GLIA8>3.0.CO;2-4.
20. Y. G. Ko *et al.*, “A Cofactor of mRNA Synthetase, p43, Is Secreted to Up-regulate Proinflammatory Genes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 25, pp. 23028–23033, 2001, doi: 10.1074/jbc.M101544200.
21. U. E. Knies, S. Kröger, and M. Clauss, “Expression of EMAP II in the developing and adult mouse,” *Apoptosis*, vol. 5, no. 2, pp. 141–151, 2000, doi: 10.1023/A:1009632712876.
22. D. Warburton, M. Schwarz, D. Tefft, G. Flores-Delgado, K. D. Anderson, and W. V. Cardoso, “The molecular basis of lung morphogenesis,” *Mech. Dev.*, vol. 92, no. 1, pp. 55–81, 2000, doi: 10.1016/S0925-4773(99)00325-1.
23. J. Kao *et al.*, “Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial-monocyte activating polypeptide II,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 40, pp. 25106–25119, 1994.
24. “J. Biol. Chem.-1995-Frantz-20692-7.pdf.” .
25. M. Mirande, Y. Gache, D. Le Corre, and J. P. Waller, “Seven mammalian aminoacyl-tRNA synthetases co-purified as high molecular weight entities are associated within the same complex,” *EMBO J.*, vol. 1, no. 6, pp. 733–736, 1982, doi: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01238.x.
26. V. Shalak *et al.*, “Post-translation modification and degradation : the EMAPII Cytokine Is Released from the Mammalian Multisynthetase Complex after Cleavage of Its p43 / proEMAPII Component The EMAPII Cytokine Is

- Released from the Mammalian Multisynthetase Complex after Cle,” 2001, doi: 10.1074/jbc.M100489200.
27. S. Quevillon, F. Agou, J. Robinson, and M. Mirande, “The p43 Component of the Mammalian Multi-synthetase Complex Is Likely To Be the Precursor of the Endothelial Monocyte-activating Polypeptide II Cytokine *,” vol. 272, no. 51, pp. 32573–32579, 1997.
 28. S. Quevillon, J. C. Robinson, E. Berthonneau, M. Siatecka, and M. Mirande, “Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: Identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein,” *J. Mol. Biol.*, vol. 285, no. 1, pp. 183–195, 1999, doi: 10.1006/jmbi.1998.2316.
 29. H. C. Ahn, S. Kim, and B. J. Lee, “Solution structure and p43 binding of the p38 leucine zipper motif: Coiled-coil interactions mediate the association between p38 and p43,” *FEBS Lett.*, vol. 542, no. 1–3, pp. 119–124, 2003, doi: 10.1016/S0014-5793(03)00362-4.
 30. H. A. Behrendorf, M. Van De Craen, U. E. Knies, P. Vandenabeele, and M. Clauss, “The endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II) is a substrate for caspase-7,” *FEBS Lett.*, vol. 466, no. 1, pp. 143–147, 2000, doi: 10.1016/S0014-5793(99)01777-9.
 31. B. M. Tsai, M. Wang, M. Clauss, P. Sun, and D. R. Meldrum, “Endothelial monocyte-activating polypeptide II causes NOS-dependent pulmonary artery vasodilation: A novel effect for a proinflammatory cytokine,” *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 287, no. 4 56-4, 2004, doi: 10.1152/ajpregu.00248.2004.
 32. Renault L., Kerjan P., Pasqualato S., Menetrey J., Robinson J.C., Kawaguchi S., Vassilyev D.G., Yokoyama S., Mirande M., Cherfils J. Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry. *EMBO J.* 2001. Vol. 20. P. 570–578. doi: 10.1093/emboj/20.3.570
 33. M. P. Golinelli-Cohen, A. Zakrzewska, and M. Mirande, “Complementation of

- yeast Arc1p by the p43 component of the human multisynthetase complex does not require its association with yeast MetRS and GluRS,” *J. Mol. Biol.*, vol. 340, no. 1, pp. 15–27, 2004, doi: 10.1016/j.jmb.2004.04.040.
34. Deniziak M., Mirande, M. and Barciszewski, J. “Cloning and sequencing of cDNA encoding the rice methionyl-tRNA synthetase”. *Acta Biochim. Pol.*, 45(3):669-76, 1998.
 35. M. Kaminska, M. Deniziak, P. Kerjan, J. Barciszewski, and M. Mirande, “A recurrent general RNA binding domain appended to plant methionyl-tRNA synthetase acts as a cis-acting cofactor for aminoacylation,” *EMBO J.*, vol. 19, no. 24, pp. 6908–6917, 2000, doi: 10.1093/emboj/19.24.6908.
 36. S. G. Park *et al.*, “Precursor of pro-apoptotic cytokine modulates aminoacylation activity of tRNA synthetase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 24, pp. 16673–16676, 1999, doi: 10.1074/jbc.274.24.16673.
 37. M. Kordysh and A. Kornelyuk, “Conformational flexibility of cytokine-like C-module of tyrosyl-tRNA synthetase monitored by Trp144 intrinsic fluorescence,” *J. Fluoresc.*, vol. 16, no. 5, pp. 705–711, 2006, doi: 10.1007/s10895-006-0113-9.
 38. Т. О. Голобородько *et al.*, “Поліпепетид ЕМАР II гальмує ріст і тимулює апоптоз клітин лінії LNCaP раку проси людини,” т.16, №4, pp. 681–690, 2010.
 39. J. Ahn *et al.*, “AIMP1 downregulation restores chondrogenic characteristics of dedifferentiated/degenerated chondrocytes by enhancing TGF- β signal,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 2, pp. e2099-12, 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.17.
 40. T. E. Lans *et al.*, “Improved antitumor response to isolated limb perfusion with tumor necrosis factor after upregulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II in soft tissue sarcoma,” *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 9, no. 8, pp. 812–819, 2002, doi: 10.1245/ASO.2001.09.019.
 41. C. E. Fogarty and A. Bergmann, “The sound of silence: Signaling by apoptotic cells,” in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 114, pp. 241-265,

