

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

доц. Нипорко Олексій Юрійович

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**ПРОТИПУХЛИНИЙ ЕФЕКТ ДОКСОРУБЦИНУ ГІДРОХЛОРИДУ З
РЕКОМБІНАНТНИМ CRM₁₉₇ НА ПЛОСКОКЛІТИННУ КАРЦИНОМУ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента спеціальності 091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»

Радевич Інни Ігорівни

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики

Нипорко Олексій Юрійович

Робота виконана у відділі молекулярної імунології
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України
під керівництвом д.б.н. **Колибо Дениса Володимировича**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024 р.

АНОТАЦІЯ

Радевич І.І. Протипухлинний ефект доксорубіцину гідрохлориду з рекомбінантним CRM₁₉₇ на плоскоклітинну карциному. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі проведено оцінку потенційного використання комплексів рекомбінантного білка CRM₁₉₇ та протипухлинного препарату доксорубіцину для таргетної терапії плоскоклітинної карциноми. Встановлено, що навантажені комплекси CRM₁₉₇-доксорубіцин вибірково пригнічують проліферацію клітин лінії *A431*, яка є моделлю плоскоклітинної карциноми. Отримані результати апробовані на конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2024» та опубліковані у статті журналу «*Biotechnologia Acta*», вони можуть бути використані для подальшої розробки протипухлинних препаратів на основі CRM₁₉₇ та доксорубіцину гідрохлориду для клінічного використання.

Ключові слова: CRM₁₉₇, доксорубіцину гідрохлорид, плоскоклітинна карцинома, таргетна доставка лікарських засобів

ABSTRACT

Radevych I. Anti-tumour effect of doxorubicin-hydrochloride with CRM₁₉₇ in squamous-cell carcinoma.

This work is dedicated to exploring the potential to inhibit the growth of tumour cells of squamous carcinoma cell line *A431* using CRM₁₉₇-doxorubicin complexes. Here we show that CRM₁₉₇-DOX complexes show evident inhibition of epidermoid carcinoma cell growth and can be used as treatment against epithelial tumours. The results of this study were presented at the «Current Issues of Biochemistry and Biotechnology – 2024» conference and published in the «*Biotechnologia Acta*» journal. The results can later be used to develop anti-tumour medicines based on CRM₁₉₇ and doxorubicin.

Key words: CRM₁₉₇, doxorubicin, epidermoid carcinoma, targeted treatment

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	7
1.1. Протипухлинна дія CRM ₁₉₇	7
1.2. Таргетна доставка лікарських препаратів за допомогою CRM ₁₉₇	8
1.3. Доксорубіцин як протипухлинний засіб. Обмеження у його застосуванні	
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	14
2.1. Матеріали та обладнання	14
2.2. Виділення та очищення рекомбінантних CRM ₁₉₇ , HB-EGF, EGFP та EGFP-HB-EGF	15
2.3. Аналітичне виділення CRM ₁₉₇	16
2.4. Культури еукаріотичних клітин	17
2.5. Протокова цитофлуориметрія.....	17
2.6. Навантаження комплексів CRM ₁₉₇ та доксорубіцину гідрохлориду	18
2.7. Тест на проліферацію клітин (МТТ-тест).....	18
2.8. Обробка та представлення результатів.....	19
РОЗДІЛ 3. Результати та обговорення	20
ВИСНОВКИ.....	27
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	28

ВСТУП

Рак посідає друге місце за розповсюдженістю серед причин смерті від хвороб і є однією з головних проблем охорони здоров'я в усьому світі. У 2020 році лише в Україні було зареєстровано близько 113 тисяч нових випадків захворювання на рак, з яких понад 55 тисяч летальних [1].

Згідно з BCS (біофармацевтичною системою класифікації), більшість протипухлинних препаратів, наразі відкритих, відносяться до класу II (низька розчинність, висока проникність) і класу IV (низька розчинність, низька проникність). Після перорального застосування ці сполуки демонструють низьку біодоступність через низьку розчинність або проникність крізь мембрани клітин [2].

Тому дуже важливо, щоб препарат «був доставлений в потрібне місце, у потрібній концентрації протягом потрібного періоду часу». Ці аспекти вказують на зростаючу потребу в міждисциплінарних підходах для доставки ліків до тканин-мішеней [3]. Зростає зацікавленість у таргетній доставці протипухлинних препаратів, які мають низьку біологічну доступність та/або володіють загальною цитотоксичністю. Використання носіїв лікарських препаратів дозволить збільшити ефективність та безпечність протипухлинної терапії.

Одним із препаратів, що потребує таргетної доставки є доксорубіцину гідрохлорид – протипухлинний лікарський засіб, схвалений Управлінням з продовольства і медикаментів США (FDA) для терапії певних типів раку, таких як рак яєчників та множинна мієлома [4]. У зв'язку з його неспецифічною цитотоксичністю та великою кількістю побічних ефектів, серед яких гепато-, кардіо- та нефротоксичність, застосування доксорубіцину певною мірою обмежене, зокрема його з обережністю застосовують у літніх людей. Для подолання обмежень, пов'язаних з використанням доксорубіцину було зроблено багато спроб хімічних модифікацій цього препарату, які призвели до змін у фармакокінетиці цієї сполуки, її токсичності та появи

побічних ефектів, утім жоден із цих методів не був успішним у достатньому зменшенні токсичних ефектів під час тестування на тваринних моделях або в клінічних випробуваннях на людях. Важливо докласти зусиль для пошуку більш ефективних методів доставки доксорубіцину зі збереженням або посиленням його терапевтичного ефекту проти раку.

Відтак потенційною молекулярною платформою для таргетної доставки лікарських засобів є білок CRM₁₉₇ (cross-reactive material 197), який є нетоксичним варіантом дифтерійного токсину (ДТ). Загалом було показано, що CRM₁₉₇ має знижену токсичність, зберігаючи при цьому такі ж антигенні та імуностимулюючі властивості, як і дифтерійний токсин, що дозволяє використовувати його як безпечний носій для антигенів небілкової природи (зокрема, капсульних полісахаридів патогенних бактерій) у кон'югованих вакцинах. Окрім його здатності зв'язувати різного роду антигенні субстанції у складі вакцинних препаратів, зростає інтерес до CRM₁₉₇ через потенційну протипухлинну активність, пов'язану з його здатністю зв'язувати та блокувати розчинну форму фактору росту HB-EGF, яка високо експресується в деяких видах раку в людини [5].

Одним із типів раку, при якому на поверхні пухлинних клітин надмірно експресуються рецептори HB-EGF, а саме EGFR1 та EGFR4, є плоскоклітинна карцинома, з якої для досліджень виділено клітинну лінію A431 [6]. Цей тип раку уражає клітини плоского епітелію з локалізацією метастаз на шкірі, в легенях, у статевих органах та різних ділянках голови і шиї. У 2019 кількість випадків плоскоклітинної карциноми у світі сягнула 2,4 мільйона, з них 56 тисяч – летальні [7]. Водночас великий відсоток випадків плоскоклітинної карциноми залишається недодіагностованим, а її глобальне поширення – недооціненим, оскільки не всі лікарні та не всі країни вносять статистику стосовно цього виду раку.

Враховуючи вище сказане, метою роботи стало дослідження ефективності комплексів нетоксичного дифтерійного токсоду CRM₁₉₇ та доксорубіцину гідрохлориду на моделі плоскоклітинної карциноми.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

- 1) Виділити та очистити рекомбінантний CRM₁₉₇;
- 2) Утворити стабільні комплекси CRM₁₉₇ та доксорубіцину гідрохлориду;
- 3) Перевірити модель клітин *A431* на відповідність вимогам для таргетної доставки лікарських засобів;
- 4) Оцінити вплив CRM₁₉₇, доксорубіцину та їхніх комплексів на проліферацію клітин плоскоклітинної карциноми та здорових клітин.

Отримані результати можуть бути використані для подальшої розробки протипухлинних препаратів на основі нетоксичного похідного дифтерійного токсину CRM₁₉₇ та доксорубіцину гідрохлориду. Частина результатів було апробовано на конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2024» та опубліковано у статті «Cytostatic Effect of Doxorubicin-hydrochloride with CRM197, an Inhibitor of HB-EGF, in Squamous-cell Carcinoma» журналу «Biotechnologia Acta».

Робота виконана у розрізі наукової проблематики відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

РОЗДІЛ 1.

