

**ЗАПИТ**  
**на проведення наукової (науково-технічної) роботи**

**1. Назва роботи**

Аналіз біологічної активності аналога аргініну рослинного походження індоспіцину як компонента протипухлинної метаболічної ензимотерапії на основі рекомбінантної аргінази людини

**2. Вид тематики**

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

**3. Назва цільової програми або цільового проєкту**

Цільова програма наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» на 2020–2024 рр.

**4. Назва розділу програми або напрямку цільового проєкту**

н е м а є

**5. Строки виконання роботи**

01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2024 р.

**6. Код програмної класифікації видатків**

6541030 (фундаментальні дослідження)

**7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки**

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

#### 8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій



#### 9. Код та назва наукового напрямку (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук

2.2.4.3. Вивчення молекулярно-генетичних основ регуляції метаболічних процесів при пухлинній хворобі

#### 10. Науковий керівник роботи

Бобак Ярослав Петрович, к.б.н., старший науковий співробітник, Інститут біології клітини НАН України  
телефон: (032)2612146; факс: +38 032 261 2148; e-mail: bobak@cellbiol.lviv.ua

#### 11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Шуваєва Галина Юріївна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032) 2612146, e-mail: shuvayeva77@gmail.com	
Стасик Олег Володимирович	д.б.н., с.д., завідувач відділу, ІБК НАН України, тел.: +38 032 261 2146, e-mail: StasykOV@nas.gov.ua	
Чернишук Світлана Василівна	інженер, ІБК НАН України, тел.: (032) 2612146, e-mail: chernushyk@nas.gov.ua	

#### 12. Установи - співвиконавці

н е м а є

#### 13. Ключові слова

метаболічна онкотерапія, рекомбінантні ензими, аналоги аргініну, сигнальні механізми

#### 14. Резюме

Даний проект присвячений аналізу біологічної активності аналога аргініну рослинного походження індоспіцину, як компонента протипухлинної метаболічної ензимотерапії на основі рекомбінантної аргінази людини. Авторами проекту вперше запропоновано гіпотезу, що індоспіцин є оптимальним для ензимотерапії агентом, який не є субстратом аргінази, але є одночасно протеоміметиком, що розпізнається внутрішньоклітинними сенсорами аргініну та аберрантно регулює проапоптичні та пропроліферативні сигнальні механізми клітини, таким чином ефективно підсилюючи у низьких нетоксичних концентраціях антинеопластичні ефекти відповідної терапії. Робота є актуальною і має важливе соціальне значення, з огляду на той факт, що кількість онкологічних захворювань в Україні та світі постійно зростає, а для цілого ряду типів раку, в тому числі потенційних мішеней метаболічної терапії, поки що не розроблено ефективних методів терапії. У ході виконання проекту буде досліджено життєздатність, рухливість та клоногенний потенціал культур модельних пухлинних клітин людини різного органного походження за комбінованого впливу дефіциту аргініну та індоспіцину. З метою встановлення природи механізмів відповіді пухлинних клітин на запропонований терапевтичний підхід буде проведено аналіз впливу інгібіторів синтезу білка, mTOR сигнального шляху та стресу ендоплазматичного ретикулуму на чутливість пухлинних клітин до дії індоспіцину. Також буде досліджено експресію генів та регуляцію білкових компонентів про- та антиапоптичних сигнальних шляхів, що активуються у пухлинних клітинах у відповідь на комбінований вплив індоспіцину та дефіциту аргініну, та ідентифіковано молекулярні маркери чутливості пухлин до цієї метаболічної терапії. На завершальному етапі роботи ефект комбінованої дії аргінази I людини та нетоксичних концентрацій індоспіцину буде протестувано *in vivo* на моделях лабораторних тварин. У результаті виконання проекту буде запропоновано новий підхід комбінованої метаболічної ензимотерапії злоякісних пухлин.

## **15. Обґрунтування доцільності виконання роботи**

### 15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Як глобальна причина захворюваності та смертності людини онкопатології займають друге місце, поступаючись лише захворюванням серцево-судинної системи. Згідно з прогнозами ВОЗ на 2022 рік онкопатології вийдуть на перше місце у цьому списку. В Україні за останнє десятиліття кількість онкохворих зросла на 25%. Щороку в країні реєструють 160 тис. нових випадків злоякісних новоутворень, і майже 90 тис. осіб помирають від цієї хвороби. В Україні Повністю виліковується менше половини (41,4%) з тих, у кого виявляють злоякісну пухлину. Кожен другий-третій онкохворий помирає впродовж першого року хвороби, а це у разі перевищує аналогічний показник у розвинених країнах, що свідчить про недостатній рівень ефективності діагностики раку та його лікування.