- 2015.
42. E. Kim *et al.*, “The Novel Cytokine p43 Induces IL-12 Production in Macrophages via NF- κ B Activation, Leading to Enhanced IFN- γ Production in CD4 + T Cells,” 2015, doi: 10.4049/jimmunol.176.1.256.
 43. M. R. Marvin *et al.*, “A novel tumor-derived mediator that sensitizes cytokine-resistant tumors to tumor necrosis factor,” *J. Surg. Res.*, vol. 63, no. 1, pp. 248–255, 1996, doi: 10.1006/jsre.1996.0256.
 44. S. Y. Chang, S. G. Park, S. Kim, and C. Y. Kang, “Interaction of the C-terminal domain of p43 and the α subunit of ATP synthase: Its functional implication in endothelial cell proliferation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 10, pp. 8388–8394, 2002, doi: 10.1074/jbc.M108792200.
 45. J. C. Murray *et al.*, “Colorectal Cancer Cells Induce Lymphocyte Apoptosis by an Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide-II-Dependent Mechanism,” 2014, doi: 10.4049/jimmunol.172.1.274.
 46. R. Van Horsen, J. A. P. Rens, and T. L. M. Ten Hagen, “Cytokine detection in cells and tissues: Complicated lessons from proEMAP/p43 and EMAP-II,” *Inflammation Research*. 2008, doi: 10.1007/s00011-007-7184-1.
 47. C. Murray and M. Tas, "Endothelial monocyte-activating polypeptide-II (EMAP-II): a novel inducer of lymphocyte apoptosis", *J of Leucocyte Biology* Vol 75 (5) pp. 772-776, doi:10.1189/jlb.1003487.
 48. H. Kwon *et al.*, “Identification of CD23 as a functional receptor for the proinflammatory cytokine AIMP1 / p43,” vol. 1, pp. 4620–4629, 2012, doi: 10.1242/jcs.108209.
 49. T. Kawai and S. Akira, “TLR signaling,” *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 5, pp. 816–825, 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401850.
 50. V. A. Polunovsky, C. H. Wendt, D. H. Ingbar, M. S. Peterson, and B. P. B., “Induction of endothelial cell apoptosis by TNF α ,” *Experimental Cell Research*, vol. 214. pp. 584–594, 1994.
 51. R. E. Schwarz, N. Awasthi, S. Konduri, L. Caldwell, D. Cafasso, and M. A.

- Schwarz, “Antitumor effects of EMAP II against pancreatic cancer through inhibition of fibronectin-dependent proliferation,” *Cancer Biol. Ther.*, 2010, doi: 10.4161/cbt.9.8.11265.
52. N. Awasthi, M. A. Schwarz, and R. E. Schwarz, “Enhancing cytotoxic agent activity in experimental pancreatic cancer through EMAP II combination therapy,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 68, no. 3, pp. 571–582, 2011, doi: 10.1007/s00280-010-1514-7.
53. N. Awasthi, M. A. Schwarz, V. Verma, C. Cappiello, and R. E. Schwarz, “Endothelial monocyte activating polypeptide II interferes with VEGF-induced proangiogenic signaling,” *Lab. Investig.*, vol. 89, no. 1, pp. 38–46, 2009, doi: 10.1038/labinvest.2008.106.
54. C. V. Lal and M. A. Schwarz, “Vascular mediators in chronic lung disease of infancy: Role of endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP II),” *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.*, 2014, doi: 10.1002/bdra.23234.
55. C. Yao *et al.*, “P43/pro-EMAPII: A Potential Biomarker for Discriminating Traumatic Versus Ischemic Brain Injury.”
56. A. G. Reznikov, L. V. Chaykovskaya, L. I. Polyakova, A. I. Kornelyuk, and V. N. Grygorenko, “Cooperative antitumor effect of endothelial-monocyte activating polypeptide II and flutamide on human prostate cancer xenografts,” *Exp. Oncol.*, vol. 33, no. 4, pp. 231–234, 2011.
57. Z. Li *et al.*, “Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II Suppresses the In Vitro Glioblastoma-Induced Angiogenesis by Inducing Autophagy,” *Front. Mol. Neurosci.*, 2017, doi: 10.3389/fnmol.2017.00208.
58. L. H. Guo, K. Trautmann, and H. J. Schluesener, “Expression of P2X4 receptor in rat C6 glioma by tumor-associated macrophages and activated microglia,” *J. Neuroimmunol.*, vol. 152, no. 1–2, pp. 67–72, 2004, doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.04.005.
59. R. Clarijs, L. Schalkwijk, D. J. Ruiter, and R. M. W. De Waal, “EMAP-II expression is associated with macrophage accumulation in primary uveal

- melanoma,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 5, pp. 1801–1806, 2003, doi: 10.1167/iovs.02-0624.
60. R. E. Schwarz, N. Awasthi, S. Konduri, D. Cafasso, and M. A. Schwarz, “EMAP II-based antiangiogenic-antiendothelial in vivo combination therapy of pancreatic cancer,” *Ann. Surg. Oncol.*, 2010, doi: 10.1245/s10434-009-0879-5.
 61. M. A. Schwarz *et al.*, “Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells,” *J. Exp. Med.*, vol. 190, no. 3, pp. 341–353, 1999, doi: 10.1084/jem.190.3.341.
 62. L. Crippa, A. Gasparri, A. Sacchi, E. Ferrero, F. Curnis, and A. Corti, “Synergistic damage of tumor vessels with ultra low-dose endothelial-monocyte activating polypeptide-II and neovasculature-targeted tumor necrosis factor- α ,” *Cancer Res.*, vol. 68, no. 4, pp. 1154–1161, 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2085.
 63. J. Zhang *et al.*, “Endothelial monocyte-activating polypeptide-II induces BNIP3-mediated mitophagy to enhance temozolomide cytotoxicity of glioma stem cells via down-regulating miR-24-3p,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, no. March, pp. 1–17, 2018, doi: 10.3389/fnmol.2018.00092.
 64. L. Chen *et al.*, “Mir-429 regulated by endothelial monocyte activating polypeptide-II (EMAP-II) influences blood-tumor barrier permeability by inhibiting the expressions of ZO-1, occludin and claudin-5,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, no. February, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3389/fnmol.2018.00035.
 65. G. Barnett *et al.*, “Prostate adenocarcinoma cells release the novel proinflammatory polypeptide EMAP-II in response to stress,” *Cancer Res.*, vol. 60, no. 11, pp. 2850–2857, 2000.
 66. G. Montrucchio *et al.*, “Tumor necrosis factor α -induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis,” *J. Exp. Med.*, vol. 180, no. 1, pp. 377–382, 1994, doi: 10.1084/jem.180.1.377.

67. R. E. Schwarz and M. A. Schwarz, "In vivo therapy of local tumor progression by targeting vascular endothelium with EMAP-II," *J. Surg. Res.*, vol. 120, no. 1, pp. 64–72, 2004, doi: 10.1016/j.jss.2003.10.005.
68. T. E. Lans, R. Van Horssen, A. M. M. Eggermont, and T. L. M. Ten Hagen, "Involvement of endothelial monocyte activating polypeptide II in tumor necrosis factor-alpha-based anti-cancer therapy," *Anticancer Res.*, vol. 24, no. 4, pp. 2243–2248, 2004.
69. Y. S. Lee, J. M. Han, T. Kang, Y. I. Park, H. M. Kim, and S. Kim, "Antitumor activity of the novel human cytokine AIMP1 in an in vivo tumor model," *Mol. Cells*, vol. 21, no. 2, pp. 213–217, 2006.
70. M. A. Schwarz, J. Thornton, H. Xu, N. Awasthi, and R. E. Schwarz, "Cell proliferation and migration are modulated by Cdk-1-phosphorylated Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II," *PLoS One*, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033101.
71. U. E. Knies *et al.*, "Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis," 1998. [Online]. Available: www.pnas.org.
72. J. C. Murray *et al.*, "a novel inducer of lymphocyte apoptosis in Jurkat T cells and mitogen-activated peripheral," 2004, doi: 10.1189/jlb.1003487.1.
73. S. Matschurat *et al.*, "Regulation of EMAP II by hypoxia," *Am. J. Pathol.*, vol. 162, no. 1, pp. 93–103, 2003, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63801-1.
74. Z. Li *et al.*, "Low-Dose Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide-II Increases Blood-Tumor Barrier Permeability by Activating the RhoA/ROCK/PI3K Signaling Pathway," *J. Mol. Neurosci.*, vol. 59, no. 2, pp. 193–202, 2016, doi: 10.1007/s12031-015-0668-5.
75. D. Liang, M. M. Halpert, V. Konduri, and W. K. Decker, "Stepping out of the Cytosol: AIMP1/p43 Potentiates the Link between Innate and Adaptive Immunity," *Int. Rev. Immunol.*, vol. 34, no. 5, pp. 367–381, 2015, doi: 10.3109/08830185.2015.1077829.
76. S. G. Park *et al.*, "Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-