Огляд літератури

1.1. Протипухлинна дія CRM₁₉₇

Нещодавні дослідження показали, що CRM₁₉₇ може відігравати важливу роль у лікуванні та профілактиці раку з несприятливими прогнозами шляхом інгібування гепарин-зв'язуючого епідермального фактору росту (HB-EGF). HB-EGF – це рецептор епідермального фактору росту (EGFR), який експресується зі схожим розподілом у тканинах у різних ссавців, включаючи людей, мавп, щурів та мишей. EGFR та його ліганди беруть участь у розвитку, проліферації та диференціації клітин і можуть індукувати утворення пухлин. CRM₁₉₇ та нативний дифтерійний токсин мають подібну спорідненість до рецептора дифтерійного токсину (DTR), який має ідентичну амінокислотну послідовність з попередником HB-EGF про-HB-EGF [8]. Відомо, що системне введення дифтерійного токсину індукує швидку регресію аденокарцином легень мишей, що експресують людський EGFR, за відсутності трансгенного алеля, що містить рецептор людського дифтерійного токсину [9]. Тобто, протипухлинна дія дифтерійного токсину зумовлена саме специфічним зв'язуванням з про-HB-EGF.

CRM₁₉₇ зв'язується з розчинною формою HB-EGF, так само як і з про-HB-EGF, та інгібує мітотичну дію HB-EGF, запобігаючи його зв'язуванню з рецепторами EGFR1 і EGFR4. У той час як CRM₁₉₇ нетоксичний для клітин *Vero*, він токсичний для клітин *Vero-H*, трансфікованої клітинної лінії, отриманої з клітин *Vero*, що надмірно експресують людський про-HB-EGF. Очікується, що CRM₁₉₇ буде цитотоксичним до ракових клітин, які експресують високий рівень про-HB-EGF, а також блокувати мітогенну активність секретованого HB-EGF. У хворих на рак, CRM₁₉₇, введений підшкірно, чинив певний ступінь біологічної протипухлинної активності [8]. Зв'язування CRM₁₉₇ з HB-EGF пригнічує проліферацію та ангиогенез в межах ракових пухлин, одночасно індукуючи апоптоз *in vivo*. Ці протиракові ефекти

CRM₁₉₇ також були виявлені на клітинних лініях раку товстої кишки *SW480*, *SW620*, *HCT116*, *CaCo-2* і *HT-29* [10].

1.2. Таргетна доставка лікарських препаратів за допомогою CRM₁₉₇

Цільова доставка хіміотерапевтичних препаратів для специфічного некрозу ракових клітин та з мінімальним впливом на нормальні клітини, становить великий виклик для дослідників і науковців. Попри те, що було проведено багато досліджень, спрямованих на вивчення таргетованої доставки лікарських засобів, визначення найбільш перспективної стратегії, здатної обійти неспецифічну цитотоксичність, все ще залишається серйозною проблемою [11]. Доставка ліків у визначені компартменти всередині клітин називається клітинним та внутрішньоклітинним таргетингом.

Таргетна система доставки ліків – це система доставки ліків в організм, яка характеризується транспортуванням певного лікарського засобу вибірково у визначену хвору ділянку з метою досягнення фармакологічного ефекту саме в цій ділянці та мінімізації несприятливого впливу на весь організм [12].

Існує два способи таргетингу лікарського засобу, а саме: активний та пасивний таргетинг. В активному режимі таргетинг здійснюється на специфічний маркер, який експресується виключно у хворих клітинах, але не в нормальних. Стратегія активного таргетингу базується на композиційному нанесенні ліків на поверхню носіїв – пухлиноспецифічних лігандів, таких як аптамери, антитіла та рецептори, мішені до яких гіперекспресовані пухлинною клітиною. Наприклад, CA-125 є одним з біомаркерів, який надмірно експресується при раку яєчників і може бути мішенню для механізмів активного таргетингу, так само як фактор росту HB-EGF, що виділений з кількох пухлинних клітинних ліній. При пасивному таргетингу накопичення носія та активної речовини поблизу локалізації пухлину досягається головним чином завдяки розміру полімерів [13].

У деяких випадках використовуються пептиди, що проникають у клітини, які можуть полегшити транслокацію протипухлинного агента через клітинну мембрану до бажаного місця його застосування. Вибрані приклади препаратів, що можуть входити до складу кон'югатів, у цій галузі: доксорубіцин (Dox), даунорубіцин (Dau), метотрексат (Mtx) та паклітаксел (таксол) [14].

CRM₁₉₇ може мати потенційне застосування для цільової доставки ліків через гематоенцефалічний бар'єр, який обмежує доставку ліків до мозку. Для вирішення цієї проблеми було проаналізовано транспорт, опосередкований рецепторами. HB-EGF конститутивно експресується на гематоенцефалічному бар'єрі, нейронах і гліальних клітинах, і його експресія сильно регулюється при таких станах, як хвороба Альцгеймера, розсіяний склероз, інсульт, епілепсія та енцефаліт. CRM₁₉₇, як зазначено вище, інгібує HB-EGF і був кон'югований з такими білками, як пероксидаза хрому (HRP), для оцінки ефективності транспортування через гематоенцефалічний бар'єр. У моделі культури клітин *in vitro* CRM₁₉₇-HRP транспортувалася шляхом апікально-базального трансцитозу, що, ймовірно, є опосередкованим кавеолами шляхом. CRM₁₉₇ може індукувати значне збільшення проникності гематоенцефалічного бар'єру, збільшення кількості піноцитозних везикул і перерозподіл асоційованих з щільними з'єднаннями білків у мікросудинах мозку [8].

Повідомлялося, що CRM₁₉₇ піддається трансцитозу і впливає на сигнальний шлях PI3K/Akt, що впливає на ендоцитоз [15]. Показано, що наночастинки, навантажені CRM₁₉₇, краще накопичуються у клітинах, а поєднання наночастинок та CRM₁₉₇ може бути використаним для доставки в клітини лікарських засобів, таких як препарат для антиретровірусної терапії зидовудин [16].

Використання CRM₁₉₇ як носія для таргетної доставки збільшило ефективність протипухлинного препарату паклітакселу та призвело до

зменшення об'єму пухлини у 2D клітинних моделях (клітинна лінія *SKOV-3*) та моделях мишей *SKOV-3* з надмірною експресією HB-EGF [17].

Підсумовуючи вище сказане, CRM₁₉₇ зберігає усі властивості дифтерійного токсину, включно із здатністю зв'язуватися із дифтерійними рецепторами на клітинах, але не є токсичним для організму людини. Разом із його високою афінністю та ад'ювантними властивостями, це робить CRM₁₉₇ потенційним кандидатом на використання у якості носія різноманітних лікарських засобів.

1.3. Доксорубіцин як протипухлинний засіб. Обмеження у його застосуванні

Доксорубіцину гідрохлорид був відкритий компанією Farmitalia у 1950-х роках. Його виробляли, використовуючи мутований варіант бактерії *S. peucetius var. caesius*. Цей лікарський засіб виявився напрочуд активним проти різних типів солідних пухлин у тварин і в клінічних випробуваннях, і незабаром був впроваджений у клінічну практику. Хоча антрацикліни, до яких належить і доксорубіцин, були відкриті понад 50 років тому, вони все ще активно використовуються для лікування різних типів солідних пухлин і гематологічних злоякісних новоутворень. Наразі ці препарати залишаються одними з найефективніших протипухлинних засобів [18].

Доксорубіцин має значний терапевтичний потенціал і визнаний одним з найефективніших хіміотерапевтичних препаратів, схвалених Управлінням з продовольства і медикаментів США (FDA) для лікування різних видів раку, таких як рак молочної залози, карцинома, саркома та гематологічні злоякісні новоутворення [19].

Доксорубіцин є основним компонентом схем протиракового лікування, які зараз мають клінічне застосування. Однак точні механізми дії доксорубіцину не до кінця зрозумілі. Нові дані вказують на плейотропну протиракову активність доксорубіцину, включаючи його внесок у пошкодження ДНК, утворення активних форм кисню (АФК), апоптоз,

старіння, аутофагію, фероптоз та індукцію піроптозу в ракових клітинах, а також на його імуномодулюючу роль. Уже відомо, що протиракову активність доксорубіцину можна пояснити здатністю препарату інтеркалювати в ДНК, інгібувати топоізомеразу II, порушувати функцію мітохондрій, а також спричиняти генерацію вільних радикалів та оксидативний стрес.

Доксорубіцин не тільки виявляє пряму цитотоксичну дію на ракові клітини, але й використовує імунну систему для знищення ракових клітин шляхом запуску реакції CD8⁺ Т-клітин [20]. Більше того, попереднє лікування доксорубіцином у пацієнтів з раком може бути ефективною стратегією для посилення протиракової імунної відповіді шляхом збільшення антиген-специфічної імунної відповіді CD4⁺ Th1 [21].

Терапія доксорубіцином індукує посилення регуляції пов'язаних з імунною відповіддю генів PD-1/PD-L1 та Т-клітинної цитотоксичності. Це супроводжується індукцією шляху тирозин-протеїнкінази JAK (JAK-STAT) та сигналізації фактора некрозу пухлин α (TNF- α) у пацієнтів з раком молочної залози [22] і може призвести до посилення регуляції PD-L1 у ракових клітинах [23].