Для багатьох агресивних типів раку, що виявляються на пізніх стадіях розвитку, лікування як правило полягає в хірургічному видаленні пухлини з наступним використанням хіміо- та радіотерапії. Однак традиційні протипухлинні препарати не завжди є достатньо ефективними внаслідок їх незадовільної селективності і значної загальної токсичності для організму людини.

Таким чином, пошук альтернативних підходів до терапії раку, що не мають недоліків традиційної терапії, залишається актуальним завданням сучасної біології та медицини. Вирішенню цієї проблеми присвячено даний проект, спрямований на розробку селективного, ефективного та нетоксичного методу метаболічної терапії пухлин, для якого на даний момент не існує ефективних методів лікування,

### 15.2. Стан розроблення проблеми.

Одним із запропонованих альтернативних методів лікування онкологічних захворювань, що активно розвивається у світі, є метаболічна ензимотерапія, що базуються на використанні рекомбінантних ферментних препаратів, які знижують вміст речовин, специфічно важливих для росту клітин, зокрема деяких амінокислот. Протипухлинна терапія онкопатологій з використанням рекомбінантних ферментів деградації амінокислоти аргініну, аргініндеімінази й аргінази, на даний момент перебуває на фазі клінічних випробувань у США, Великобританії, Італії та Китаї (Glazer et al., 2010; Yang et al., 2010; Yau et al., 2013; Yau et al., 2015). Вперше цей тип терапії був застосований щодо гепатокарцином та меланом людини (Wheatley et al., 2005), а нещодавні результати досліджень також свідчать, що потенційно чутливими до ензимотерапії на основі голодування за аргініном є такі

агресивні типи пухлин як карциноми нирки, яйників, простати, мезотеліоми, гліоми, ретинобластоми та ряд лейкемій (Kim et al., 2009; Stasyk et al., 2015).

Незважаючи на недавній значний прогрес у розвитку цього методу метаболічної протиракової терапії, щоб приблизити його клінічне впровадження необхідно вирішити декілька проблем. Результати перших клінічних випробувань вказують на те, що застосування ферментів деградації аргініну, аргініндеїмінази й аргінази, як монотерапії є у багатьох випадках недостатнім для ефективної терапії онкопатологій. Це відбувається внаслідок відновлення синтезу аргініну з його попередника цитруліну, що циркулює у кров'яному русі, або внаслідок здатності частини дормантних злоякісних клітин відновлювати проліферацію навіть після довготривалого голодування за цією амінокислотою після припинення дії терапії (Stasyk et al., 2015). Таким чином, монотерапія (лише голодування за аргініном), виявилась високоефективною щодо зупинки росту строго ASS- негативних пухлин, але менш ефективною у їх елімінаванні. Однак, висока протипухлинна селективність і низька загальна токсичність для організму цього типу лікування в цілому служать доброю основою та обґрунтуванням для розробки комбінаційних методів онкотерапії, що базуватимуться на створенні дефіциту аргініну в організмі. Очікується, що паралельне застосування хіміо- чи радіотерапевтичних підходів у комбінації з ензимотерапією на основі ферментів деградації аргініну підвищить її антинеопластичну ефективність і розширить спектр пухлин, чутливих до цього типу лікування. Розробка комбінованих підходів, що базуються на створенні синтетичної летальності і розшифруванні молекулярних механізмів, що визначають чутливість пухлинних клітин до голодування за аргініном, виглядає найбільш раціональним підходом. Одним з таких методів є на нашу думку, а саме пошук та застосування нових природних чи синтетичних аналогів аргініну.

### 15.3. Досвід і доробок авторів.

Проект базується на значному попередньому досвіді колективу авторів щодо розробки комбінаційних підходів до терапії новоутворів на основі голодування за аргініном, а саме за використання рекомбінантної аргінази людини I. Зокрема нами було раніше встановлено, що канаванін – інший природний токсичний структурний аналог аргініну рослинного походження, значно підсилює антинеопластичні ефекти терапії при збереженні її селективної дії. Однак недоліком цієї сполуки є часткова деградація під дією аргіназ (Vynnytska et al., 2011).

Для розуміння суті поставлених завдань, необхідно зазначити, що канаванін виявився серед інших протестованих нами сполук найбільш ефективним компонентом терапії у експериментах на клітинних моделях пухлин. Зокрема було показано, що цей природний структурний аналог аргініну значно підсилює проапоптичний ефект рекомбінантної аргінази як у 2-D моношарових культурах, так і в більш складних і 3-D сфероїдних культурах цілого ряду пухлинних клітин різного органного походження, але не у нормальних нетрансформованих клітин (Vynnytska et al., 2011; Vynnytska-Muronovska et al., 2012; Bobak et al., 2016; Kurlishchuk et al., 2016; Hinrichs et al., 2018). Канаванін, як відомо, проявляє антипроліферативну дію шляхом включення у послідовність білків замість аргініну (тобто є протеоміметиком), порушуючи їх структурні і функціональні властивості і викликаючи катастрофічний стрес ER, що веде до апоптозу. Однак, канаванін все ще не є оптимальним компонентом терапії, оскільки є одночасно ензиматичним субстратом аргінази, зазнаючи часткової деградації *in vivo* (наші неопубліковані дані). Таким чином, для оптимізації терапії ми запропонували пошук нових більш ефективних протеоміметиків, - структурних аналогів аргініну чи канаваніну, які не підлягають гідролізу аргіназою. Виявилось, що інший аналог природного походження (з австралійських рослин роду *Indigofera*), індоспіцин, потенційно відповідає вищевказаним вимогам.