- associating factor, p43, in angiogenesis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 47, pp. 45243–45248, 2002, doi: 10.1074/jbc.M207934200.
77. M. Zheng, M. A. Schwarz, S. Lee, U. Kumaraguru, and B. T. Rouse, “Control of stromal keratitis by inhibition of neovascularization,” *Am. J. Pathol.*, vol. 159, no. 3, pp. 1021–1029, 2001, doi: 10.1016/S0002-9440(10)61777-4.
78. A. C. Mirando, C. S. Francklyn, and K. M. Lounsbury, “Regulation of angiogenesis by aminoacyl-trna synthetases,” *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, doi: 10.3390/ijms151223725.
79. S. Chelvanambi *et al.*, “HIV-Nef protein persists in the lungs of aviremic patients with HIV and induces endothelial cell death,” *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 60, no. 3, pp. 357–366, 2019, doi: 10.1165/rcmb.2018-0089OC.
80. Q. J. Baca, B. Leader, and D. E. Golan, “Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification,” *Nat Rev Drug Discov*, 7(1):21-39, 2008, doi: 10.1038/nrd2399.
81. J. Philo and T. Arakawa, “Mechanisms of Protein Aggregation,” *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 10, no. 4, pp. 348–351, 2009, doi: 10.2174/138920109788488932.
82. M. Mir *et al.*, “Nanotechnology : from In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery,” *Nanoscale Res Lett*, 2017, doi: 10.1186/s11671-017-2249-8.
83. R. Chaudhuri, Y. Cheng, C. R. Middaugh, and D. B. Volkin, “Mini-Review High-Throughput Biophysical Analysis of Protein Therapeutics to Examine Interrelationships Between Aggregate Formation and Conformational Stability,” *The AAPS Journal*, vol. 16, no. 1, pp. 48–64, 2014, doi: 10.1208/s12248-013-9539-6.
84. T. Arakawa, D. Ejima, and T. Akuta, “Protein aggregation under high concentration/density state during chromatographic and ultrafiltration processes,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 95, pp. 1153–1158, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.005.
85. W. Wang and C. J. Roberts, “Protein aggregation – Mechanisms, detection, and

- control,” *Int. J. Pharm.*, vol. 550, no. 1–2, pp. 251–268, 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.043.
86. D. Psimadas, P. Georgoulas, V. Valotassiou, and G. Loudos, “Molecular Nanomedicine Towards Cancer :,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 7, pp. 2271–2280, 2012, doi: 10.1002/jps.
87. M. D. Bond *et al.*, “Evaluation of a Dual-Wavelength Size Exclusion HPLC Method With Improved Sensitivity to Detect Protein Aggregates and Its Use to Better Characterize Degradation Pathways of an IgG1 Monoclonal Antibody,” *J Pharm Sci*, vol. 99, no. 6, pp. 2582–2597, 2010, doi: 10.1002/jps.
88. R. Spycher, P. Dalmonte, D. B. Volkin, K. Wuchner, and J. Bu, “Development of a Microflow Digital Imaging Assay to Characterize Protein Particulates During Storage of a High Concentration IgG1 Monoclonal Antibody Formulation,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no. 8, 2010, doi: 10.1002/jps.
89. L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. S. Langer, and O. C. Farokhzad, “Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments,” *Clin Pharmacol Ther*, vol. 83, no. 5, pp. 761–769, 2008, doi: 10.1038/sj.clp.
90. G. Shankar, E. Shores, C. Wagner, and A. Mire-Sluis, “Scientific and regulatory considerations on the immunogenicity of biologics,” *Trends Biotechnol.*, vol. 24, no. 6, pp. 274–280, 2006, doi: 10.1016/j.tibtech.2006.04.001.
91. A. S. De Groot and D. W. Scott, “Immunogenicity of protein therapeutics,” *Trends Immunol.*, vol. 28, no. 11, pp. 482–490, 2007, doi: 10.1016/j.it.2007.07.011.
92. F. A. Garcia and M. W. Vandiver, “Throughput optimization of continuous biopharmaceutical manufacturing facilities,” *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 71, no. 3, pp. 189–205, 2017, doi: 10.5731/pdajpst.2016.006882.
93. N. Jenkins, L. Murphy, and R. Tyther, “Post-translational modifications of recombinant proteins: Significance for biopharmaceuticals,” *Mol. Biotechnol.*,

- vol. 39, no. 2, pp. 113–118, 2008, doi: 10.1007/s12033-008-9049-4.
94. A. Tosstorff, H. Svilenov, G. H. J. Peters, P. Harris, and G. Winter, “Structure-based discovery of a new protein-aggregation breaking excipient,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 144, no. April, pp. 207–216, 2019, doi: 10.1016/j.ejpb.2019.09.010.
 95. M. E. Davis, Z. G. Chen, and D. M. Shin, “Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer,” vol. 7, no. September, pp. 771–782, 2008, doi: 10.1038/nrd2614.
 96. <https://www.dextran.com/application-areas/oral-application>
 97. E. Van Der Pol, A. G. Hoekstra, A. Sturk, C. Otto, T. G. Van Leeuwen, and R. Nieuwland, “Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 8, no. 12, pp. 2596–2607, 2010, doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04074.x.
 98. K. C. Weng, J. L. Kanter, W. H. Robinson, and C. W. Frank, “Fluid supported lipid bilayers containing monosialoganglioside GM1: A QCM-D and FRAP study,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 50, no. 1, pp. 76–84, 2006, doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.010.
 99. T. Waldron, P. Murphy, “Stabilization of proteins by ligand binding: application to drug screening and determination of unfolding energetics”, *Biochemistry*, 6;42(17):5058-64, 2003. doi: 10.1021/bi034212v.
 100. W. Wang, “Advanced protein formulations,” *Protein Sci.*, vol. 24, no. 7, pp. 1031–1039, 2015, doi: 10.1002/pro.2684.
 101. A. Velazquez-Campoy and E. Freire, “ITC in the post-genomic era...? Priceless,” *Biophys. Chem.*, vol. 115, no. 2-3 SPEC. ISS., pp. 115–124, 2005, doi: 10.1016/j.bpc.2004.12.015.
 102. P. Adhikari *et al.*, “Mutational analysis at Asn-41 in peanut agglutinin. A residue critical for the binding of the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 44, pp. 40734–40739, 2001, doi: 10.1074/jbc.M103040200.