Попри широке застосування антрациклінів, і доксорубіцину зокрема, токсичні ефекти цих препаратів є багатогранними, причому кардіотоксичність є найбільш відомим і всебічно вивченим несприятливим ефектом. Крім того, можливе пошкодження інших органів, включно з мозком, печінкою та нирками [20]. Крім того, більшість летальних побічних ефектів доксорубіцину розвиваються дозозалежно, тоді як його протипухлинна ефективність проявляється переважно при введенні у високих дозах [24,25].

Численні дослідження були спрямовані на зменшення несприятливих ефектів доксорубіцину, включаючи використання речовин, які мають антиоксидантну та/або антиапоптотичну активність, створення ефективних систем доставки, розробку аналогів або попередників доксорубіцину [26]. З

іншого боку, деякі з цих методів не були успішними у зменшенні токсичних ефектів антрациклінів під час тестування на тваринних моделях або в клінічних випробуваннях на людях. Важливо докласти зусиль для пошуку більш ефективних методів боротьби з токсичністю доксорубіцину зі збереженням або посиленням його терапевтичного ефекту проти раку [19].

У 1995 році було схвалено перший ліпосомальний препарат доксорубіцину для лікування раку яєчників, саркоми Капоші та мієлоїдної меланоми [27]. Таргетовані ліпосомальні препарати доксорубіцину є наступним поколінням ліпосомальних систем доставки ліків і були створені для підвищення селективності ліпосом до ракових тканин. Враховуючи їх високу специфічність до антигенів-мішеней, антитіла та фрагменти антитіл є найпопулярнішими цільовими фрагментами для ліпосом. Інтерес до модифікованих антитілами ліпосом для цільової доставки протиракових препаратів є високим [28].

Для подолання обмежень, пов'язаних з використанням антрациклінів, таких як короткий час утримання, кардіотоксичність, полірезистентність та швидке виведення, було зроблено багато спроб хімічних модифікацій. Ці модифікації призвели до змін у фармакокінетиці сполук, що, в свою чергу, вплинуло на їх токсичність та побічні ефекти [29]. Розроблено та синтезовано комплекси холестерол-доксорубіцин, похідні жирних кислот-доксорубіцин, формамідин-доксорубіцин, похідні дексаметазону, гідразонові похідні, стероїдні антиестрогенні біокон'югати доксорубіцину. Ці сполуки показали зміни в ефективності порівняно з доксорубіцином, причому деякі з них є більш ефективними, а інші – менш токсичними [4,30,31].

Раніше було проведено численні дослідження нанопрепаратів доксорубіцину, таких як ліпосоми, полімерні міцели та наногелі [32]. Хоча було показано, що деякі нанопрепарати доксорубіцину збільшують терапевтичну ефективність порівняно зі стандартними препаратами, вони все ще стикаються з такими перешкодами, як неоптимальні властивості дифузії та проникнення, складні схеми вивільнення, імуногенні реакції та небажані

взаємодії з сироватковими білками, що змушує проводити їх поглиблені дослідження *in vitro* та *in vivo* [19,33].

Окрім дозозалежних побічних ефектів, токсичність для мозку, печінки та нирок також спричинена поганим транспортуванням доксорубіцину в пухлину-мішень [34]. З усього сказаного вище можна зробити висновок, що доксорубіцин потребує ефективної системи таргетної доставки для мінімізування токсичності і максимізування терапевтичних переваг.

РОЗДІЛ 2.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження проводили в лабораторії імунобіології відділу молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

2.1. Матеріали та обладнання

У роботі були використані наступні реактиви: середовище для бактерій LB («Sigma», США), чашки Петрі, IPTG (Thermo Scientific), додецилсульфат натрію (ДСН/SDS) («Sigma-Aldrich», США), Ni²⁺-NTA агароза (Qiagen, Німеччина), тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), трицин, акриламід, N, N' – метилен-біс-акриламід, бичачий сироватковий альбумін (БСА/BSA), кумассі діамантовий блакитний G-250, трис(гідроксиметил)амінометан (Tris), сечовина, імідазол («Sigma-Aldrich», США), диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, оцтова кислота, етиловий спирт, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), NaOH, HCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, Na₂CO₃, NaCl, KCl, CaCl₂ (Міранда-С, Україна), глюкоза, ампіцилін, канаміцин (Київмедпрепарат, Україна), пропідій йодид, маркери для електрофорезу протеїнів та нуклеїнових кислот, коктейль інгібіторів протеїназ (prod #1861279, Thermo Scientific), культуральні флакони та чашки для культури тканин (Greiner Bio One, Німеччина), середовище RPMI-1640 з L-глутаміном та індикатором, середовище Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), фетальна бичача сироватка (ФБС), стрептоміцин, амфотеріцин, пеніцилін, МТТ (3-(4,5-діметилтіазоліл-2)-2,5-діфенілтетразоліум бромід), одноразовий лабораторний посуд (Delta Lab, Іспанія) та інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а.

Робота передбачала використання наступного обладнання: аналітичні ваги WAA 210/C/1 (Salex, Данія), рН-метр CyberScan 510 (Eutech Instruments, Сінгапур), нагрівач зразків TDD-120 (Biosan, Латвія), мікроцентрифуга А-14

(Joan, Франція), шафа-ламінар (Holten, Франція), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M, орбітальний шейкер-термостат ES-20, CO₂-інкубатор (Sartorius, Німеччина), камера для вертикального електрофорезу (Bio-Rad, США), спектрофотометр GeneQuantoPro (Amersham Biosciences, США), спектрофлуориметр QuantaMaster 400 (Photon Technology International, Канада), мультилункові рідери μ Quant ELx800 (BioTek, США), протоковий цитофлуориметр DxFLEx (Beckman Coulter, США).

Склад та характеристики деяких буферів, які використовувалися в роботі: анодний (0.2 М TRIS, pH 8.9) та катодний (0.1 М TRIS, 0.1% SDS, 0.1 М трицин) буфери для гель-електрофорезу, гелевий буфер для електрофорезу (2 М TRIS, 0.3% SDS, pH 8.45), PBS (350 мМ NaCl, 7 мМ KCl, 25 мМ Na₂HPO₄, 5 мМ KH₂PO₄).

2.2. Виділення та очищення рекомбінантних CRM₁₉₇, HB-EGF, EGFP та EGFP-HB-EGF

CRM₁₉₇ виробляється шляхом стимулювання ферментації у *Escherichia coli* рекомбінантного штаму Rosetta. Білок виділяється в надосадову рідину, яку відновлюють шляхом центрифугування, подальше очищення досягається за допомогою хроматографії з наступним діалізом.

Для виділення рекомбінантних білків CRM₁₉₇ та HB-EGF культуру *E. coli*, що містила плазмиди pET28(a)-CRM₁₉₇ та pET32(a)-HB-EGF відповідно, нарощували у середовищі LB з додаванням антибіотика (канаміцину чи ампіциліну) протягом близько двох годин при 37°C. Білки EGFP та EGFP-HB-EGF нарощували за таких самих умов за допомогою конструктів на основі плазмиди pET28(a). Надалі вимірювали оптичну щільність середовища, коли вона досягала 0,3-0,5 додавали IPTG у концентрації 1мМ, та продовжували нарощування культури протягом ще 3 годин при 30°C.

Усі культури надалі центрифугували, а осад ресуспендували окремо у буфері з 6М сечовини. Відтак клітинну суспензію інкубували з інгібіторами

протеаз протягом 15 хвилин при 37°C, після чого гомогенізували за допомогою ультразвукового дезінтегратора. Гомогенізовану суспензію центрифугували і збирали супернатанти, що містили CRM₁₉₇, HB-EGF, EGFP та EGFP-HB-EGF, які надалі використовували для очищення відповідних білків.

Рекомбінантні білки CRM₁₉₇, HB-EGF, EGFP та EGFP-HB-EGF із PolyHis-тагом очищували за допомогою Ni²⁺-NTA афінної хроматографії з рефолдингом шляхом послідовного зменшення концентрації сечовини. Елюати відповідних білків надалі діалізували у PBS [35].

Аліквоти білків з буфером, що містив додецилсульфат натрію (SDS), були використані для поліакриламід гель-електрофорезу (10% SDS-PAGE). Гель забарвлювали кумассі діамантовим блакитним G-250. Успішне виділення CRM₁₉₇ та HB-EGF підтвердили за появою смуг на гелі на рівні ~58 кДа та ~10 кДа відповідно.

