

УДК 579.222:577.217

**Л.А. Коломієць¹, Д.М. Ложко¹, В.М. Заєць¹, О.Ю. Чуніхін²,
Н.В. Гордовська^{1,3}, О.І. Корнелюк¹**¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143,
тел.: +38(044) 526 11 69, +38(044) 200 03 56²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, Київ, 01030,³Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

ВПЛИВ ДЕКСТРАНУ 70 НА АГРЕГАЦІЮ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА ЕМАР II

Мета. Визначення впливу температури на агрегаційні властивості рекомбінантного цитокіна ЕМАР II (ендотеліальний моноцит, що активує поліпептид II) та його комплексу з поліукридом декстраном 70 в розчині. **Методи.** Бактеріальна експресія рекомбінантного білка, метал-хелатувальна афінна хроматографія, динамічне розсіювання світла, моделювання просторової структури. **Результати.** Досліджені агрегаційні властивості рекомбінантного цитокіна ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 і встановлені розміри комплексу методом динамічного розсіювання світла. Показана стабілізація цитокіна ЕМАР II декстраном 70 при підвищенні температури в межах від 20 °С до 55 °С. За допомогою комп'ютерного моделювання молекулярного докінгу запропоновані можливі механізми агрегації цитокіну ЕМАР II та його стабілізації декстраном 70. **Висновки.** Отримані результати свідчать, що протиухлинний рекомбінантний цитокін ЕМАР II утворює білкові агрегати при підвищенні температури. Стабільність цитокіна ЕМАР II в розчині підвищується в результаті взаємодії з декстраном 70. Стабілізація структури ЕМАР II в комплексі розширює можливості досліджень протиухлинних властивостей цього цитокіна та його практичного використання.

Ключові слова: цитокін ЕМАР II, декстран 70, агрегація, молекулярний докінг, *E. coli* BL21(DE3)pLysE.

Терапевтичні засоби на основі білків стають все більш важливим класом фармацевтичних препаратів, які мають низку переваг перед загальноживаними лікарськими препаратами. Слід зазначити, що фармацевтичні препарати на основі білків проявляють більшу специфічність щодо мішеней та меншу токсичність. Білкові терапевтичні засоби використовуються в широкому спектрі медичних застосувань, включаючи гормональну терапію, онкологію, аутоімунні порушення, а також як протиінфекційні агенти [1, 2]. Одним із складних аспектів фармацевтичної розробки терапевтичних засобів на основі білків є значна лабільність їхньої структури, що робить цей клас препаратів дуже сприйнятливим до деградації під час виробництва, зберігання та введення в організм в якості лікарських препаратів [3]. В зв'язку з цим проблемі

© Л.А. Коломієць, Д.М. Ложко, В.М. Заєць, О.Ю. Чуніхін, Н.В. Гордовська, О.І. Корнелюк, 2019



агрегації як важливому аспекту цілісності лікарських препаратів приділяється особлива увага.

При виробництві білкових терапевтичних засобів агрегація білків може виникати як в процесі експресії та очистки білків, так і в процесі зберігання таких ліків. Агрегати білків можуть викликати імуногенну реакцію у пацієнтів та призводити до значного зниження ефективності лікарських засобів. Саме тому агрегація білків вважається одним із найважливіших аспектів якості при розробці та оцінці біопрепаратів. При порушенні нативної структури білки втрачають функціональну активність, стають менш стабільними, а також підвищується їх здатність до агрегації, що може призвести до широкого спектру патологічних станів як клітин, так і організму в цілому [4, 5].

Найбільш ефективним засобом боротьби з агрегацією білків є використання лігандів, які запобігають утворенню білкових агрегатів. Ці допоміжні речовини широко використовують під час виробництва, очистки та приготування лікарських форм різних медичних препаратів [6].

Ендотеліальний моноцит, що активує поліпептид II (ЕМАР II) — цитокін, який проявляє протипухлинну та протизапальну активність, бере участь в ангіогенезі, ембріогенезі та деяких патологічних процесах, індукує апоптоз клітин ендотелію [7, 8]. Експресія ЕМАР II в тканинах підвищується при їх пошкодженні, що пов'язано з участю ЕМАР II в реакціях запалення: його здатністю залучати нейтрофіли в місце пошкодження, підвищувати чутливість тканин до фактора некрозу пухлин (ФНП) та індукувати апоптоз клітин [9–11].