103. H. Zhang, H. Zhang, C. Qu, L. Bai, and L. Ding, "Fluorimetric and mass spectrometric study of the interaction of β -cyclodextrin and osthole," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 68, no. 3, pp. 474–477, 2007, doi: 10.1016/j.saa.2006.12.013.
104. Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, and Z. Zhang, "Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 15, pp. 1650–1662, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.09.001.
105. T. M. A. Gronewold, "Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: Recent trends and challenges," *Anal. Chim. Acta*, vol. 603, no. 2, pp. 119–128, 2007, doi: 10.1016/j.aca.2007.09.056.
106. K. I. Izutsu, "Applications of freezing and freeze-drying in pharmaceutical formulations," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1081, pp. 371–383, 2018, doi: 10.1007/978-981-13-1244-1_20.
107. G. A. Reed, "Stability of drugs, drug candidates, and metabolites in blood and plasma," *Curr. Protoc. Pharmacol.*, vol. 2016, no. December, pp. 7.6.1-7.6.12, 2016, doi: 10.1002/cpph.16.
108. C. Mueller, U. Altenburger, and S. Mohl, "Challenges for the pharmaceutical technical development of protein coformulations," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 70, no. 5, pp. 666–674, 2018, doi: 10.1111/jphp.12731.
109. P. Cimmerman *et al.*, "A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands," *Biophys. J.*, vol. 95, no. 7, pp. 3222–3231, 2008, doi: 10.1529/biophysj.108.134973.
110. R. K. Jain and T. Stylianopoulos, "REviEWS Delivering nanomedicine to solid tumors," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 7, no. 11, pp. 653–664, 2010, doi: 10.1038/nrclinonc.2010.139.
111. Kenji Sasahara, Peter McPhie, Allen P Minton, "Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding," *J Mol Biol.*, vol. 326, no. 4, pp.1227-1237, 2003, doi: 10.1016/s0022-2836(02)01443-2.

112. M. Naessens, A. Cerdobbel, W. Soetaert, and E. J. Vandamme, “Leuconostoc dextransucrase and dextran : production , properties and applications,” *J. of Chem. Technol. and Biotech.*, vol. 80, no.8, pp. 845–860, 2005, doi: 10.1002/jctb.1322.
113. C. Haeuser, P. Goldbach, J. Huwyler, W. Friess, and A. Allmendinger, “Impact of dextran on thermal properties, product quality attributes, and monoclonal antibody stability in freeze-dried formulations,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 147, pp. 45–56, 2020, doi: 10.1016/j.ejpb.2019.12.010.
114. I. Wasiak, A. Kulikowska, and M. Janczewska, “Dextran Nanoparticle Synthesis and Properties,” *PLOS ONE*, pp. 1–17, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0146237.
115. E. M. Bachelder, T. T. Beaudette, K. E. Broaders, J. Dashe, and J. M. J. Fre, “Acetal-Derivatized Dextran : An Acid-Responsive Biodegradable Material for Therapeutic Applications,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, pp. 10494–10495, 2008.
116. A. Baheti, L. Kumar, and A. K. Bansal, “Excipients used in lyophilization of small molecules,” *J. Excipients Food Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 41–54, 2010.
117. G. Sun and J. J. Mao, “Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair R eview,” *Nanomedicine (Lond)*, vol.7, no. (11), pp. 1771–1784, 2012.
118. S. Mitra, U. Gaur, P. C. Ghosh, and A. N. Maitra, “Tumour targeted delivery of encapsulated dextran – doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier,” *J Control Release*, vol. 74, pp. 317–323, 2001, doi: 10.1016/s0168-3659(01)00342-x.
119. L. S. Ferreira, S. Gerecht, J. Fuller, H. F. Shieh, G. Vunjak-novakovic, and R. Langer, “Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells,” *Biomaterials*, vol. 28, pp. 2706–2717, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.021.
120. Y. Banz, T. Gajanayake, K. Matozan, Z. Yang, R. Rieben, and O. Mitogen-activated, “Dextran sulfate modulates MAP kinase signaling and reduces

- endothelial injury in a rat aortic clamping model,” *YMVA*, vol. 50, no. 1, pp. 161–170, doi: 10.1016/j.jvs.2009.01.067.
121. M. Wolf, T. A. Koch, and D. B. Bregman, “Effects of Iron Deficiency Anemia and Its Treatment on Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate Homeostasis in Women,” *J Bone Miner Res*, vol. 28, no. 8, pp. 1793–1803, 2013, doi: 10.1002/jbmr.1923.
122. K. Alhareth, C. Vauthier, F. Bourasset, C. Gueutin, G. Ponchel, and F. Moussa, “European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Conformation of surface-decorating dextran chains affects the pharmacokinetics and biodistribution of doxorubicin-loaded nanoparticles,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 81, no. 2, pp. 453–457, 2012, doi: 10.1016/j.ejpb.2012.03.009.
123. H. Hifumi, S. Yamaoka, A. Tanimoto, T. Akatsu, Y. Shindo, and A. Honda, “Dextran Coated Gadolinium Phosphate Nanoparticles for Magnetic Resonance Tumor Imaging ,” *J.of Materials Chemistry*, vol. 35, pp. 6393–6399, 2009, doi: 10.1039/b902134e.
124. G. Pasut, “Polymers for Protein Conjugation,” *Polymers* , vol. 6, no.1, pp. 160–178, 2014, doi: 10.3390/polym6010160.
125. W. Yuan *et al.*, “Preparation of polysaccharide glassy microparticles with stabilization of proteins,” *International Journal of Pharmaceutics* vol. 366, no.1, pp. 154–159, 2009, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.007.
126. L. M. Bui, R. H. Dressendorfer, Carl L Keen, J. J. Summary, M. A. Dubick, “Zinc status and interleukin-1 β -induced alterations in mineral metabolism in rats,” *Endocrinology, Diabetes, and Metabolism*, vol. 206, no.4, pp. 438-444.
127. F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, “reviews Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles,” *Mol Pharm*, vol. 5, no. 4, pp. 505–515, 2008.
128. D. Melisi, A. Curcio, E. Luongo, E. Morelli, and M. G. Rimoli, “D-Galactose as a Vector for Prodrug Design,” *Curr Top Med Chem*, vol.11, no. 18, pp. 2288–2298, 2011, doi: 10.2174/156802611797183258.