У попередніх дослідженнях нами було показано, що очищений екстракт суккулента *Indigofera spicata* виявляв виражений селективний антинеопластичний ефект на декількох пухлинних моделях (наші неопубліковані результати). У ході запропонованого проекту буде детально досліджено біологічні ефекти чистого препарату індоспіцину, люб'язно переданого колективу авторів Проф. Марі Флетчер (університет Квінсленду, Австралія). Також слід відзначити, що у відділі сигнальних механізмів клітини налагоджено наробку власних препаратів рекомбінантної аргінази людини на основі дріжджових продуцентів, у кількостях, необхідних для ефективного виконання проекту (Zakalsky et al., 2012).

Нижче наведено основні наукові публікації авторського колективу за тематикою запропонованої роботи:

1. Bobak YP, Vynnytska BO, Kurlishchuk YV, Sibirny AA, Stasyk OV. Cancer cell sensitivity to arginine deprivation in vitro is not determined by endogenous levels of arginine metabolic enzymes. **Cell Biol Int.** 2010;34(11):1085-9. (IF – 1.64)
2. Vynnytska BO, Mayevska OM, Kurlishchuk YV, Bobak YP, Stasyk OV. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. **Anticancer Drugs.** 2011 Feb;22(2):148-57. (IF – 2.23)
3. Ю. В. Курліщук, Б. О. Винницька-Мироновська, Я. П. Бобак, О. В. Стасик. Вплив метаболітів аргініну на життєздатність людських пухлинних клітин за умов дефіциту цієї амінокислоти *in vitro*. **Біологічні студії.** 2011, Т.5, №2. С. 5-16.
4. O. I. Chen, L. S. Lyniv, N. I. Igmentseva, M. L. Barska, N. O. Sybirna, O. V. Stasyk. Effect of nitric oxide donor on viability of human leukemic cells upon arginine deprivation. **Studia Biologica, 2011, V5 (2), P. 17-28.**
5. Zakalskiy AE, Zakalska OM, Rzhetskiy YA, Potocka N, Stasyk OV, Horak D, Gonchar MV. Overexpression of (His)6-tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography. **Protein Expr Purif.** 2012;81(1):63-8. (IF – 1.64)
6. Vynnytska-Myronovska B., Bobak Y., Garbe Y., Dittfeld C., Stasyk O., Kunz-Schughart L.A. Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation. **Int. J. Cancer,** 2012; 130(9):2164-2175. (IF – 4.9)
7. Vynnytska-Myronovska B, Kurlishchuk Y, Bobak Y, Dittfeld C, Kunz-Schughart LA, Stasyk O. Three-dimensional environment renders cancer cells profoundly less susceptible to a single amino acid starvation. **Amino Acids.** 2013;45(5):1221-30. (IF – 3.91)
8. Chen O., Kavalets B., Lyniv L., Vovk O., Barska M., Sybirna N., Stasyk O. Effect of combi-national arginase and canavanine treatment on normal human peripheral blood lymphocytes in vitro. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences,** 2013, 26(4):385–389.
9. Shuvayeva G., Bobak Y., Igmentseva N., Titone R., Morani F., Stasyk O. Isidoro C. Single amino acid arginine deprivation triggers pro-survival autophagic response in ovarian carcinoma SCOV3. **BioMed Research International** 2014, Article ID 505041, 10 pages (doi: 10.1155/2014/505041) (IF – 1.58)
10. Бобак Я. П., Курліщук Ю. В., Винницька-Мироновська Б. О., Чень О. І., Барська М. Л., Стасик О. В. “Спосіб контролю експресії генів ферментів біосинтезу амінокислот у клітинах пухлин за допомогою канаваніну при комбінованій ензимотерапії раку”, № а201306988, 3.06.13 р., (Патент України на винахід. Рішення про видачу №25010/3А/14 від 27.10.2014)
11. Pavlyk I, Rzhetskiy Y, Jagielski AK, Drozak J, Wasik A, Pereverzieva G, Olchowik M, Kunz-Schugart LA, Stasyk O, Redowicz MJ. Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of  $\beta$ -actin arginylation. **Amino Acids.** 2015;47(1):199-212. (IF – 3.91)
12. Stasyk OV, Boretsky YR, Gonchar MV, Sibirny AA. Recombinant arginine-degrading enzymes in metabolic anticancer therapy and bioanalytics. **Cell Biol Int.** 2015;39(3):246-52. (IF – 1.9)
13. Bobak Y, Kurlishchuk Y, Vynnytska-Myronovska B, Grydzuk O, Shuvayeva G, Redowicz MJ, Kunz-Schughart LA, Stasyk O. Arginine deprivation induces endoplasmic reticulum stress in human solid cancer cells. **Int J Biochem Cell Biol.** 2016;70:29-38. (IF-4,0)
14. Vynnytska-Myronovska BO, Kurlishchuk Y, Chen O, Bobak Y, Dittfeld C, Hüther M, Kunz-Schughart LA, Stasyk OV. Arginine starvation in colorectal carcinoma cells: Sensing, impact on translation control and cell cycle distribution. **Exp Cell Res.** 2016;341(1):67-74. (IF – 3.2)
15. Kurlishchuk Y, Vynnytska-Myronovska B, Grosse-Gehling P, Bobak Y, Manig F, Chen O, Merker SR, Henle T, Löck S, Stange DE, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Co-application of canavanine and irradiation uncouples anticancer potential of arginine deprivation from citrulline availability. **Oncotarget.** 2016; 7(45):73292-73308 (IF – 6.4)
16. Chen O. I., Barska M. L., Lyniv L. S., Igmentseva N. I., Vovk O. I., Sybirna N. O., Stasyk O. V. Effect of combined arginase and nitric oxide donor treatment on normal and leukemic cells in vitro. **Studia Biologica,** 2016, V10 (1), P. 17-28.
17. Vovk O., Chen O., Igmentseva N., Senchuk O., Barska M., Sybirna N., Stasyk O. Effect of the combined arginase and canavanine treatment on leukemic cells in vitro and in vivo. **Ukrainian Biochemical Journal,** 2016, V 88 (2), P. 45-55.