Метою даної роботи було дослідження агрегаційних властивостей та розмірів рекомбінантного цитокіну ЕМАР II та його комплексу з поліцукридом декстраном 70 для подальшого впровадження в практику та проведення доклінічних досліджень.

Матеріали і методи

Для отримання протипухлинного цитокіна ЕМАР II в роботі використовували штам-продуцент рекомбінантного білка *E. coli* BL21(DE3)pLysE ("Stratagene", США), трансформований плазмідною конструкцією pET30a-ЕМАР II. Експресуюча конструкція pET30a-ЕМАР II була створена на базі вектору pET-30a(+) ("Novagen", США) і містила клоновану кДНК гену ЕМАР II під контролем промотора фага Т7. Селективним маркером плазміди є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотика канаміцину. Плазмідну ДНК виділяли за допомогою Gene JET Plasmid Miniprep Kit фірми "Thermo Scientific". Концентрацію плазмідної ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 ("Thermo Scientific", Литва).

Всі процедури з трансформації плазмідної конструкції pET30a-ЕМАР II в компетентні клітини *E. coli* та аналіз плазмід проводили методом електрофорезу в 0,7–1% агарозному гелі згідно [12].

Вирощування культури *E. coli* BL21(DE3)pLysE та індукцію експресії рекомбінантного ЕМАР II в бактеріальній культурі проводили в середовищі Лурія-Бертані (LB) (5 г дріжджового екстракту, 10 г триптон, 10 г NaCl на



1л) згідно [13]. Оптичну густину культури (OG_{600}) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм. Для індукції синтезу рекомбінантних білків до бактеріальної культури додавали індуктор експресії ППТГ (ізопропіл- β -тіоґалактопіранозид, “Sigma”, США) до кінцевої концентрації 1,25 мМ.

Рекомбінантний білок отримували із супернатанту бактеріальних клітин після їх лізису за допомогою ультразвукового дезінтегратора методом метал-хелатувальної хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, Germany) [13]. Аналіз бактеріального білка проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах у 12% гелі [12], використовуючи суміш маркерних білків (Thermo Scientific, Литва). Гелі забарвлювали Coomassie blue R-250. Концентрацію очищеного рекомбінантного білка ЕМАР II визначали спектрофотометрично, використовуючи коефіцієнт екстинкції $8730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при довжині хвилі 280 нм. Оскільки синтезовані у векторі рЕТ30а білки містять в своїй N-кінцевій амінокислотній послідовності кодований вектором 6His-tag, для його відщеплення від ЕМАР II використовували ентерокіназу за стандартною методикою виробника (New England Biolabs) та рекомбінантний цитокін додатково очищали на колонці з Ni-NTA агарозою. Високий ступінь чистоти отриманих препаратів рекомбінантного ЕМАР II було показано раніше [14].

Нанокмпозитний препарат ЕМАР II з декстраном 70 було створено згідно запатентованої корисної моделі [15]. Декстран 70 (“Біотика АТ”, Словаччина) розчиняли у аліквоті білка в 50 мМ Na-фосфатному буфері, рН 7,5 з 150 мМ NaCl та перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год.

Для дослідження використовували ЕМАР II в концентрації 0,6 мг/мл (6,87 мкМ) та декстран 70 в концентрації 50 мг/мл (7,1 мМ). Стехіометрія зв'язування декстрану 70 з цитокіном становила близько 1:1. Стехіометрія зв'язування (n) та константа зв'язування (K_d) 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 F_0 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

$$y = a + bx, \text{ де } y \text{ та } x \text{ відповідають виразам } \log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) \text{ та } \log([\beta - L]),$$

в той час як a та b – $\log(K_a)$ та n відповідно.

Вимірювання світлорозсіювання проводили на лазерному кореляційному спектрометрі “ZetaSizer-3” обладнаному He-Ne лазером ЛГН-111 (P = 25 мВт, $\lambda = 633 \text{ нм}$) з діапазоном вимірювання приладу від 1 нм до 20 мкм.



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

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

Моделювання взаємодії між просторовими структурами ЕМАР II проводили за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 [16] та SymmDock [17]. Візуалізацію, аналіз просторової структури та розрахунок радіусу гірації здійснювали у програмному забезпеченні UCSF Chimera [18]. Моделювання комплексу ЕМАР II з декстраном 70 здійснювали за допомогою програми AutoDock Vina [19]. Для проведення докінгу використано просторову структуру ЕМАР II, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (PDB ID: 1EUJ).