129. S. R. Van Tomme and W. E. Hennink, “Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications,” *Expert Rev Med Devices*, 4(2) pp. 147–164, 2007, doi: 10.1586/17434440.4.2.147.
130. L. L. C. Estevanato *et al.*, “Long-Term Biodistribution and Biocompatibility Investigation of Dextran-Coated Magnetite Nanoparticle Using Mice as the Animal Model,” *J Biomed Nanotechnol*, vol. 8, no. 2, pp. 301–308, 2012, doi: 10.1166/jbn.2012.1376.
131. M. Torres-lugo, C. R. Ñ, M. Latorre-esteves, and A. Corte, “Synthesis and characterization of carboxymethyl dextran-coated Mn / Zn ferrite for biomedical applications,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, pp. 3061–3066, 2009, doi: 10.1016/j.jmmm.2009.05.023.
132. A. S. Ladokhin, “Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis,” *Peptides and Proteins*, pp. 1–18, 2006, doi: 10.1002/9780470027318.a1611.
133. A. J. Lopez and L. Martínez, “Parametric models to compute tryptophan fluorescence wavelengths from classical protein simulations,” *J. Comput. Chem.*, vol. 39, no. 19, pp. 1249–1258, 2018, doi: 10.1002/jcc.25188.
134. H. Chakraborty and A. Chattopadhyay, “Sensing Tryptophan Microenvironment of Amyloid Protein Utilizing Wavelength-Selective Fluorescence Approach,” *J. Fluoresc.*, vol. 27, no. 6, pp. 1995–2000, 2017, doi: 10.1007/s10895-017-2138-7.
135. C. Shen *et al.*, “The protein fluorescence and structural toolkit: Database and programs for the analysis of protein fluorescence and structural data”, *Proteins*, vol. 71, no. 4, pp. 1744–1754, 2008, doi: 10.1002/prot.21857.
136. N. Hellmann and D. Schneider, “Hands On: Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure,” *Methods Mol Biol*, vol. 1958, pp. 379–401, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-9161-7.
137. O. V. Levanets, V. G. Naidenov, K. A. Odynets, M. I. Woodmaska, G. K. Matsuka, and A. I. Kornelyuk, “Homology of C-terminal non-catalytic domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase with cytokine EMAP II and non-

- catalytic domains of methionyl- and phenylalanyl-tRNA synthetases,” *Biopolym. Cell*, vol. 13, no. 6, pp. 474–478, 1997, doi: 10.7124/bc.0004A9.
138. A. Kitamura and M. Kinjo, “State-of-the-art fluorescence fluctuation-based spectroscopic techniques for the study of protein aggregation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 4, 2018, doi: 10.3390/ijms19040964.
139. G. N. Gomes and C. C. Gradinaru, “Insights into the conformations and dynamics of intrinsically disordered proteins using single-molecule fluorescence,” *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1865, no. 11, pp. 1696–1706, 2017, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.06.008.
140. Meng Lu *et al.*, “Advanced fluorescence imaging of in situ protein aggregation,” *Phys. Biol.*, vol. 17, no. 2, 2020, doi.org/10.1088/1478-3975/ab694e.
141. H. Y. Chu, S. H. Ku, and D. S. Kang, “Characterizations on 2-isometries,” *J. Math. Anal. Appl.*, vol. 340, no. 1, pp. 621–628, 2008, doi: 10.1016/j.jmaa.2007.08.036.
142. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. “Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование” М.: Мир, 1984. – 479 с.
143. A. L. Dubrovsky, L. A. Savinskaya, and A. I. Kornelyuk, “Cloning and bacterial expression of the cytokine-like noncatalytic domain of bovine tyrosyl-tRNA synthetase,” *Biopolym. Cell*, vol. 14, no. 5, pp. 449–452, 1998, doi: 10.7124/bc.0004EA.
144. T. F. S. Inc., “HisPur™ Ni-NTA Resin: Instructions,” vol. 88221, no. 88221, pp. 1–4, 2012.
145. I. T. Bradford *et al.*, “Bradford-Solution for Protein Determination Solution for the rapid and accurate estimation of protein concentration Product code A6932,” no. 1, pp. 1–3, 1990, doi: 10.1515/cer-2015-0033.
146. A. Allouche, “Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares,” *J. Comput. Chem.*, vol. 32, pp. 174–182, 2012, doi: 10.1002/jcc.
147. E. F. Pettersen *et al.*, “UCSF Chimera - A visualization system for exploratory

- research and analysis,” *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004, doi: 10.1002/jcc.20084.
148. S. R. Comeau, D. W. Gatchell, S. Vajda, and C. J. Camacho, “ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes,” *Bioinformatics*, vol. 20, no. 1, pp. 45–50, 2004, doi: 10.1093/bioinformatics/btg371.
149. D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar, R. Nussinov, and H. J. Wolfson, “PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. SUPPL. 2, pp. 363–367, 2005, doi: 10.1093/nar/gki481.
150. Яна Гаклова, “Определение эндотоксинов при помощи LALтеста. Гелевый метод”, *Аналитический контроль, «Фармацевтическая отрасль»*, апрель № 2 (31) 2012.
151. https://moz.gov.ua/uploads/1/5896-dn_20180620_1178_dod.
152. Л. В. Савченкова, Л. А. Сивак, “Значення рівня ендogenous інтерферону та поверхневих антигенів на пухлинних клітинах для вибору лікування та прогнозу при В-клітинних неходжкінських злоякісних лімфомах,” *Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасєва*, Том 10, №2, pp. 133–138, 2009.
153. P. R. Twentyman and M. Luscombe “ A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity,” *Br. J. Cancer*, vol. 56, no. 3, pp. 279–85, 1987, Br J Cancer. 1987 Sep; 56(3): 279–285, doi: 10.1038/bjc.1987.190.
154. J. F. Zawada *et al.*, “Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production-a new approach for shortening protein production development timelines,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 7, pp. 1570–1578, 2011, doi: 10.1002/bit.23103.
155. X. Huang, X. Wang, J. Zhang, N. Xia, and Q. Zhao, “Escherichia coli-derived virus-like particles in vaccine development,” *npj Vaccines*, vol. 2, no. 1, pp. 1–

- 8, 2017, doi: 10.1038/s41541-017-0006-8.
156. L. Sanchez-Garcia, L. Martín, R. Mangues, N. Ferrer-Miralles, E. Vázquez, and A. Villaverde, “Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1186/s12934-016-0437-3.
157. R. Assenberg, P. T. Wan, S. Geisse, and L. M. Mayr, “Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 23, no. 3, pp. 393–402, 2013, doi: 10.1016/j.sbi.2013.03.008.
158. M. Zhao, X. Y. Tao, F. Q. Wang, Y. H. Ren, and D. Z. Wei, “Establishment of a low-dosage-IPTG inducible expression system construction method in *Escherichia coli*,” *J. Basic Microbiol.*, vol. 58, no. 9, pp. 806–810, 2018, doi: 10.1002/jobm.201800160.
159. M. Kesik-Brodacka, “Progress in biopharmaceutical development,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 65, no. 3, pp. 306–322, 2018, doi: 10.1002/bab.1617.
160. P. L. Ross and J. L. Wolfe, “Physical and Chemical Stability of Antibody Drug Conjugates: Current Status,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, no. 2, pp. 391–397, 2016, doi: 10.1016/j.xphs.2015.11.037.
161. J. N. Mahlangu *et al.*, “Changes in the amino acid sequence of the recombinant human factor VIIa analog, vatreptacog alfa, are associated with clinical immunogenicity,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 13, no. 11, pp. 1989–1998, 2015, doi: 10.1111/jth.13141.
162. C. Kimchi-Sarfaty, T. Schiller, N. Hamasaki-Katagiri, M. A. Khan, C. Yanover, and Z. E. Sauna, “Building better drugs: Developing and regulating engineered therapeutic proteins,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 34, no. 10, pp. 534–548, 2013, doi: 10.1016/j.tips.2013.08.005.
163. J. Naklova, “Определение эндотоксинов при помощи LAL теста . Гелевый метод,” vol. 2, no. 31, pp. 88–90, 2012.
164. G. W. Muller *et al.*, “Structural modifications of thalidomide produce analogs