18. Чень О., Барська М., Вовк О., Цимбалюк-Волошин І., Козлова О., Сибірна Н., Стасик О. Вплив рекомбінантної аргінази на життєздатність баластних клітин периферичної крові пацієнтів, хворих на лейкоз, *in vitro*. **Вісник Львівського університету**. Серія біологічна. 2016. В. 73. – С. 342-346.
19. Mayevska O.M., Chen O.I., Karatsai O., Bobak Ya.P., Barska M.L., Lyniv L.S., Pavlyk Yu., Rzhepetsky Yu., Redowicz M-J., Stasyk O.V. Nitric oxide donor augments antineoplastic effects of arginine deprivation in human melanoma cells. **Exp Cell Res.** 2017;355(2):162-171. (IF – 3.4)
20. Hinrichs CN, Ingargiola M, Käubler T, Löck S, Temme A, Köhn-Luque A, Deutsch A, Vovk O, **Stasyk O**, Kunz-Schughart LA. Arginine Deprivation Therapy: Putative Strategy to Eradicate Glioblastoma Cells by Radiosensitization. **Mol Cancer Ther.**, 2018;17(2):393-406. (IF – 5.37).
21. Chen OI, Bobak YP, **Stasyk OV**, Kunz-Schughart LA. A Complex Scenario and Underestimated Challenge: The Tumor Microenvironment, ER Stress, and Cancer Treatment. **Curr Med Chem.**, 2018; 25(21):2465-2502. (review) (IF – 3.47)
22. Karatsai O, Stasyk O, Redowicz MJ. Effects of Arginine and Its Deprivation on Human Glioblastoma Physiology and Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1202:243-258. doi: 10.1007/978-3-030-30651-9\_12. Review.

**Всього опубліковано статей: 21, з них у міжнародних виданнях – 15, оглядів та розділів у монографіях – 3. Патент України на винахід – 1.**  
**Сумарний Impact Factor публікацій - 47,55**

#### 15.4. Структура досліджень.

Таким чином, ціллю даного проекту є розробка ефективних методів комбінованої протипухлинної ензимотерапії, що базується на використанні рекомбінантного ферменту аргінази, що розщеплює амінокислоту аргінін, та нового структурного аналога аргініну індоспіцину. Очікується, що ефективність досліджуваної комбінованої терапії буде підвищена за рахунок використання препарату індоспіцину в концентраціях, що є малотоксичними для нормальних клітин людського організму.

У ході виконання проекту буде здійснено попередню оцінку чутливості пухлинних клітин людини різного органного походження до ензимотерапії шляхом моніторингу їх життєздатності, і рухливості, проліферативного та клоногенного потенціалу, а також аналізу експресії генів та білків, задіяних у відповіді на стрес та певних сигнальних шляхів клітини. Ми також плануємо встановити на молекулярно-генетичному рівні нові механізми та генетичні маркери чутливості різних типів пухлинних клітин до комбінованої терапії. Важливим елементом запланованих досліджень є попередня перевірка токсичності індоспіцину на моделях тварин, зокрема лабораторних мишей з перевиваними пухлинами.