Результати та їх обговорення

Дослідження проводили на високоочищеному препараті рекомбінантного цитокіна ЕМАР II.

На початковому етапі роботи була проведена оцінка розміру поліцукриду декстрану 70 у розчині при кімнатній температурі методом динамічного розсіювання світла. Аналіз даних показав, що гідродинамічний діаметр полімерного вуглеводу знаходиться в діапазоні 0,4–4 нм. Наші дослідження по утворенню комплексу декстрану 70 з цитокіном при різних концентраціях полімеру показали, що стехіометрія зв'язування декстрану з ЕМАР II становить близько 1:1. Раніше нами було показано, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 зберігає функціональну цитокінову активність [9]. Всі проведені в роботі дослідження по агрегації були проведені для цього комплексу.

Температурне плавлення рекомбінантного ЕМАР II 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.

Аналіз спектрів ЕМАР II показав, що при кімнатній температурі в розчині білка присутні значні за розмірами осередки розсіювання світла з розмірами 20–40 нм, що, ймовірно, зумовлено 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. 1).

Наступним кроком було дослідження розмірів комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у розчині при різних температурах. З графіка на Рис.1 видно, що розміри комплексу ЕМАР II–декстран 70 при зростанні температури значно відрізняються від розмірів білка ЕМАР II. При підвищенні температури відбувається значне підвищення гідродинамічного діаметру часток вільного цитокіна у розчині. В той же час з підвищенням температури розмір частинок комплексу ЕМАР II–декстран 70 не змінюються і така тенденція зберігається



до температури 55 °С. Ці дані свідчать про те, що комплекс ЕМАР II– декстран 70 досить стабільний і не руйнується при високих температурах, а також що поліцукрид декстран 70 стабілізує білкову глобулу ЕМАР II та перешкоджає процесу агрегації.

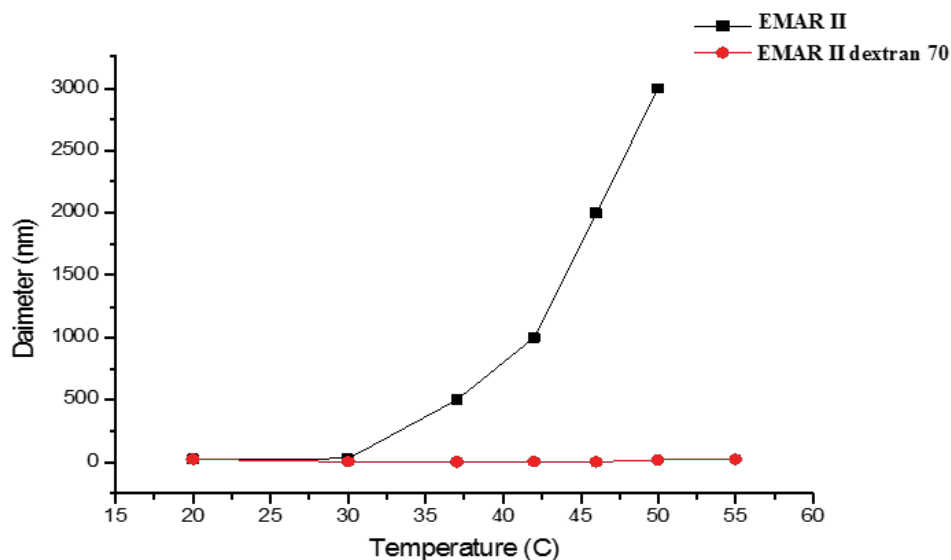


Рис. 1. Розміри білка ЕМАР II (1) та комплексу ЕМАР II з декстраном 70 (2) у розчині за різних температур

Fig. 1. Dimensions of EMAR II protein (1) and EMAR II complex with dextran 70 (2) in solution at different temperatures

Щоб з'ясувати природу формування агрегатів білка ЕМАР II 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 (Protein Data Bank код 1EUJ). Амінокислотна послідовність цитокіна ЕМАР II представлена на Рис. 2.

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).