- with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity,” *J. Med. Chem.*, vol. 39, no. 17, pp. 3238–3240, 1996, doi: 10.1021/jm9603328.
165. E. A. Sausville and A. M. Burger, “Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 7, pp. 3351–3354, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3627.
166. L. A. Lopez-Barcons, “Small-cell neuroendocrine carcinoma of the prostate: Are heterotransplants a better experimental model?,” *Asian J. Androl.*, vol. 12, no. 3, pp. 308–314, 2010, doi: 10.1038/aja.2009.68.
167. D. D. Lee, A. Hochstetler, C. Murphy, C. W. Lowe, and M. A. Schwarz, “A distinct transcriptional profile in response to endothelial monocyte activating polypeptide II is partially mediated by JAK-STAT3 in murine macrophages,” *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 317, no. 3, pp. C449–C456, 2019, doi: 10.1152/ajpcell.00277.2018.
168. B. G. de la Torre and F. Albericio, “The pharmaceutical industry in 2018. An analysis of FDA drug approvals from the perspective of molecules,” *Molecules*, vol. 24, no. 4, 2019, doi: 10.3390/molecules24040809.
169. G. Walsh, “Biopharmaceutical benchmarks 2018,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 36, no. 12, pp. 1136–1145, 2018, doi: 10.1038/nbt.4305.
170. T. Hilal, M. B. Sonbol, and V. Prasad, “Analysis of Control Arm Quality in Randomized Clinical Trials Leading to Anticancer Drug Approval by the US Food and Drug Administration,” *JAMA Oncol.*, vol. 5, no. 6, pp. 887–892, 2019, doi: 10.1001/jamaoncol.2019.0167.
171. T. W. Overton, “Recombinant protein production in bacterial hosts,” *Drug Discov. Today*, vol. 19, no. 5, pp. 590–601, 2014, doi: 10.1016/j.drudis.2013.11.008.
172. P. J. Carter, “Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective,” *Exp. Cell Res.*, vol. 317, no. 9, pp. 1261–1269, 2011, doi: 10.1016/j.yexcr.2011.02.013.
173. K. Gombocz *et al.*, “Influence of dextran-70 on systemic inflammatory

- response and myocardial ischaemia-reperfusion following cardiac operations,” *Crit. Care*, vol. 11, no. 4, pp. 1–10, 2007, doi: 10.1186/cc6095.
174. R. Mehvar, “Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents,” vol. 69, pp. 1–25, 2000.
175. D. Psimadas, P. Georgoulas, V. Valotassiou, and G. Loudos, “Molecular Nanomedicine Towards Cancer :,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 7, pp. 2271–2280, 2012, doi: 10.1002/jps.
176. T. I. Chandel *et al.*, “A mechanistic insight into protein-ligand interaction, folding, misfolding, aggregation and inhibition of protein aggregates: An overview,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 106, pp. 1115–1129, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.185.
177. F. Agostini, M. Vendruscolo, and G. G. Tartaglia, “Sequence-based prediction of protein solubility,” *J. Mol. Biol.*, vol. 421, no. 2–3, pp. 237–241, 2012, doi: 10.1016/j.jmb.2011.12.005.
178. M. Abe *et al.*, “Mechanism for retardation of amyloid fibril formation by sugars in V λ 6 protein,” *Protein Sci.*, vol. 22, no. 4, pp. 467–474, 2013, doi: 10.1002/pro.2228.
179. D. Barreca, G. Laganà, S. Magazù, F. Migliardo, G. Gattuso, and E. Bellocco, “FTIR, ESI-MS, VT-NMR and SANS study of trehalose thermal stabilization of lysozyme,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 63, pp. 225–232, 2014, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.11.011.
180. R. P. Rambo, “Biological Small Angle Scattering: Techniques, Strategies and Tips,” *Biol. Small Angle Scatt. Tech. Strateg. Tips*, vol. 1009, no. December, pp. 31–45, 2017, doi: 10.1007/978-981-10-6038-0.
181. A. J. Paul *et al.*, “High-throughput analysis of sub-visible mAb aggregate particles using automated fluorescence microscopy imaging,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 17, pp. 4149–4156, 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0362-2.
182. M. A. Pindrus, J. L. Cole, J. Kaur, S. J. Shire, S. Yadav, and D. S. Kalonia,

- “Effect of Aggregation on the Hydrodynamic Properties of Bovine Serum Albumin,” *Pharm. Res.*, vol. 34, no. 11, pp. 2250–2259, 2017, doi: 10.1007/s11095-017-2231-2.
183. B. C. Roughton, L. K. Iyer, E. Bertelsen, E. M. Topp, and K. V. Camarda, “Protein aggregation and lyophilization: Protein structural descriptors as predictors of aggregation propensity,” *Comput. Chem. Eng.*, vol. 58, pp. 369–377, 2013, doi: 10.1016/j.compchemeng.2013.07.008.
184. B. D. Connolly, L. Le, T. W. Patapoff, M. E. M. Cromwell, J. M. R. Moore, and P. Lam, “Protein Aggregation in Frozen Trehalose Formulations: Effects of Composition, Cooling Rate, and Storage Temperature,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 12, pp. 4170–4184, 2015, doi: 10.1002/jps.24646.
185. S. A. Giannos, E. R. Kraft, Z. Y. Zhao, K. H. Merkley, and J. Cai, “Formulation Stabilization and Disaggregation of Bevacizumab, Ranibizumab and Aflibercept in Dilute Solutions,” *Pharm. Res.*, vol. 35, no. 4, pp. 1–15, 2018, doi: 10.1007/s11095-018-2368-7.
186. M. R. Nilsson, “Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes,” *Amyloid*, vol. 23, no. 3, pp. 139–147, 2016, doi: 10.1080/13506129.2016.1179183.
187. P. Alam, K. Siddiqi, S. K. Chturvedi, and R. H. Khan, “Protein aggregation: From background to inhibition strategies,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 103, pp. 208–219, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.048.
188. R. Jones, “Protein aggregation increases with age,” *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 8, pp. 7–8, 2010, doi: 10.1371/journal.pbio.1000449.
189. S. Y. Ow and D. E. Dunstan, “A brief overview of amyloids and Alzheimer’s disease,” *Protein Sci.*, vol. 23, no. 10, pp. 1315–1331, 2014, doi: 10.1002/pro.2524.
190. J. Panchal, J. Kotarek, E. Marszal, and E. M. Topp, “Analyzing subvisible particles in protein drug products: A comparison of Dynamic Light Scattering (DLS) and Resonant Mass Measurement (RMM),” *AAPS J.*, vol. 16, no. 3, pp.