Дослідження буде здійснено у рамках взаємопов'язаних п'яти річних етапів, як деталізовано нижче у розділах «Календарний план» та «Зміст проекту».

#### 15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

У роботі будуть використані сучасні та класичні методи клітинної біології та молекулярної генетики, біохімічних, та ультраструктурних досліджень. Виконавець проекту Відділ сигнальних механізмів клітини Інституту біології клітини НАН України є належно забезпечений необхідним для його успішного виконання обладнанням та основними реагентами. Деякі спеціалізовані реагенти, лабораторний посуд та інші розхідні матеріали будуть придбані за кошти проекту.

Зокрема виконавець проекту володіє термостатованими CO<sub>2</sub>-інкубаторами та ламінарами для культивування пухлинних клітин, низькотемпературними холодильниками для зберігання біологічних зразків та матеріалів, високошвидкісними центрифугами, ПЛР-машиною, апаратами для електрофорезу ДНК та білків, звичайними та флуоресцентним мікроскопами, проточним цитофлуориметром, апаратом для високоефективної рідинної хроматографії та спектрофотометрами для аналітичних досліджень та іншими приладами, використання яких передбачається у ході реалізації проекту. Відділ сигнальних механізмів клітини також володіє значною власною колекцією клітин людини різних

типів, що будуть використані у ході виконання проекту. Для виконання роботи у наявності є необхідна кількість препарату очищеного індоспіцину, та рекомбінантної аргінази І людини.

#### **16. Техніко-економічне обґрунтування**

не стосується фундаментальних досліджень

#### **17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами наукової, науково-технічної роботи**

- немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги
- немає аналогів в Україні
- краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками
- перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками

## 18. Використання результатів роботи

### 18.1. Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення роботи

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
<p>Очікується, що за результатами досліджень буде запропоновано новий ефективний підхід до ензимотерапії онкозахворювань на основі рекомбінантних ферментів деградації аргініну та низьких концентрацій природного аналога аргініну індоспіцину. Слід підкреслити, що прогнозується, що об'єктами відповідної терапії будуть пухлини людини декількох типів, для яких на даний момент методи лікування є недостатньо ефективними (зокрема клітини колоректального раку, раку голови та шиї, гліобластоми, меланоми тощо). У випадку успіху, відповідні терапевтичні підходи буде запатентовано. Також очікується, що цільовий аналіз транскриптому та протеому пухлин на основі встановлених у цій роботі маркерів чутливості до комбінованої терапії дозволить впровадити персоналізований підхід ще на стадії клінічних випробувань. Слід також зазначити, що дослідження індоспіцину як терапевтичного протипухлинного агента може потенційно дозволити його використання також у інших галузях медицини, зокрема як молекули-регулятора важливих внутрішньоклітинних сигнальних процесів, зокрема проліферації та синтезу білка, який також може бути модулятором імунної системи, оскільки є потенційно здатний продукувати навіть у дуже низьких концентраціях нові білкові епітопи-антигени. Згідно з даними аналізу міжнародних літературних джерел та патентного пошуку, на даний момент запропонований нами підхід до терапії новоутворів (використання аналогів амінокислоти у поєднанні із ензиматично створеним голодуванням за цією амінокислотою) раніше ніким не використовувався і не пропонувався. Таким чином, у разі успішної реалізації, розроблені нові методи та сполуки матимуть міжнародний пріоритет. Результати досліджень будуть опубліковані у міжнародних наукових виданнях з високим імпаکت-фактором а також, у разі необхідності, – захищені вітчизняними та міжнародними патентами.</p>	Діагностичні та клінічні центри у галузі онкології	сотні тис. у.о.

### 18.2. Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання роботи

Результати роботи, а саме розроблений новий метод комбінованої протипухлинної терапії на основі рекомбінантної аргінази людини та аналога аргініну індоспіцину повинні пройти детальну перевірку на моделях лабораторних тварин з перевиваними пухлинами та клінічні випробування перед майбутнім практичним використанням.



### 18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	Академія медичних наук України Діагностичні та клінічні центри в галузі онкології	Новий ефективний підхід до ензимотерапії онкозахворювань на основі рекомбінантної аргінази людини та природного аналога аргініну індоспіцину	сотні тис. грн. рік

### 19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

н е м а є

### 20. Фінансові аспекти роботи

20.1. Загальна вартість роботи 1200,000 тис. грн.