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 ³⁴DVGEIAPR⁴¹ відповідає формі триптофанової “кишені”. Завдяки цьому результати моделювання комплексів ЕМАР II обома веб-серверами є практично ідентичними (рис. 4, 5). Таким чином, аналіз отриманих результатів свідчить, що ймовірним початковим механізмом утворення агрегатів ЕМАР II у розчині при підвищених температурах є гідрофобна взаємодія між молекулами білка.



10 20 30 40 50 60
 SKPIDVSRLD LRIGCIITAR KHPDADSLYV EEVDVGEIAP RTVVVSGLVNH VPLEQMQRNM
 70 80 90 100 110 120
 VILLCNLKPA KMRGVLSQAM VMCASSPEKI EILAPPNGSV PGDRITFDAF PGEPDKELNP
 130 140 150 160 166
KKKIWEQIQP DLHTNDECVA TYKGVPFVEVK GKGVCRAQTM SNSGIK

Рис. 2. Амінокислотна послідовність ЕМАР II. Неструктурована ділянка ³⁴DVGEIAPR⁴¹ та амінокислотні залишки, що входять до триптофаної "кишені" виділені курсивом та підкреслені

Fig. 2. Amino acid sequence of EMAP II. The unstructured ³⁴DVGEIAPR⁴¹ region and the amino acid residues included in the tryptophan pocket are italicized and underlined

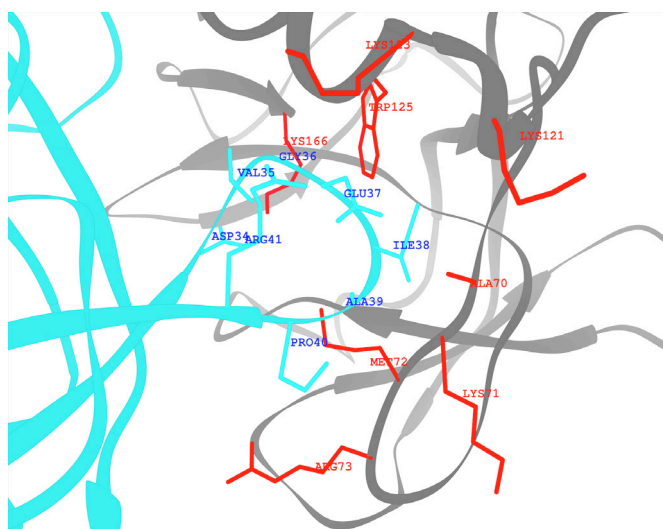


Рис. 3. Формування молекулярних контактів між молекулами ЕМАР II в процесі утворення агрегатів білка. На одній молекулі ЕМАР II зображена неструктурована петля ³⁴DVGEIAPR⁴¹ (виділена синім кольором), а на іншій молекулі ЕМАР II зображені амінокислотні залишки (виділені червоним кольором), що входять до триптофаної "кишені"

Fig. 3. Formation of molecular contacts between EMAP II molecules during the formation of protein aggregates. One EMAP II molecule shows an unstructured loop ³⁴DVGEIAPR⁴¹ (highlighted in blue) and the other EMAP II molecule shows amino acid residues (highlighted in red) that belong to the tryptophan "pocket"

Для з'ясування механізму стабілізації протипухлинного препарату ЕМАР II декстраном 70 проводили комп'ютерний докінг поліцукриду з цитокіном за допомогою програми AutoDock Vina (рис. 6). 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 поліцукриду з неструктурованою петлею ³⁴DVGEIAPR⁴¹ та гідрофобною триптофаною "кишенею" в структурі білка. Згідно моделей у зв'язуванні декстрана 70 з ЕМАР II залучені такі залишки, як Arg12,