- 440–451, 2014, doi: 10.1208/s12248-014-9579-6.
191. C. Li, J. Ma, Q. Fan, Y. Tao, and G. Li, “Dynamic light scattering (DLS)-based immunoassay for ultra-sensitive detection of tumor marker protein,” *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 50, pp. 7850–7853, 2016, doi: 10.1039/c6cc02633h.
192. R. B. Silverman and M. W. Holladay, “Chapter 4 Chapter 4 E,” vol. 1860, no. February, pp. 1–36, 2007, doi: 10.1016/B978-0-12-382030-3.00004-0.
193. J. Stecher and J. Plank, “Adsorbed layer thickness of polycarboxylate and polyphosphate superplasticizers on polystyrene nanoparticles measured via dynamic light scattering,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 562, pp. 204–212, 2020, doi: 10.1016/j.jcis.2019.11.108.
194. S. Zhan *et al.*, “Gold Nanoflower-Enhanced Dynamic Light Scattering Immunosensor for the Ultrasensitive No-Wash Detection of Escherichia coli O157:H7 in Milk,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, no. 32, pp. 9104–9111, 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.9b03400.
195. L. Galm, S. Amrhein, and J. Hubbuch, “Predictive approach for protein aggregation: Correlation of protein surface characteristics and conformational flexibility to protein aggregation propensity,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 114, no. 6, pp. 1170–1183, 2017, doi: 10.1002/bit.25949.
196. R. Esfandiary, A. Parupudi, J. Casas-Finet, D. Gadre, and H. Sathish, “Mechanism of Reversible Self-Association of a Monoclonal Antibody: Role of Electrostatic and Hydrophobic Interactions,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 2, pp. 577–586, 2015, doi: 10.1002/jps.24237.
197. A. W. Fitzpatrick, T. P. J. Knowles, C. A. Waudby, M. Vendruscolo, and C. M. Dobson, “Inversion of the balance between hydrophobic and hydrogen bonding interactions in protein folding and aggregation,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, no. 10, 2011, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002169.
198. S. C. Meliga, W. Farrugia, P. A. Ramsland, and R. J. Falconer, “Cold-induced precipitation of a monoclonal IgM: A negative activation enthalpy reaction,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 2, pp. 490–494, 2013, doi: 10.1021/jp309109k.

199. M. Brunsteiner, M. Flock, and B. Nidetzky, "Structure Based Descriptors for the Estimation of Colloidal Interactions and Protein Aggregation Propensities," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0059797.
200. C. Ota, S. Noguchi, S. Nagatoishi, and K. Tsumoto, "Assessment of the Protein-Protein Interactions in a Highly Concentrated Antibody Solution by Using Raman Spectroscopy," *Pharm. Res.*, vol. 33, no. 4, pp. 956–969, 2016, doi: 10.1007/s11095-015-1842-8.
201. A. Oliva, M. Llabrés, and J. B. Fariña, "Fitting bevacizumab aggregation kinetic data with the Finke-Watzky two-step model: Effect of thermal and mechanical stress," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 77, pp. 170–179, 2015, doi: 10.1016/j.ejps.2015.06.011.
202. L. M. Blancas-Mejía, T. J. Horn, M. Marin-Argany, M. Auton, A. Tischer, and M. Ramirez-Alvarado, "Thermodynamic and fibril formation studies of full length immunoglobulin light chain AL-09 and its germline protein using scan rate dependent thermal unfolding," *Biophys. Chem.*, vol. 207, pp. 13–20, 2015, doi: 10.1016/j.bpc.2015.07.005.
203. B. Barz and B. Urbanc, "Minimal model of self-assembly: Emergence of diversity and complexity," *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 14, pp. 3761–3770, 2014, doi: 10.1021/jp412819j.
204. J. T. Berryman, S. E. Radford, and S. A. Harris, "Systematic examination of polymorphism in amyloid fibrils by molecular-dynamics simulation," *Biophys. J.*, vol. 100, no. 9, pp. 2234–2242, 2011, doi: 10.1016/j.bpj.2011.02.060.
205. P. M. Buck, S. Kumar, and S. K. Singh, "On the Role of Aggregation Prone Regions in Protein Evolution, Stability, and Enzymatic Catalysis: Insights from Diverse Analyses," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 9, no. 10, 2013, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003291.
206. G. Meric, A. S. Robinson, and C. J. Roberts, "Driving Forces for Nonnative Protein Aggregation and Approaches to Predict Aggregation-Prone Regions," *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 8, no. 1, pp. 139–159, 2017, doi:

- 10.1146/annurev-chembioeng-060816-101404.
207. M. Sleutel, A. E. S. Van Driessche, W. Pan, E. K. Reichel, D. Maes, and P. G. Vekilov, “Does solution viscosity scale the rate of aggregation of folded proteins?,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 3, no. 10, pp. 1258–1263, 2012, doi: 10.1021/jz300459n.
208. K. Traub-Hoffmann, B. Furtmann, L. Laber, S. Helm, C. Geiger, and T. Bussemer, “Standardization of the Reconstitution Procedure of Protein Lyophilizates as a Key Parameter to Control Product Stability,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 109, no. 1, pp. 211–215, 2020, doi: 10.1016/j.xphs.2019.10.032.
209. W. Correa, K. Brandenburg, U. Zähringer, K. Ravuri, T. Khan, and F. Von Wintzingerode, “Biophysical analysis of lipopolysaccharide formulations for an understanding of the low endotoxin recovery (LER) phenomenon,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 12, pp. 1–15, 2017, doi: 10.3390/ijms18122737.
210. J. Reich, F. A. Weyer, H. Tamura, I. Nagaoka, and H. Motschmann, “Low endotoxin recovery—Masking of naturally occurring endotoxin,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 4, pp. 1–15, 2019, doi: 10.3390/ijms20040838.
211. E. C. Dullah and C. M. Ongkudon, “Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin–protein interactions,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 37, no. 2, pp. 251–261, 2017, doi: 10.3109/07388551.2016.1141393.
212. S. Fennrich, U. Hennig, L. Toliashvili, C. Schlensak, H. P. Wendel, and S. Stoppelkamp, “More than 70 years of Pyrogen detection: Current state and future perspectives,” *ATLA Altern. to Lab. Anim.*, vol. 44, no. 3, pp. 239–253, 2016, doi: 10.1177/026119291604400305.
213. G. Solano, A. Gómez, and G. León, “Assessing endotoxins in equine-derived snake antivenoms: Comparison of the USP pyrogen test and the Limulus Amoebocyte Lysate assay (LAL),” *Toxicon*, vol. 105, pp. 13–18, 2015, doi: 10.1016/j.toxicon.2015.08.015.

ДОДАТОК А
ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Kolomiets L. A.**, Vorobyova N. V., Lozhko D. M., Zayets V.N., Kornelyuk A. I. (2020) Stabilization of AIMP1/p43 and EMAP II recombinant proteins in the complexes with polysaccharide dextran-70. *Pharmacological Reports*, 72(1), 238-245. DOI: 10.1007/s43440-019-00016-x.
2. **Kolomiets L. A.**, Lozhko D. M., Chunihin O.Yu., Zayets V.N., Gordovska N. V., Kornelyuk A. I. (2019) The effect of dextran 70 on the aggregation of the antitumor cytokine EMAP II. *Microbiology and Biotechnology*, 3 (47), 6 - 18. DOI: 10.18524/2307-4663.2019.3(47).182815.
3. **Kolomiets L. A.**, Zayets V.N., Kornelyuk A. I. (2018) Investigation of influence of cytokine EMAP II nanocomposite complex with dextran 70 the Balb/c lines muscle organism. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, series Biology*, 2(76), 29-33. DOI: 10.17721/1728_2748.2018.76.29-33.
4. **Kolomiets-Babenko L.A.**, Bohorad-Kobelska O. S., Kovalchuk N. L., Spivak M. Ja., Kornelyuk A. I. (2016) Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon. *Biotechnologia Acta*, 9 (5), 18-23. DOI: 10.15407/biotech9.05.018.
5. Chaykovskaya L.V., Polyakova L. I., Sachinskaya O. V., **Babenko L. A.**, Kornelyuk A. I., Reznikov O. I. (2011) Testing the antitumor activity of the nanocomposite complex of the recombinant cytokine-like polypeptide EMAP-II on xenografts of androgen-dependent human prostate cancer. *Endocrinology*, 16 (2), 160-168.
6. Lylo V.V., Matsevich L. L., Kotsarenko E.V., **Babenko L. A.**, Kornelyuk A. I., Sukhorada E. M., Lukash L. L. (2011) Activation of gene expression of the O⁶-methylguanine-DNA-transferase repair enzyme upon the influence of EMAP II cytokine in human cells in vitro. *Cytology and Genetics*, 45 (6), 373-378. DOI: 10.3103/S0095452711060053.