2.3. Аналітичне виділення CRM₁₉₇

Окремо проводили аналітичне виділення CRM₁₉₇ для визначення фракції, з якої він виділяється: розчинна (цитоплазматична) чи нерозчинна (тільця-включення). Для цього від нарощеної культури до центрифугування відбирали аліквоту 1,5-2 мл, яку далі центрифугували протягом 20 хвилин при 13,4 тис. обертів. Осад ресуспендували у буфері, що не містив сечовини, гомогенізували клітини за допомогою ультразвукового дезінтегратора та знову центрифугували. Збирали надосадову рідину, яка містила фракцію розчинних білків клітин *E.coli*.

Для отримання нерозчинної фракції одержаний осад ресуспендували у буфері з 6М сечовиною, після чого гомогенізували клітини та центрифугували. Збирали надосадову рідину, яка містила фракцію нерозчинних білків клітин *E.coli*.

Аліквоту розчинної та нерозчинної фракцій, а також фракції АII, яка містила всі клітинні компоненти, використовували у подальшому для гелево-електрофорезу.

2.4. Культури еукаріотичних клітин

Для експериментів використовували 3 лінії клітин: плоскоклітинної (епідермоїдної) карциноми людини *A431*, ембріональних фібробластів миші *3T3* та клітин нирки Африканської зеленої мавпи *Vero*.

Усі клітинні лінії вирощували в інкубаторі зі сталою вологістю, 5% вмістом CO₂ та при температурі 37°C. Для вирощування клітин використовували середовища DMEM та RPMI-1640 з додаванням 10% термічно інактивованої ФБС та антибіотиків. Надалі клітини використовували для протокової цитофлуориметрії та МТТ-тесту.

2.5. Протокова цитофлуориметрія

Усі вимірювання на протоковому цитофлуориметрі DxFLEX виконували згідно зі стандартним протоколом для цього приладу.

Підготовку проб починали з відмивання конфлюентної культури клітин *A431* за допомогою 30 mM EDTA протягом 15 хвилин за 37°C та перемішування при 100 об/хв. Суспензію клітин переносили в пробірки для подальшого центрифугування за 350g протягом 8 хвилин. Надосадову рідину видаляли, а осад ресуспендували у новому об'ємі PBS і знову центрифугували. Процедуру повторювали двічі.

Отриманий осад ресуспендували у ЗФР з додаванням 1% BSA та 0,1% азиду натрію з розрахунком 500 000 клітин на пробірку. Далі суспензію клітин по 50 мкл переносили в мікропробірки і додавали контрольні речовини (рекомбінантні EGFP та EGFP-NB-EGF у кількості 5 та 10 мкг відповідно). Проби інкубували при 4°C, щоб дією низьких температур, а також азиду натрію, інгібувати фагоцитоз досліджуваних білків.

Далі проби центрифугували на 10 тис. обертів на хвилину та промивали ЗФР – 1% BSA – 0,1% азид натрію. Процедуру повторювали тричі. Осад ресуспендували в 1 мл ЗФР – 1% BSA – 0,1% азид натрію і отриману суспензію використовували для цитофлуориметричного аналізу.

2.6. Навантаження комплексів CRM₁₉₇ та доксорубіцину гідрохлориду

Для утворення суміші рекомбінантного CRM₁₉₇ та доксорубіцину гідрохлориду (надалі CRM₁₉₇ + DOX) 5μМ доксорубіцину розчиняли в 1 мл 20 мМ буферу Tris-HCl. Надалі розчин доксорубіцину додавали до 500 нг білку. Далі гетерогенний розчин залишили на 12 годин при 4°C та активному перемішуванні.

Для утворення навантажених комплексів рекомбінантного CRM₁₉₇ та доксорубіцину гідрохлориду (надалі loaded CRM₁₉₇-DOX) повторювали ідентичні дії з подальшим діалізом у PBS.

2.7. Тест на проліферацію клітин (МТТ-тест)

МТТ – колориметричний метод оцінки метаболічної активності клітин за активністю мітохондріальних дегідрогеназ, який також може бути використаний для оцінки проліферативної активності клітинної культури та для визначення цитотоксичного/цитостатичного впливу різних сполук [36]. Метод базується на здатності мітохондріальних ферментів живої клітини перетворювати сіль жовтого кольору МТТ – 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразоліум бромід на кристалічний формазан фіолетового кольору [37].

Клітини ліній *A431*, *3T3* та *Vero* є адгерентними, тому після внесення в лунки 96-лункового планшету по 100 мкл суспензії, що містила 25 000 клітин в середовищі DMEM з додаванням 10% ФБС та антибіотиків, їх залишали на 24 години для прикріплення до дна лунок. Надалі вміст лунок видалили, двічі промили їх PBS і додали свіже культуральне середовище, яке не містило ФБС, разом із контрольними речовинами. Контрольні сполуки додавали у

наступних концентраціях: DOX – 5 μ M, HB-EGF – 500 нг/мл, LPS – 500 нг/мл, CRM₁₉₇ – 500 нг/мл та 1000 нг/мл, CRM₁₉₇ + DOX – 500 нг білку та 5 μ M доксорубіцину, loaded CRM₁₉₇-DOX – 500 нг/мл (в перерахунку на білок).

Планшет інкубували протягом 48 год за температури 37 $^{\circ}$ та присутності 5% CO₂. Після інкубації вміст лунок видаляли (без промивання PBS), додавали до клітин в лунках планшету МТТ-реактив в концентрації 0,5 мг/мл та культивували за тих самих умов протягом 3 год. Надалі до клітин додавали по 100 мкл розчину 10% ДСН у ДМСО, підкисленого 0,04 М HCl, та інкубували протягом 15 хв за 37 $^{\circ}$ при активному перемішуванні. Кількість формазану, що утворився, вимірювали фотометрично при довжині хвилі 570 нм (референтна довжина хвилі – 630 нм), оскільки оптична густина корелює з активністю мітохондріальних ензимів, і, відповідно, ступенем проліферації клітин [38].

2.8. Обробка та представлення результатів

Статистичну обробку проводили з використанням веб-ресурсу Statistics Kingdom. Для оцінки нормальності розподілу використовували t-критерій Стьюдента та тест Левіна. Тести Шапіро-Вілка, one-way ANOVA та Tukey–Kramer показали значну різницю між тестовими та контрольними групами ($P < 0.05$). Оформлення та графічне представлення результатів виконували за допомогою стандартного пакета Microsoft Office.

РОЗДІЛ 3.

Результати та обговорення

Виділення та очищення рекомбінантних CRM₁₉₇, HB-EGF та EGFP.

Після хроматографічного очищення рекомбінантного зеленого флуоресцентного білка (EGFP) та комплексу зеленого флуоресцентного білка з гепарин-зв'язувальним епітеліальним фактором росту (EGFP-HB-EGF), їхню чистоту та концентрацію оцінювали електрофоретично (Рис. 3.1). Фракції відповідних білків після діалізу (А та Е) використовували для подальшого цитофлуориметричного аналізу.

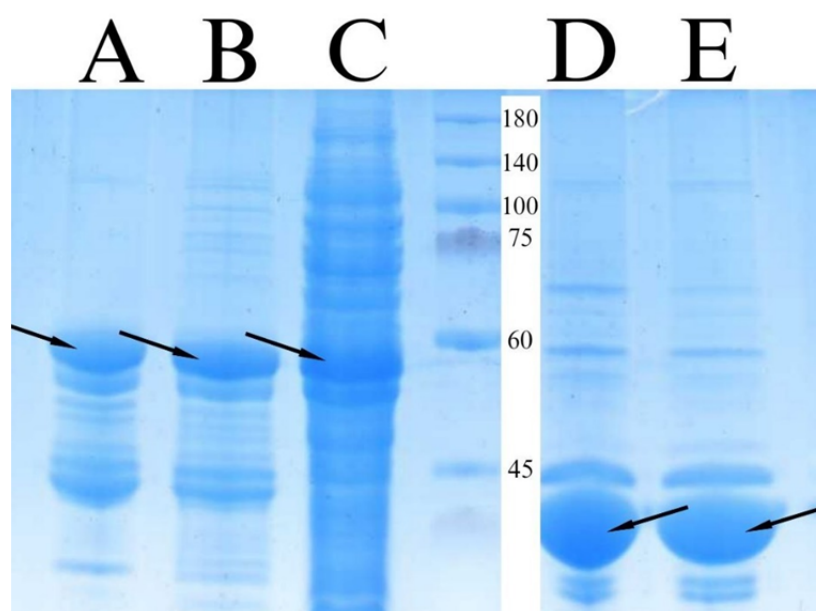


Рисунок 3.1 – Результати SDS-PAGE для EGFP та EGFP-HB-EGF.

Фракція з EGFP-HB-EGF до хроматографічного очищення (С), до діалізу (В) та після діалізу (А), фракція EGFP до (D) та після діалізу (Е).