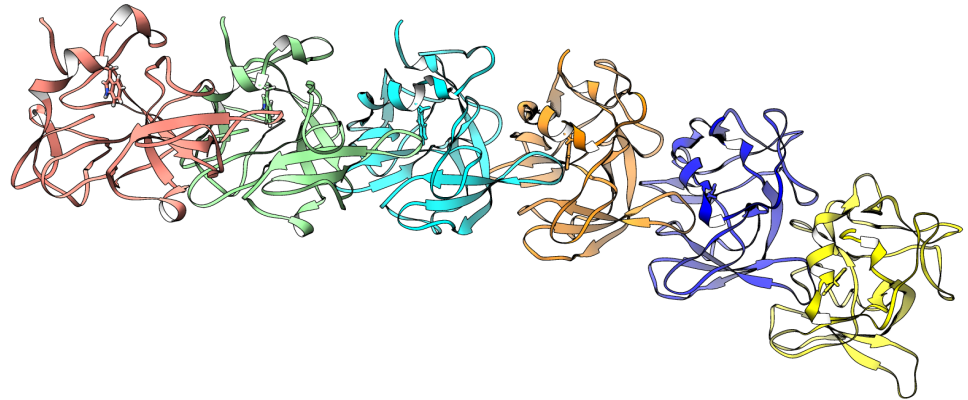


Рис. 4. Модель просторової структури агрегатів ЕМАР II, отриманої в результаті макромолекулярного докінгу окремих молекул ЕМАР II за допомогою веб-сервера Cluspro 2.0. Різними кольорами виділені молекули ЕМАР II, які взаємодіють між собою, утворюючи агрегат

Fig. 4. Model of the spatial structure of EMAP II aggregates resulting from macromolecular docking of individual EMAP II molecules via the Cluspro 2.0 web server. EMAP II molecules interacted with each other to form an aggregate are distinguished by different colors

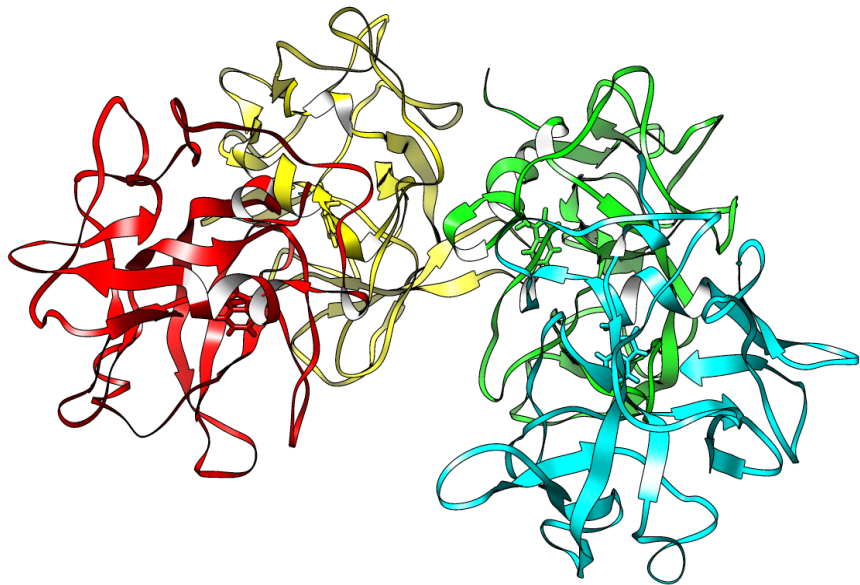


Рис. 5. Модель просторової структури агрегатів молекул ЕМАР II, отриманої в результаті макромолекулярного докінгу двох молекул ЕМАР II за допомогою веб-сервера SymmDock. Різними кольорами виділені молекули ЕМАР II, які взаємодіють між собою, утворюючи агрегат

Fig. 5. Model of the spatial structure of the aggregates of EMAP II molecules resulting from macromolecular docking of two EMAP II molecules using the SymmDock web server. EMAP II molecules interacted with each other to form an aggregate are distinguished by different colors

Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166 (рис. 6).