7. **Babenko L. A.**, Scorobogatov A. Yu., Dubrovskiy A. L., Kornelyuk A. I. (2010) Optimization of bacterial expression of the EMAP II antitumor cytokine in *E.coli* BL21(DE3)pLysE cells. *Microbiology and biotechnology*, 3 (11), 21-31. DOI: 10.18524/2307-4663.2010.3(11).98933.
8. Goloborodko T .O., Polyakova L. I., Sotkis G.V., Kornelyuk A. I., **Babenko L. A.**, Shuba Ya. M., Reznikov O. I. (2010) Polypeptide EMAP II inhibits growth and stimulates apoptosis of human prostate cancer LNCaP cell lines. *Journal of the Academy of Medical Sciences of Ukraine*, 16(4), 681-690.
9. Kornelyuk A. I., **Babenko L. A.**, Kozlov A. V., Reznikov O. I., Chaykovskaya L.V., Polyakova L. I. (2011) Decision on the issuance of a declaratory patent for a utility model "Nanocomposite antitumor drug". Conclusion approved by the *Department of Intellectual Property* from 10.11.2011, № 64374.
10. **Kolomiets L. A.**, Malyna A.E., Kornelyuk A. I. The method of stabilization of the antitumor cytokine EMAP II. Conclusion approved by the *Department of Intellectual Property* from 25.03.2020, № 141271.
11. **Babenko L. A.**, Chaykovskaya L.V., Reznikov O. I., Kornelyuk A. I.. (2010 September) Study of the antitumor effect of the cytokine EMAP II on xenografts of human prostate adenocarcinoma in CBA mice. - X Ukrainian biochemical Congress, 13-17 September 2010, Odessa, Ukraine. - *Ukr. Biochem. J.*, Vol 82, №4, Special Issue, P. 49.
12. **Babenko L.A.**, Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Reznikov A.G., Kornelyuk A. I. (2010 February) Antitumor activity of II protein. - FEBS Special Meetings JakStat Signaling: From Basics to Disease, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria. - *Abstract book*, 2010, P.53.
13. **Babenko L. A.**, Skorobogatov O. Yu. (2010 September) Optimization of bacterial expression of the antitumor cytokine EMAP II in *E.coli* BL21(DE3)pLysE cells. - VI International Scientific Conference of Students and Postgraduates "Youth and Progress in Biology", Lviv, Ukraine. - *Abstract book*, 2010, P.143-144.

14. **Babenko L. A.**, Kozlov A. V., Chaykovskaya L.V., Polyakova L. I., Reznikov O. I., Kornelyuk A. I. (2011 March) Development of nanocomposite drug EMAP II and study of its antitumor activity. - International scientific conference of students and young scientists "Current issues of modern medicine", 24-26 March 2011, Kharkiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2011, P. 25-26.

15. Skorobogatov O. Yu, **Babenko L. A.**, Kornelyuk A. I. (2011 March) Determination of immunogenic regions of recombinant EMAP II protein by bioinformatics method. - International scientific conference of students and young scientists "Current issues of modern medicine", 24-26 March, Kharkiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2011, P. 158-159.

16. **Babenko L. A.**, Kotsarenko K. V., LyloV.V., Macevych L. L., Ruban T. A., Kornelyuk A. I., Lukash L. L. (2011) Study of the effect of nanocomposite drug EMAP II on the proliferation and survival of immortalized cells.- International Pushchin School-Conference of Young Scientists "Biology is a science of the XXI century, Pushchino, Russia. - *Abstract book*, 2011, P.300.

17. **Babenko L.A.**, Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Kornelyuk A. I. (2011 June) Investigation of anticancer activity of EMAP II based nanocomposite complex. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino Italy. - *Abstract book*, 2011, P.196.

18. Goloborodko T., Polyakova L., Sotkis A., Moriev R., Kornelyuk A., **Babenko L.**, Shuba Y., Reznikov A. (2011 June) Effect of recombinant protein EMAP II on proliferation and apoptosis in the prostate cancer LNCaP cell line. - 36th FEBS Congress "Biochemistry for tomorrow's medicine", 25 - 30 June, Torino, Italy. - *Abstract book*, 2011, P.209.

19. Kotsarenko K. V., LyloV.V., Macevych L. L., Ruban T. A., **Babenko L. A.**, Kornelyuk A. I., Lukash L. L. (2011 May) The effect of cytokines on MGMT gene expression in human cells *in vitro*. – 5th Conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of

Ukraine, *dedicated to the 130th anniversary of the birth of O.O. Bogomolets*, 24-25 May, Kyiv, Ukraine. - *Biopolymers and Cell*, 2011, № 4, P. 318.

20. Kotsarenko K., **Babenko L.**, Ruban T., Lylo V., Kochubey T., Kornelyuk A., Lukash L. (2011 September) Study of EMAP II based nanocomposite complex affect on the survival of human cell *in vitro*. - The 4th International IMBG Conference for Young Scientists "Molecular Biology Advances and Perspectives", 14-17 September, Kyiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2011, P. 99.

21. **Kolomiets L.A.**, Kovalchuk N.L. (2015 December) Determination of endotoxin content in nanocomposite preparation EMAP II by gel-thromb test. - X International Conference of Young Scientists "Biology: from molecule to biosphere", 2-4 December 2015, Kharkiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2015. P. 128.

22. Vorobyova N. V., **Kolomiets L. A.**, Lozhko D. M., Nesterenko Ye. V. (2016 December) Study of the formation of complexes of recombinant proteins AIMP1 / P43 and human EMAP II with dextran-70. - XI International Conference of Young Scientists "Biology: from molecule to biosphere", 29 November – 2 December, Kharkiv, Ukraine. - *Abstract book*, 2016, P. 29.

23. **Kolomiets L. A.**, Lozhko D. M., Chunihin O.Yu., Zayets V.N., Gordovska N. V., Kornelyuk A. I. (September - October 2019) The effect of dextran-70 on the aggregation of the antitumor cytokine EMAP II. - XII Ukrainian Biochemical Congress, 30 September - 4 October, Ternopil, Ukraine. - *Medical and clinical chemistry*. - V.21, № 3 (80), P.272.

ДОДАТОК Б



ДОДАТОК В