Аналітичне виділення з подальшим електрофоретичним аналізом (Рис. 3.2) показало, що рекомбінантний нетоксичний варіант дифтерійного токсину (CRM₁₉₇) виділяється із тілець-включень (нерозчинна форма) (Рис. 3.2, В), оскільки у цитоплазматичній фракції (розчинна форма) (Рис. 3.2, С) на електрофореграмі смуги не спостерігалося. Ці результати узгоджуються з літературними відомостями про експресію CRM₁₉₇ у культурах *E.coli* [39].

Очищений та елюйований рекомбінантний білок CRM₁₉₇ у концентрації приблизно 0,1 мг/мл з фракції С (Рис. 3.3) було використано пізніше для створення комплексів з доксорубіцином та проведення МТТ-тесту.

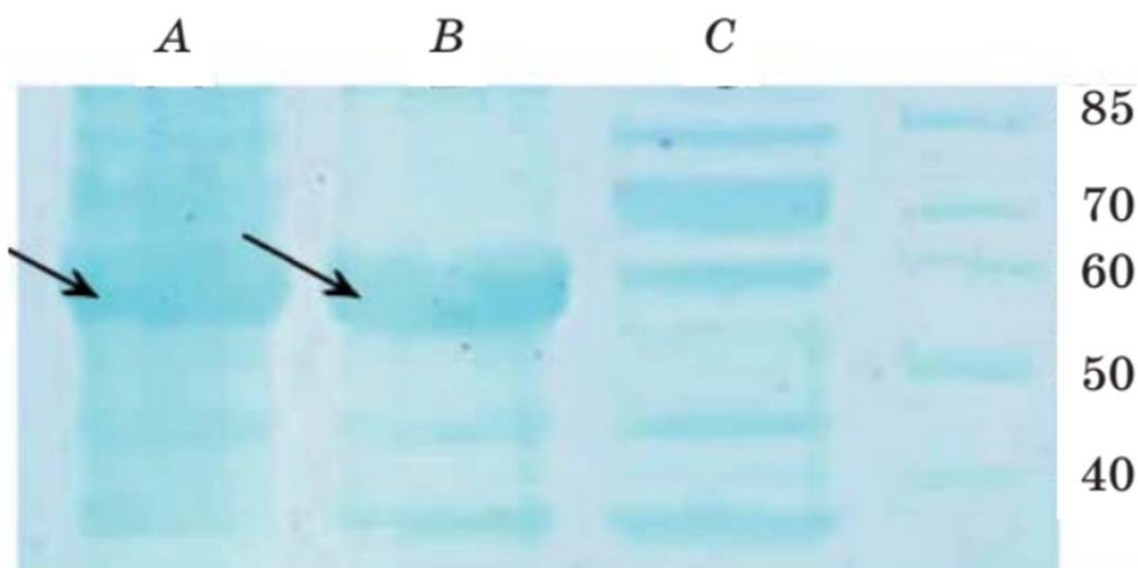


Рисунок 3.2 – Електрофореграма аналітичного виділення CRM₁₉₇. Лізат клітин (А) та нерозчинна фракція (В) містять CRM₁₉₇, тоді як розчинна (С) – не містить.

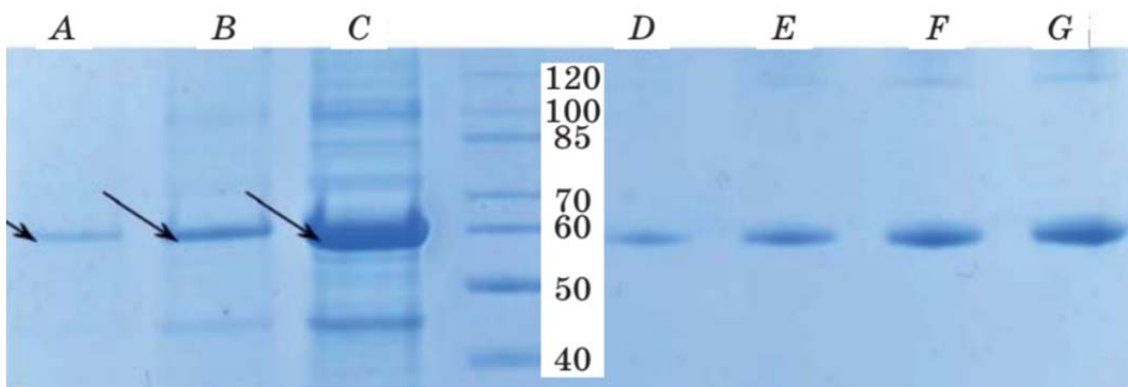


Рисунок 3.3 – Результати SDS-PAGE для CRM₁₉₇. Хроматографічні фракції А–С містять різні концентрації CRM₁₉₇, відомі концентрації 0,025 мг/мл (D), 0,05 мг/мл (E), 0,075 мг/мл (F) та 0,1 мг/мл (G) бичачого сироваткового альбуміну (BSA) використані для визначення концентрації CRM₁₉₇.

Перевірка адекватності моделі клітин A431.

Клітинна лінія *A431* – пухлиногенна лінія клітин, отримана з плоскоклітинної (епідермоїдної) карциноми. Ця клітинна лінія надмірно

експресує EGFR1 та EGFR4, рецептори до гепарин-зв'язувального епітеліального фактора росту HB-EGF [6], інгібітором якого є CRM₁₉₇. Це підтверджують результати протокової цитофлуориметрії, проведеної з використанням контрольних клітин (без додавання жодних білків) і клітин, до яких додавали зелений флуоресцентний білок (EGFP) та комплекс зеленого флуоресцентного білка з гепарин-зв'язувальним епітеліальним фактором росту (EGFP-HB-EGF) відповідно.

Як видно з Рис. 3.4, клітини, до яких додавали чистий EGFP (Рис. 3.4, В), мають флуоресценцію, подібну до контрольних клітин (Рис. 3.4, А), що вказує на те, що сам по собі EGFP не зв'язується з клітинами лінії *A431*. Флуоресценція на рівні 0,21 відсотка є слідовою і швидше за все виникає внаслідок неспецифічного зв'язування EGFP на поверхні клітин, яке не до кінця було зруйноване під час відмивання клітин від білка.

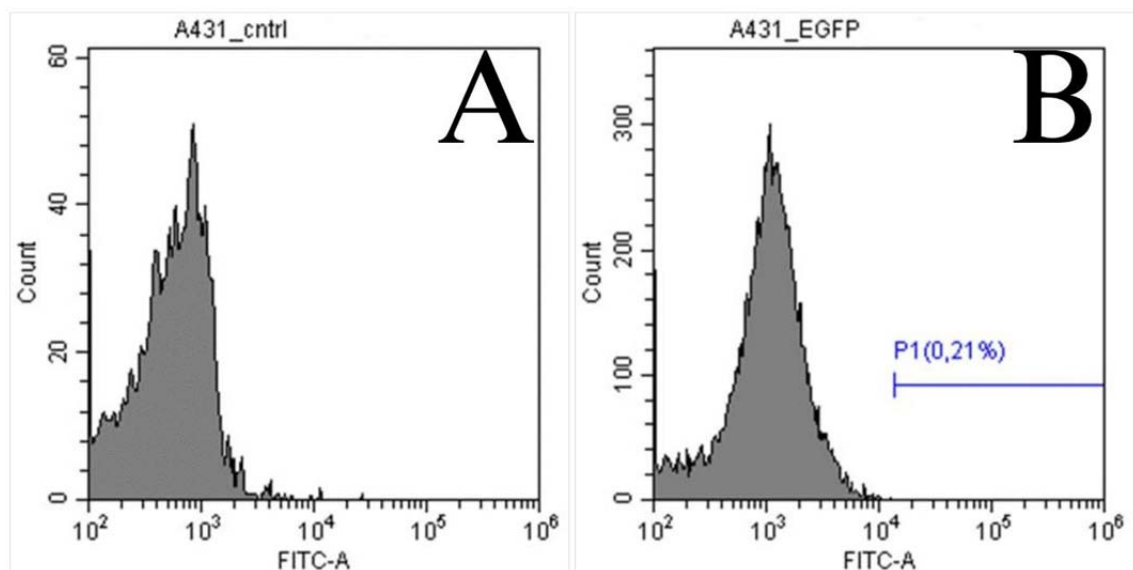


Рисунок 3.4 – Графік протокової цитофлуориметрії для контрольних (А) та оброблених EGFP (В) клітин лінії *A431*. Клітини не зв'язуються з чистим EGFP і зсув флуоресценції не спостерігаємо.

На противагу цьому, на Рис. 3.5. спостерігаємо значний зсув флуоресценції. Він означає, що клітини лінії *A431* з високою афінністю зв'язуються з комплексом EGFP-HB-EGF. Оскільки ми вже з'ясували, що вони не здатні зв'язуватися з білком EGFP, то зв'язування відбувається за рахунок взаємодії HB-EGF з його рецепторами EGFR1 та EGFR4.