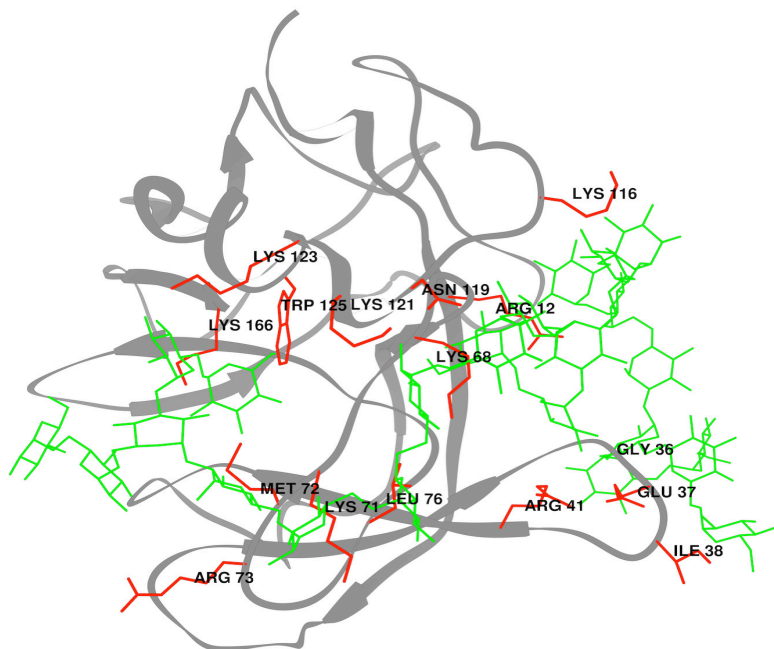


Рис. 6. Модель просторової структури комплексу ЕМАР II–декстран 70, отриманої в результаті макромолекулярного докінгу молекул ЕМАР II та декстрану 70 за допомогою програми AutoDock Vina. Залишки білка, які зв’язуються з поліцукридом виділені червоним кольором, а декстран 70 – зеленим

Fig. 6. Model of the spatial structure of the EMAP II – dextran 70 complex obtained by macromolecular docking of EMAP II molecules and dextran 70 using AutoDock Vina. The protein residues that bound to the polysaccharide are highlighted in red and dextran 70 in green

Отже, згідно даних комп’ютерного моделювання структури комплексу ЕМАР II з поліцукридом окремі молекули декстрану 70 блокують потенційні сайти на поверхні білка, відповідальні за утворення агрегатів ЕМАР II. Результати по моделюванню узгоджуються з експериментальними даними по термостабілізації комплексу, отриманими методом динамічного світлорозсіювання.

В результаті дослідження впливу температури на агрегаційні властивості протираковинного цитокіну ЕМАР II та створено термостабільний комплекс білка з декстраном 70 зі зниженою агрегацією. Термостабільність комплексу відкриває перспективи для подальшого використання ЕМАР II в фармакологічних дослідженнях як нового потенційного протираковинного препарату.

Л.А. Коломієць¹, Д.М. Ложко¹, В.Н. Заец¹, А.Ю. Чуніхін²,
Н.В. Гордовская^{1,3}, А.И. Корнелюк¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143,
тел.: +38 (044) 526 11 69, +38 (044) 200 03 56

²Институт биохимии им. О. В. Палладина НАН Украины,
ул. Леонтовича, 9, 01030, Киев,

³Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка,
ул. Владимирская, 64, Киев, 01601, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ДЕКСТРАНА 70 НА АГРЕГАЦИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА ЕМАР II

Реферат

Цель. Определение влияния температуры на агрегационные свойства рекомбинантного цитокина ЕМАР II (эндотелиальный моноцит активирующий полипептид II) и его комплекса с полисахаридом декстраном 70 в растворе. **Методы.** Бактериальная экспрессия рекомбинантного белка, металл-хелатирующая афинная хроматография, динамическое рассеяние света, моделирование пространственной структуры. **Результаты.** Исследованы агрегационные свойства рекомбинантного цитокина ЕМАР II и его комплекса с декстраном 70 и установлены размеры комплекса методом динамического рассеивания света. Показана стабилизация цитокина ЕМАР II декстраном 70 при повышении температуры в пределах от 20 °С до 55 °С. С помощью компьютерного моделирования молекулярного докинга предложены возможные механизмы агрегации цитокина ЕМАР II и его стабилизации декстраном 70. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют, что противоопухолевый рекомбинантный цитокин ЕМАР II образует белковые агрегаты при повышении температуры. Стабильность структуры ЕМАР II в комплексе расширяет возможности исследований противоопухолевых свойств этого цитокина и его практического использования.

Ключевые слова: цитокин ЕМАР II, декстран 70, агрегация, молекулярный докинг, *E. coli* BL21(DE3) pLysE.