*словами: один мільйон двісті тисяч грн.*

### 20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2020 р.	2021 р.	2022 р.	2023 р.	2024 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	200,000	250,000	250,000	250,000	250,000

### 21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

н е м а є

## 22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Скок Марина Володимирівна	академік НАН України, д.б.н., проф., головний науковий співробітник	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Філоненко Валерій Вікторович	академік НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Воробець Зіновій Дмитрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет ім. Данила Галицького, кафедра медичної біології, паразитології та генетики
Арбузова Світлана Борисівна	д.м.н., проф., директор	КЛПУ «Східно-Український спеціалізований центр медичної генетики та пренатальної діагностики»

## 23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

26 лютого 2020 р.

*дата*

Директор  
Інституту біології клітини НАН України  
академік НАН України

  
*(підпис)*

Андрій СИБІРНИЙ  
М.П. 25255758



Науковий керівник роботи

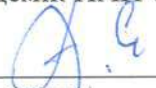
Старший науковий співробітник  
Інституту біології клітини НАН України  
к.б.н.

  
*(підпис)*

Ярослав БОБАК

**ПОГОДЖЕНО**

Директор  
Інституту біології клітини НАН України  
академік НАН України

  
\_\_\_\_\_ Андрій СИВІРСЬКИЙ  
(підпис)

«26» лютого 2020р.



**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Співкоординатор Програми  
академік НАН України

\_\_\_\_\_ Сергій КОМІСАРЕНКО  
(підпис)

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.  
М.П.

**ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ**  
на виконання наукової (науково-технічної) роботи

**«Аналіз біологічної активності аналога аргініну рослинного походження індоспіцину як компонента протипухлинної метаболічної ензимотерапії на основі рекомбінантної аргінази людини»**

**Цільова програма наукових досліджень НАН України «Геномні, молекулярні та клітинні основи розвитку інноваційних біотехнологій» на 2020–2024 рр.**

Інститут біології клітини НАН України

## **1. Рішення про затвердження роботи**

---

## **2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки**

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

## **3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок**

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

## **4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)**

2.2.4.3. Вивчення молекулярно-генетичних основ регуляції метаболічних процесів при пухлинній хворобі

## **5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи**

Дослідження молекулярних механізмів регуляції проліферації, диференціації та апоптозу у нормальних та пухлинних клітинах тварин і людини.

## **6. Мета роботи**

Метою запропонованих досліджень є розробка нового підходу до комбінованої протипухлинної ензимотерапії, що базується на використанні рекомбінантного аргінін-деградуючого ферменту аргінази I та нового та недослідженого аналога аргініну рослинного походження індоспіцину. Згідно поставленої мети буде проведено аналіз експресії генів та сигнальних шляхів, задіяних у відповіді злоякісних клітин на комбіновану терапію голодування за аргініном та індоспіцином, та встановлено механізми відповіді злоякісних клітин та молекулярні маркери чутливості до відповідної метаболічної ензимотерапії. Аналіз буде проведено на експериментальних моделях злоякіснотрансформованих клітин людини, для яких не розроблено задовільно-ефективних методів клінічної терапії (клітини, меланом, гліом, карцином шлунку та інш.). Також метою роботи є пілотне тестування нової комбінаційної терапії на моделях лабораторних тварин. Аналіз літературних джерел свідчить, що відповідна мета не ставилась та не була реалізована раніше іншими дослідниками і, таким чином, заплановані дослідження є піонерськими та інноваційними.

## 7. Термін проведення роботи:

початок — 01 квітня 2020 р. ; закінчення — 31 грудня 2024 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **1200,000** тис. грн.

та по роках

2020 р. — 200,000 тис. грн.

2021 р. — 250,000 тис. грн.

2022 р. — 250,000 тис. грн.

2023 р. — 250,000 тис. грн.

2024 р. — 250,000 тис. грн.

## 8. Календарний план роботи

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Дослідження чутливості культур пухлинних клітин людини різного органного походження до комбінованого впливу дефіциту аргініну та його аналога рослинного походження індоспіцину.	01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2020 р.	к.б.н., Г.Ю. Шуваєва.
2	Аналіз комбінованого впливу дефіциту аргініну та індоспіцину на рухливість, адгезивні властивості та клоногенний потенціал пухлинних та нетрансформованих клітин людини.	01 січня 2021 р. - 31 грудня 2021 р.	
3	Аналіз впливу інгібіторів синтезу білка, mTOR сигнального шляху та стресу ендоплазматичного ретикулуму на чутливість пухлинних клітин до дії індоспіцину	01 січня 2022 р. - 31 грудня 2022 р.	к.б.н., Я.П. Бобак.
4	Дослідження експресії генів та регуляції білкових компонентів про- та антиапоптичних сигнальних шляхів, що активуються у пухлинних клітинах у відповідь на комбінований вплив дефіциту аргініну та індоспіцину. Ідентифікація молекулярних маркерів чутливості пухлин до цієї метаболічної терапії.	01 січня 2023 р. - 31 грудня 2023 р.	к.б.н., Я.П. Бобак.
5	Дослідження експресії генів та регуляції білкових компонентів про- та антиапоптичних сигнальних шляхів, що активуються у пухлинних клітинах у відповідь на комбінований вплив дефіциту аргініну та індоспіцину. Ідентифікація молекулярних маркерів чутливості пухлин до цієї метаболічної терапії.	01 січня 2024 р. - 31 грудня 2024 р.	д.б.н., с.д., О.В. Стасик.