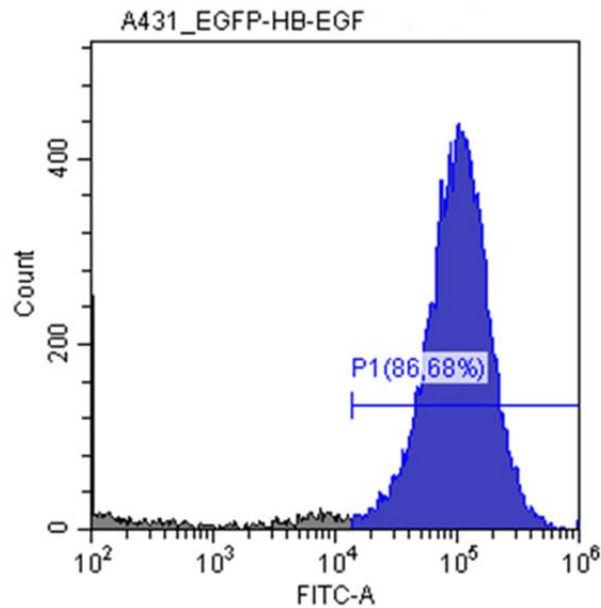


Рисунок 3.5 – Графік протокової цитофлуориметрії для клітин лінії *A431*, оброблених комплексом EGFP-HB-EGF. Клітини зв’язуються з комплексом з високою афінністю, тому спостерігаємо зсув флуоресценції.

Оцінка ступеня проліферації клітин (MTT-тест).

Для визначення токсичних доз доксорубіцину гідрохлориду та рекомбінантного CRM₁₉₇ було проведено проліферативний тест на культурі фібробластів мишей 3T3, яка, як відомо з літератури [40], не експресує рецепторів до гепарин-зв’язувального епітеліального фактора росту HB-EGF. Після 48 годин інкубації спостерігали (Рис. 3.6) зниження проліферації на 54% під впливом доксорубіцину у концентрації 5μM та на 20-30% під впливом різних концентрацій CRM₁₉₇. Оскільки у концентрації 3200 нг/мл рекомбінантний CRM₁₉₇ вже показував токсичність на рівні приблизно 30%, для подальших експериментів обрали нижчі його концентрації.

Для усіх наступних проліферативних тестів використовували доксорубіцину гідрохлорид у концентрації 5μM та рекомбінантний CRM₁₉₇ у концентраціях 500 і 1000 нг/мл.

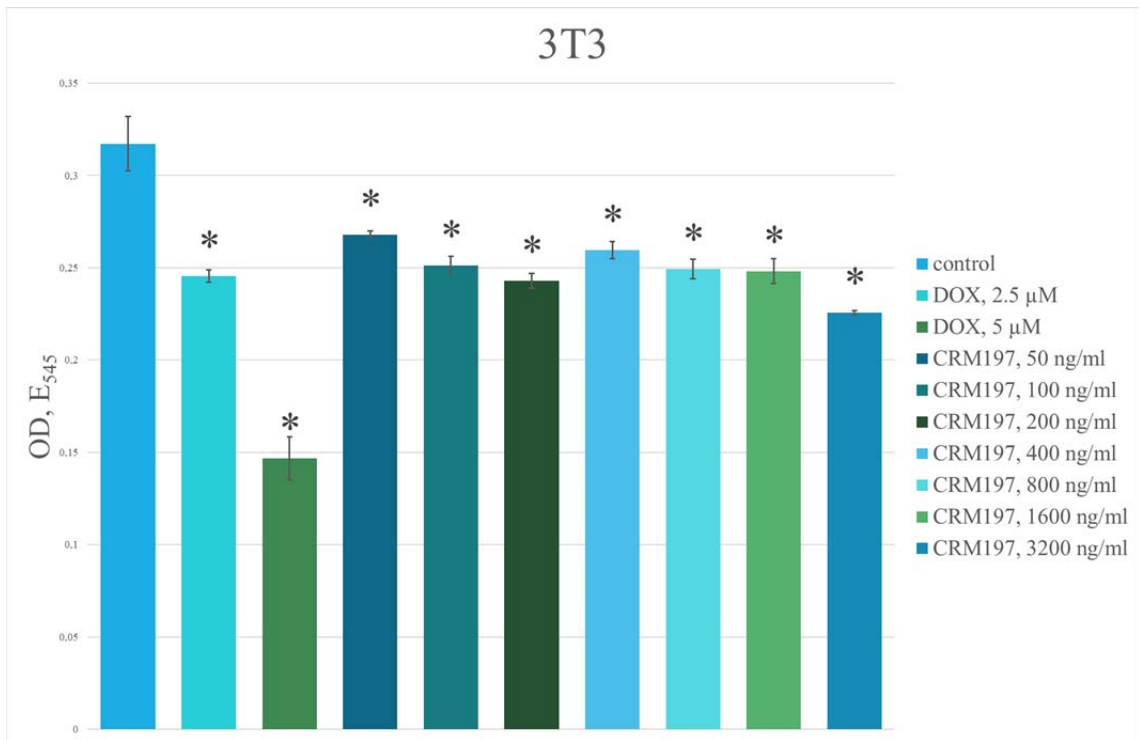


Рисунок 3.6 – Результати МТТ-тесту з використанням CRM₁₉₇ та DOX для культури клітин 3Т3. Тут і надалі * – $P < 0.05$.

У культурі клітин плоскоклітинної карциноми A431 (Рис. 3.7) використання рекомбінантного CRM₁₉₇ у концентраціях 500 та 1000 нг/мл призводило до зниження проліферації клітин на 11 та 25 відсотків відповідно. Суміш CRM + DOX інгібувала ріст клітин на тому ж рівні, що і CRM₁₉₇ у концентрації 1000 нг/мл та доксорубіцин у концентрації 5μM. Під впливом рекомбінантного HB-EGF спостерігали збільшення проліферації клітин на 18%, що ще раз підтвердило, що клітинна лінія A431 експресує рецептори EGFR1 та EGFR4.

Навантажений комплекс (loaded CRM₁₉₇-DOX) знижував проліферацію клітин на 17%. Важливо зауважити, що надлишок доксорубіцину було видалено шляхом діалізу, тому основний цитостатичний ефект обумовлено саме навантаженим комплексом. Це підтверджує гіпотезу про те, що комплекси CRM₁₉₇ та доксорубіцину можуть бути використані для таргетної терапії раку.

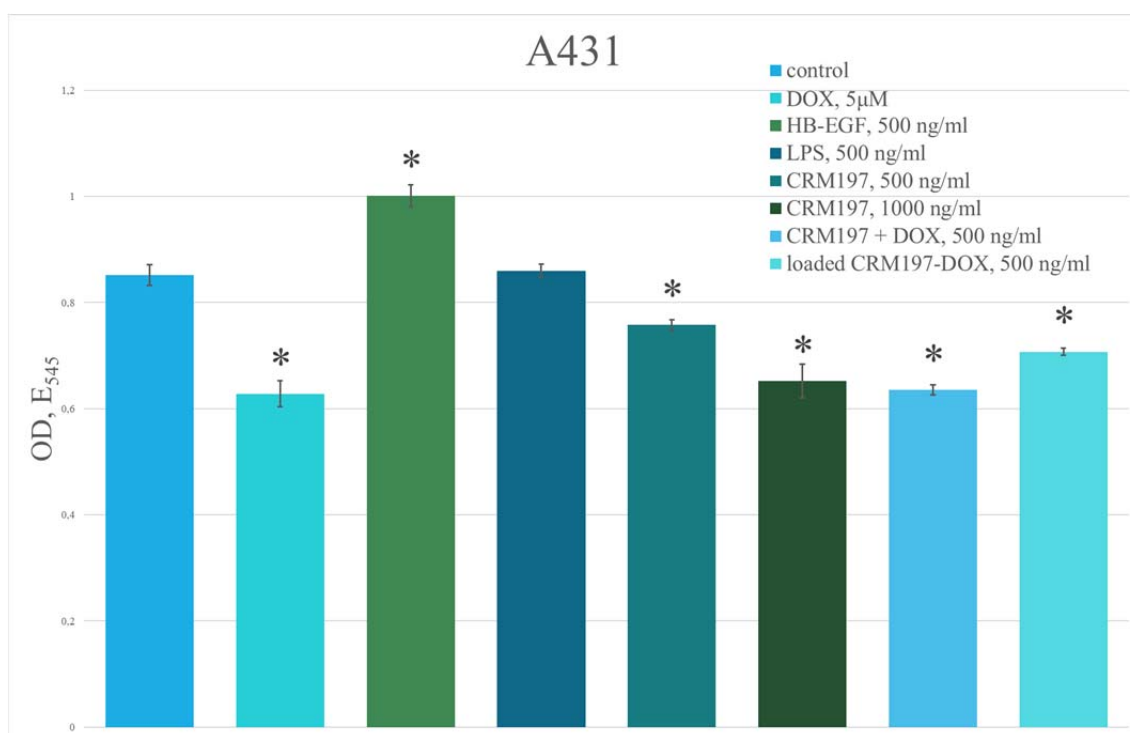


Рисунок 3.7 – Результати МТТ-тесту для культури клітин *A431*.