L.A. Kolomiets¹, D.M. Lozhko¹, V.M. Zayets¹,
A.Yu. Chunihin², N.V. Gordovska³, A.I. Kornelyuk¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
03143 Kyiv, 150, Zabolotnogo str., Ukraine, +38 (044) 526 11 69

²Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, 9, Leontovicha St., Kyiv, 01030,
Ukraine, +38 (044) 234 59 74

³Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64, Volodymyrska str., Ukraine, 01601,
Kyiv, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

INFLUENCE OF THE DEXTRAN 70 ON AGGREGATION ANTITUMOR CYTOKINE EMAP II

Summary

Aim. Determination of the effect of temperature on the aggregation properties of the recombinant cytokine EMAP II (endothelial monocyte activating polypeptide II) and its complex with polysaccharide dextran 70 in solution. **Methods.** Bacterial expression of recombinant protein, metal-chelated affinity chromatography, dynamic light scattering, spatial structure modeling. **Results.** The aggregation properties of the recombinant cytokine EMAP II and its complex with the dextran 70 were studied and the complex dimensions were determined by dynamic light scattering. The stabilization of the cytokine EMAP II with the dextran 70 was shown with increasing temperature in the range from 20 to 55° C. Using computer modelling of molecular docking, possible mechanisms for the aggregation of EMAP II cytokine and its stabilization with the dextran 70 were proposed. **Conclusions.** The results obtained indicate that the antitumor recombinant cytokine EMAP II forms protein aggregates with increasing temperature. The stability of the EMAP II structure in the complex expands the possibilities of studying the antitumor properties of this cytokine and its practical use.

Key words: cytokine EMAP II, dextran 70, aggregation, molecular docking, *E. coli* BL21(DE3) pLysE.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2015, – 93. – P. 52–79.
2. Pesarrodona M., Jauset T., Díaz-Riascos Z.V. et al. Antitumoral proteins to breast cancer by local administration of functional inclusion bodies // *Adv. Sci.* – 2019. – 6, №18. doi: 10.1002/advs.201900849.
3. Chaudhuri R., Cheng Y., Middaugh C.R., Volkin D.B. High-Throughput Biophysical Analysis of Protein Therapeutics to Examine Interrelationships Between Aggregate Formation and Conformational Stability // *AAPS J.* – 2013. – 16, № 1. – P. 48–64.
4. Bond M.D., Panek M.E., Zhang Z., Wang D., Mehndiratta P., Zhao H., Volkin D.B. 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.* – 2010. – 99, № 6. – P. 2582–2597.
5. Wuchner K., Büchler J., Spycher R., Dalmonte P., Volkin, D.B. Develop-



ment of a Microflow Digital Imaging Assay to Characterize Protein Particulates During Storage of a High Concentration IgG1 Monoclonal Antibody Formulation // *J. Pharm. Sci.* – 2010. – 99, №8. – P. 3343–3361.

6. *Wu F., Zhou Z., Su J., Wei L., Yuan W., Jin T.* Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins // *Nanoscale Res. Let.* – 2013. – 8, № 1. 197. doi: 10.1186/1556-276X-8-197.

7. *Reznikov A, Chaykovskaya L, Polyakova L, Kornelyuk A.* Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model // *Exp. Oncol.* – 2007. – 29. – P. 267–71.

8. *Lal C.V., Schwarz M.A.* Vascular Mediators in Chronic Lung Disease of Infancy: Role of Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (EMAP II) Birth Defects Res. – 2014. 100, № 1. – P. 180–188.

9. *Kolomiets-Babenko L.A., Bohorad-Kobelska O.S., Kovalchuk N.L., Spivak M. Ja., Kornelyuk A.I.* Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon // *Biotech. Acta.* – 2016. – 9, № 5. – P. 18–23.

10. *Berger A.C., Alexander H.R., Wu P.C.* et al. Tumor necrosis factor receptor I (p53) is upregulated on endothelial cell by exposure to the tumor derived cytokine endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II) // *Cytokine.* – 2000. – 12, № . – P. 992–1000.

11. *Kwon H.-S., Park M.C., Kim D.G., Cho K., Park Y.W., Han, J.M., Kim.* Identification of CD23 as a functional receptor for the proinflammatory cytokine AIMP1/p43 // *Journal of Cell Science.* – 2012. – 125, № 19. – P. 4620–4629.

12. *Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. – New York: C.S.H.L. Press, 1989.

13. *Бабенко Л.А., Скоробогатов О.Ю., Дубровський О.Л., Корнелюк О.І.* Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ в клітинах *E.coli* BL21(DE3)pLysE // *Мікр.Біотех.* – 2010. – № 3. – С. 21–31.

14. *Д.М. Ложко, І.Ю. Жуков, О.І. Корнелюк.* Бактеріальна експресія та мічення ізотопами ¹³C/¹⁵N цитокіну ЕМАР ІІ для структурних досліджень методом ЯМР-спектроскопії // *Віопол. Cell.* – 2011. – 27, № 4. – P. 273–278.