## 9. Зміст, основні вимоги до виконання роботи, рівня і способів її виконання

Фундаментальним завданням проекту є всебічний аналіз ефектів недослідженого структурного аналога аргініну рослинного походження індоспіцину на фізіологію пухлинних клітин людини на фоні дефіциту екзогенного аргініну, викликаного терапевтичним ензимом рекомбінантною аргіназою людини.

У ході виконання проекту буде проведено аналіз чутливості культур пухлинних клітин людини різного органного походження до комбінованого впливу дефіциту аргініну та індоспіцину. Зокрема буде досліджено життєздатність клітин (МТТ тест) декількох типів пухлин (зокрема колоректального раку, раку голови та шиї, меланом, гліобластом та інш.) при довготривалій інкубації на визначеному середовищі DMEM без аргініну, або повному середовищі в присутності рекомбінантної аргінази людини I, та різними концентраціями індоспіцину. Буде визначено концентрацію IC50 індоспіцину, яка призводить до загибелі 50% клітин через 2 доби інкубації. Також визначатиметься залишковий проліферативний потенціал клітин після інкубації на аргінін-дефіцитному середовищі з додаванням індоспіцину, та перенесення клітин на повноцінне середовище з аргініном. Отримані дані будуть порівняні із умовами аргінін-дефіцитного середовища без індоспіцину, або з додаванням низьких концентрацій раніше дослідженого нами альтернативного аналога аргініну канаваніну (Vynnytska et al., 2011). Буде зроблено висновок, у якій мірі індоспіцин підсилює антинеопластичні ефекти голодування за аргініном. Аналогічним чином вплив визначених концентрацій IC50 індоспіцину буде також перевірено відносно нормальних чи псевдонормальних клітин (фібробласти людини, клітини ембріональної нирки HEK293). Буде зроблено висновок щодо селективності дії індоспіцину на злоякісно-трансформовані клітини. Додатково буде проаналізовано цитотоксичний вплив індоспіцину за умов блокування синтезу білка циклогексїмідом, з метою встановити, чи відповідний вплив є опосередкований вбудовуванням індоспіцину у склад новосинтезованих білків замість аргініну, з наступною дестабілізацією структури та функції останніх.

На наступному етапі буде досліджено комбінований вплив дефіциту аргініну та індоспіцину на рухливість, адгезію та клоногенний потенціал пухлинних та нетрансформованих клітин людини. Як показано нами раніше (Pavlyk et al., 2015; Mayevska et al., 2017), голодування за аргініном *per se* селективно пошкоджує рухливість клітин гліом та меланом, дестабілізуючи структуру актинового цитоскелету. Теоретично, за комбінованої дії низьких концентрацій аналога аргініну відповідний ефект мав би бути посиленним. З метою перевірки цього припущення рухливість пухлинних клітин декількох різних типів визначатиметься за експериментальних умов комбінованої та монотерапії методом Wound healing. Також згідно раніше описаних методів (Mayevska et al., 2017) буде проаналізовано вплив індоспіцину на гетеро- та гомотипову адгезію пухлинних клітин, а також їх клоногенний потенціал *in vitro*. Буде зроблено висновок, чи пошкоджує додатково індоспіцин відповідні процеси, та чи відрізняється відповідний його ефект він такого у канаваніну. Слід зазначити, що додаткове пошкодження вказаних характеристик є важливим для оцінки терапевтичного потенціалу індоспіцину, оскільки усі вони вносять важливий вклад у сумарний «метастатичний потенціал» пухлинних клітин та можуть бути екстрапольовані на поведінку пухлинних клітин *in vivo*.

З метою встановлення на молекулярному рівні причин чутливості чи резистентності різних типів пухлин до комбінаційної ензимотерапії та ідентифікації прогностичних маркерів, статус яких корелює із чутливістю до такої терапії, буде проведено аналіз впливу інгібіторів синтезу білка, mTOR сигнального шляху (рапалоги) та стресу ендоплазматичного ретикулуму на чутливість пухлинних клітин до дії індоспіцину за дефіциту аргініну. Оскільки індоспіцин є структурним аналогом аргініну та протеоміметиком (тобто розпізнається ацетил-тРНК-синтетазами як аргінін), та вбудовується замість останнього у структуру білків (наші попередні результати), авторами висловлене припущення, що індоспіцин може потенційно розпізнаватись також внутрішньоклітинними сенсорами аргініну, і опосередковано сигнальним механізмом mTOR (Broer and Broer, 2017) дерепресувати синтез білка за відсутності аргініну, таким чином значно підсилюючи цитотоксичний ефект терапевтичної комбінації. Аналіз проводитиметься шляхом виявлення фосфорильованих форм білків (mTOR, Raptor, S6, GCN2, eIF2a, GADD34) та аналізу експресії генів (*ATF4*, *ATF3*, *PPP1R15A*(*GADD34*), *ASNS*, *CATI*) при застосуванні комбінаційної терапії.