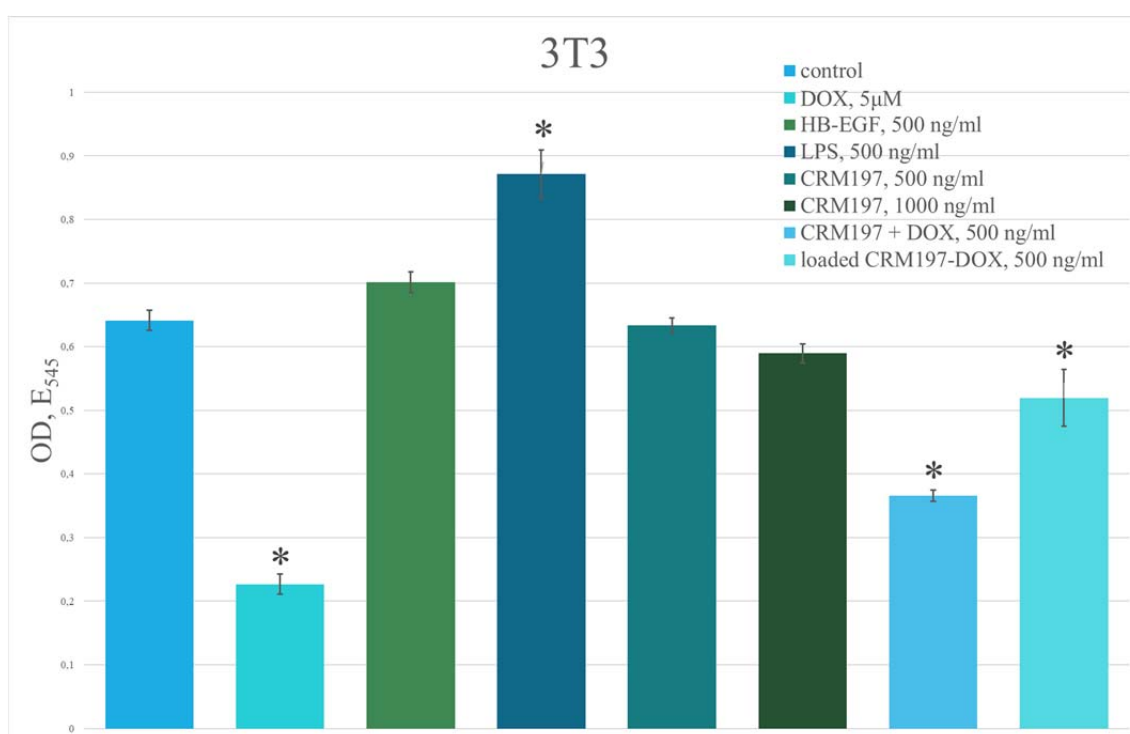


Рисунок 3.8 – Результати МТТ-тесту для культури клітин *3T3*.

Клітинна лінія *3T3* (Рис. 3.8) фактично не реагувала на додавання рекомбінантних HB-EGF та CRM₁₉₇, адже не експресує рецепторів до HB-EGF, але доксорубіцин у концентрації 5µM значно пригнічував ріст клітин через свою неспецифічну цитостатичну дію. Суміш CRM₁₉₇ + DOX та навантажений комплекс CRM₁₉₇ і доксорубіцину знижували проліферацію на

43 та 19 відсотків відповідно. Також ця клітинна лінія єдина відповідала збільшенню проліферації на додавання бактеріального ліпополісахариду (LPS), імовірно, через залученість цих клітин у захисних реакціях організму під час загоєння ран.

У культурі клітин *Vero*, що походять з нирки зеленої африканської мавпи, після додавання 500 нг/мл CRM₁₉₇ спостерігали (Рис. 3.9) інгібування росту клітин на 26%, а CRM₁₉₇ у концентрації 1000 нг/мл та суміш CRM₁₉₇ + DOX знижували проліферацію приблизно на 37 відсотків. Навантажений комплекс CRM₁₉₇ і доксорубіцину показав ефективність на рівні 31%. Культура майже не відповідала на додавання HB-EGF та LPS, а також була єдиною культурою, у якій усі проби з CRM₁₉₇ мали більшу ефективність, ніж доксорубіцин у концентрації 5μM.

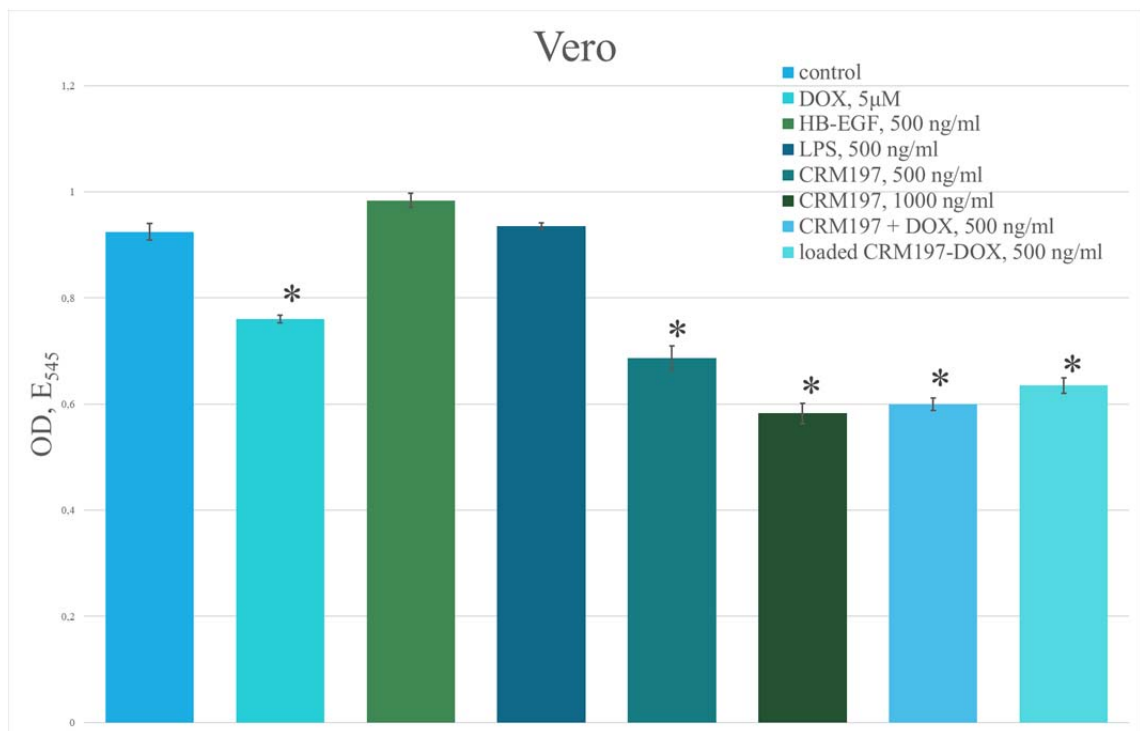


Рисунок 3.9 – Результати МТТ-тесту для культури клітин *Vero*.

Таким чином, очевидно, що комплекси CRM₁₉₇-DOX мають специфічну цитостатичну дію в пухлинах, які експресують форми HB-EGF або його рецептори, що відкриває можливості для таргетної терапії.