15. *Корнелюк О.І., Бабенко Л.А., Козлов О.В.* Наноконструктивний протипухлинний препарат. Патент № 64374. Опубліковано 10.11.2011, Бюл. N 21.

16. *Comeau S.R., Gatchell D.W., Vajda S., Camacho C.J.* ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes // *Bioinformatics.* – 2004. – 20, № 1. – P. 45–50.

17. *Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J.* PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – 1, № 33 (Web Server Issue). – P. W363–W367.

18. *Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E.* UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* – 2004. – 25, № 13. – P. 1605–1612.

19. *Trott O, Olson A.J.* AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // *J. Comp. Chem.* – 2010. – 31, № 2. – P. 455–461.



References

1. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015; (93):52 – 79.
2. Pesarrodona M, Jauset T, Díaz-Riascos ZV. et al. Antitumoral proteins to breast cancer by local administration of functional inclusion bodies. *Adv. Sci.* 2019;(18). doi: 10.1002/advs.201900849.
3. Chaudhuri R, Cheng Y, Middaugh CR, Volkin DB. High-Throughput Biophysical Analysis of Protein Therapeutics to Examine Interrelationships Between Aggregate Formation and Conformational Stability. *AAPS J.* 2013; (1): 48 – 64.
4. Bond MD, Panek ME, Zhang Z, Wang D, Mehndiratta P, Zhao H, Volkin DB. 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.* 2010; 99(6):2582 – 2597.
5. Wuchner K, Büchler J, Spycher R, Dalmonte P, Volkin DB. Development of a Microflow Digital Imaging Assay to Characterize Protein Particulates During Storage of a High Concentration IgG1 Monoclonal Antibody Formulation. *J. Pharm. Sci.* 2010; 99(8): 3343 – 3361.
6. Wu F, Zhou Z, Su J, Wei L, Yuan W, Jin T. Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins. *Nanoscale Res. Lett.* 2013; 8(1): 197. doi: 10.1186/1556-276X-8-197.
7. Reznikov A, Chaykovskaya L, Polyakova L, Kornelyuk A. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model. *Exp. Oncol.* 2007; (29): 267 – 71.
8. Lal CV, Schwarz MA. Vascular Mediators in Chronic Lung Disease of Infancy: Role of Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (EMAP II). *Birth Defects Res.* 2014; 100(1): 180 – 188.
9. Kolomiets-Babenko LA, Bohorad-Kobelska OS, Kovalchuk NL, Spivak MJa, Kornelyuk AI. Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon. *Biotech. Acta.* 2016; 9(5): 18 – 23.
10. Berger AC, Alexander HR, Wu PC et al. Tumor necrosis factor receptor I (p53) is upregulated on endothelial cell by exposure to the tumor derived cytokine endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II). *Cytokine.* 2000; (12): 992 – 1000.
11. Kwon HS, Park MC, Kim DG, Cho K, Park YW, Han JM. Identification of CD23 as a functional receptor for the proinflammatory cytokine AIMP1/p43. *Journal of Cell Science.* 2012; 125(19): 4620 – 4629.
12. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: C.S.H.L. Press; 1989; 2nd ed.
13. Babenko LA, Skorobogatov OYu, Dubrovskiy OL, Kornelyuk AI. Optimization bacterial expression of the antitumor cytokine EMAP II in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cells. *Microb.Biotech.* 2010; (3):21 – 31.
14. Lozhko DM, Zhukov IYu, Kornelyuk AI. Bacterial expression and isotope labeling of ¹³C/¹⁵N cytokine EMAP II for structural studies by NMR spectroscopy. *Biopol. Cell.* 2011; 27(4):273 – 278.



15. Nanocomposite anticancer drug. Kornelyuk A.I., Babenko L.A., Kozlov A.V. – № 64374. Opubl.10.11.2011 Byul. N 21.

16. Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. 2004; 20(1): 45 – 50.

17. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucl. Acids Res.* 2005; 1(33) (Web Server Issue): W363 – W367.

18. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin T.E. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004; 25(13): 1605 – 1612.

19. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comp. Chem.* 2010; 31(2): 455 – 461.

Стаття надійшла до редакції 05.11.2019 р.