ВИСНОВКИ

1. Таргетна доставка лікарських засобів має низку переваг над традиційними методами лікування раку. Зокрема, вона дозволяє збільшити ефективність терапії з одночасним зниженням загальної цитотоксичності протипухлинних препаратів.
2. Комплекси рекомбінантного нетоксичного похідного дифтерійного токсину CRM₁₉₇ та протипухлинного препарату доксорубіцину гідрохлориду специфічно пригнічують проліферацію клітин плоскоклітинної карциноми і можуть бути використані для таргетної терапії пухлин епітеліального походження.
3. CRM₁₉₇ є потенційним носієм для таргетної терапії тих типів раку, у яких надмірно експресується НВ-EGF, його попередник про-НВ-EGF, а також його рецептори – EGFR1 EGFR4.
4. Оскільки частина доксорубіцину втрачається в процесі навантаження комплексів, необхідно детальніше дослідити цей процес для створення більш стабільних комплексів, які можливо використовувати у клінічній практиці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Федоренко З.П., Гулак Л.О., Горох Є.Л. та ін. Рак в Україні, 2020-2021. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби: Бюлетень Національного канцер-реєстру України №23. Київ. Національний інститут раку. 2022;89 с.
2. Buaya A.B., Beloqui A., Memvanga P.B., Pr at V. Self-Nano-Emulsifying Drug-Delivery Systems: From the Development to the Current Applications and Challenges in Oral Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2020 Dec 9;12(12):1194.
3. Vijaya Shanti B., Mrudula T.P.K.V. An Imperative note on Novel Drug delivery Systems. *J Nanomed Nanotechnol*. 2011;2(7).
4. Peter S., Alven S., Maseko R.B., Aderibigbe B.A. Doxorubicin-Based Hybrid Compounds as Potential Anticancer Agents: A Review. *Molecules*. 2022;27(14):4478.
5. Park A.R., Jang S.W., Kim J.S., Park Y.G., Koo B.S., Lee H.C. Efficient recovery of recombinant CRM₁₉₇ expressed as inclusion bodies in *E.coli*. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201060.
6. Ullrich A., Coussens L., Hayflick J.S., Dull T.J., Gray A., Tam A.W., Lee J., Yarden Y., Libermann T.A., Schlessinger J., et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in *A431* epidermoid carcinoma cells. *Nature*. 1984 May 31–Jun 6;309(5967):418-25.
7. Zhang W., Zeng W., Jiang A., He Z., Shen X., Dong X., Feng J., Lu H. Global, regional and national incidence, mortality and disability-adjusted life-years of skin cancers and trend analysis from 1990 to 2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Cancer Med*. 2021 Jul;10(14):4905–4922.
8. Br oker M., Costantino P., DeTora L., McIntosh E.D., Rappuoli R. Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197

- (CRM₁₉₇), a non-toxic mutant of diphtheria toxin: Use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications. *Biologicals*. 2011;39(4):195–204.
9. Robles-Oteiza C., Ayeni D., Levy S., Homer R.J., Kaech S.M., Politi K. Elevated murine HB-EGF confers sensitivity to diphtheria toxin in EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Dis Model Mech*. 2021 Nov 1;14(11):dmm049072.
 10. Yaghoubi A., Khazaei M., Avan A., Hasanian S.M., Soleimanpour S. The bacterial instrument as a promising therapy for colon cancer. *Int. J. Colorectal Dis*. 2020;35:595–606.
 11. Rahim M.A., Jan N., Khan S., Shah H., Madni A., Khan A., Jabar A., Khan S., Elhissi A., Hussain Z., Aziz H.C., Sohail M., Khan M., Thu H.E. Recent Advancements in Stimuli Responsive Drug Delivery Platforms for Active and Passive Cancer Targeting. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 7;13(4):670.
 12. Attia M.F., Anton N., Wallyn J., Omran Z., Vandamme T.F. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J. Pharm. Pharmacol*. 2019;71:1185–1198.
 13. Adepu S, Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*. 2021 Sep 29;26(19):5905.
 14. Balogh B., Ivánczi M., Nizami B., Beke-Somfai T., Mándity I.M. ConjuPepDB: a database of peptide-drug conjugates. *Nucleic Acids Res*. 2021 Jan 8;49(D1):D1102–D1112.
 15. Anthony D.P., Hegde M., Shetty S.S., Rafic T., Mutalik S., Rao B.S.S. Targeting receptor-ligand chemistry for drug delivery across blood-brain barrier in brain diseases. *Life Sci [Internet]. Elsevier Inc*. 2021;274:119326.
 16. Tosi G., Vilella A., Veratti P., Belletti D., Pederzoli F., Ruozi B., et al. Exploiting bacterial pathways for BBB crossing with PLGA nanoparticles modified with a mutated form of diphtheria toxin (CRM₁₉₇): *In vivo* experiments. *Mol Pharm*. 2015;12:3672–3684.

17. Levit S.L., Tang C. Polymeric Nanoparticle Delivery of Combination Therapy with Synergistic Effects in Ovarian Cancer. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Apr 20;11(4):1048.
18. Mattioli R., Ilari A., Colotti B., Mosca L., Fazi F., Colotti G. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med*. 2023 Oct;93:101205.
19. Carvalho C., Santos R.X., Cardoso S., Correia S., Oliveira P.J., Santos M.S., Moreira P.I. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr. Med. Chem*. 2009;16:3267–3285.
20. Kciuk M., Gielecińska A., Mujwar S., Kołat D., Kałuzińska-Kołat Ż., Celik I., Kontek R. Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*. 2023 Feb 19;12(4):659.
21. Zirakzadeh A.A., Kinn J., Krantz D., Rosenblatt R., Winerdal M.E., Hu J., Hartana C.A., Lundgren C., Bergman E.A., Johansson M., et al. Doxorubicin Enhances the Capacity of B Cells to Activate T Cells in Urothelial Urinary Bladder Cancer. *Clin. Immunol*. 2017;176:63–70.
22. Voorwerk L., Slagter M., Horlings H.M., Sikorska K., van de Vijver K.K., de Maaker M., Nederlof I., Kluin R.J.C., Warren S., Ong S., et al. Immune Induction Strategies in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer to Enhance the Sensitivity to PD-1 Blockade: The TONIC Trial. *Nat. Med*. 2019;25:920–928.
23. Gilad Y., Eliaz Y., Yu Y., Han S.J., O'Malley B.W., Lonard D.M. Drug-Induced PD-L1 Expression and Cell Stress Response in Breast Cancer Cells Can Be Balanced by Drug Combination. *Sci. Rep*. 2019;9:15099.
24. Mohan U.P., Tirupathi Pichiah P.B., Iqbal S.T.A., Arunachalam S. Mechanisms of doxorubicin-mediated reproductive toxicity – A review. *Reprod. Toxicol*. 2021;102:80–89.
25. Van der Zanden S.Y., Qiao X., Neefjes J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *FEBS J*. 2020;288:6095–6111.

26. Sohail M., Sun Z., Li Y., Gu X., Xu H. Research Progress in Strategies to Improve the Efficacy and Safety of Doxorubicin for Cancer Chemotherapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2021;21:1385–1398.
27. Liu P., Chen G., Zhang J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules.* 2022;27:1372.
28. Paszko E., Senge M.O. Immunoliposomes. *Curr. Med. Chem.* 2012;19:5239–5277.
29. Denel-Bobrowska M., Marczak A. Structural modifications in the sugar moiety as a key to improving the anticancer effectiveness of doxorubicin. *Life Sciences.* 2017;178:1–8.
30. Choi J.S., Doh K.O., Kim B.K., Seu Y.B. Synthesis of cholesteryl doxorubicin and its anti-cancer activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2017;27(4):723–728.
31. Graeser, R., Esser, N., Unger, H. et al. INNO-206, the (6-maleimidocaproyl hydrazone derivative of doxorubicin), shows superior antitumor efficacy compared to doxorubicin in different tumor xenograft models and in an orthotopic pancreas carcinoma model. *Invest New Drugs.* 2010;28:14–19.
32. Zhu L., Lin M. The Synthesis of Nano-Doxorubicin and Its Anticancer Effect. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2021;21:2466–2477.
33. Ibrahim M., Abuwatfa W.H., Awad N.S., Sabouni R., Hussein G.A. Encapsulation, Release, and Cytotoxicity of Doxorubicin Loaded in Liposomes, Micelles, and Metal-Organic Frameworks: A Review. *Pharmaceutics.* 2022;14:254.
34. Pugazhendhi A., Edison T.N.J.I., Velmurugan B.K., Jacob A.J., Karuppusamy I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci.* 2018;200:26–30.
35. Mishra R.P.N., Yadav R.S.P., Jones C., Nocadello S., Minasov G., Shuvalova L.A., Anderson W.F., Goel A. Structural and immunological

- characterization of *E.coli* derived recombinant CRM₁₉₇ protein used as carrier in conjugate vaccines. *Biosci Rep.* 2018;38(5):BSR20180238.
- 36.Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983;65:55–63.
- 37.Ferrari M., Fornasiero M. Ch., Isetta A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. *Journal of Immunological Methods.* 1990;131:165–172.
- 38.Van Meerloo J., Kaspers G.J., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237–45.
- 39.Di Leandro L., Colasante M., Pitari G., Ippoliti R. Hosts and Heterologous Expression Strategies of Recombinant Toxins for Therapeutic Purposes. *Toxins (Basel).* 2023 Dec 13;15(12):699.
- 40.Pruss R.M., Herschman H.R. Variants of 3T3 cells lacking mitogenic response to epidermal growth factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1977;74:3918–3921.