Додатково, буде проаналізовано вплив модуляції стресу ендоплазматичного ретикулуму, оскільки індукція цього механізму була встановлена нами за використання іншого аналога аргініну канваніну, і також має значний вклад у розвиток апоптозу за дії цього типу терапії (Bobak et al., 2016).

Буде проаналізовано експресію типових маркерів стресу (GRP78, CHOP та EDEM1) за умови голодування за комбінаційної терапії. Буде проведено аналіз експресії генів та білків що визначають апоптичну загибель клітин в умовах тривалого стресу (аналіз CHOP, TRB3 та фрагментації білка PARP1). Буде проведено аналіз експресії генів що визначають адаптацію пухлинних клітин до стресу, а саме *GRP78*, *GRP94*, *IRE1a* та *ATF6* в клітинних лініях що відрізняються за чутливістю до комбінованої терапії та зроблено висновки про кореляцію чутливості та експресією цих генів.

Також буде досліджено характер експресії генів та регуляції білкових компонентів про- та антиапоптичних сигнальних шляхів, що активуються у пухлинних клітинах у відповідь на комбінований вплив дефіциту аргініну та індоспіцину. Ідентифікація молекулярних маркерів чутливості пухлин до цієї метаболічної терапії є важливою для формулювання рекомендацій щодо аналізу маркерних факторів чутливості до дії досліджуваної терапії. Зокрема буде проаналізовано MAPK сигнальний каскад, AMPK та PI3K-АКТ. Аналіз проводитиметься шляхом виявлення фосфорильованих форм білків та дослідження впливу інгібіторів р44/42 MAPK (ERK1/2) (U0126), AMPK (compound C) та PI3K (вортманіну) на чутливість пухлинних клітин до комбінованого впливу дефіциту аргініну та індоспіцину. Для цього буде використано антитіла до активованих форм ERK1/2, p38/MAPK, SAPK/JNK1/2, AMPK, АКТ.

Також у рамках проекту буде проведено тестування *in vivo* на моделі лабораторних тварин ефекту комбінованої дії аргінази I людини та індоспіцину. Буде встановлено максимальну толерану та ефективну концентрації індоспіцину для мишей лінії BalbC, при адміністрації нативної та пегільованої форми рекомбінантної аргінази людини. За умови успішного результату, експеримент буде повторено з тваринами з перевиваною меланомою B16-F10, клітини якої є чутливими до монотерапії на основі аргінази *in vitro* (неопубліковані результати). Буде сформульовано висновок про необхідність наступних тестувань на альтернативних моделях пухлин та щодо загальної ефективності запропонованої комбінаційної терапії.

## **10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та роботою в цілому**

У результаті виконання проекту буде запропоновано новий підхід комбінованої терапії злоякісних пухлин на основі голодування за аргініном (з використанням рекомбінантної аргінази людини I) та нового аналога аргініну рослинного походження індоспіцину. У ході виконання проекту буде проведено аналіз протипухлинної активності індоспіцину та рекомбінантної аргінази на декількох клітинних моделях *in vitro* а також попередні дослідження токсичності та селективності дії на тваринних моделях. За результатами цих досліджень будуть сформульовані висновки та рекомендації щодо подальшої оптимізації комбінованої ензимотерапії на основі індоспіцину та наступних клінічних випробувань.

Результати роботи будуть опубліковані у провідних міжнародних та вітчизняних наукових виданнях та представлені на міжнародних наукових конференціях. Терапевтично-важливі результати досліджень будуть захищені вітчизняними та міжнародними патентами.

**11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню роботи**

Науковий звіт, Акт прийому-здачі робіт, перелік наукових публікацій та патентів за результатами виконання роботи, облікова картка

Науковий керівник роботи

Старший науковий співробітник  
Інституту біології клітини НАН України

к.б.п.  Ярослав БОБАК  
(підпис)



Планова калькуляція кошторисної вартості наукової (науково-технічної) роботи

«Аналіз біологічної активності аналога аргініну рослинного походження індоспіцину як компонента протипухлинної метаболічної  
ензимотерапії на основі рекомбінантної аргінази людини»  
на 2020 рік

Термін виконання роботи: початок — 01.04.2020 р., закінчення — 31.12.2024 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	100,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	22,000
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	16,500
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	1,000
5	Видатки на відрядження	2250	1,500
6	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	8,000
7	Оплата електроенергії	2273	40,000
8	Оплата природного газу	2274	10,000
9	Інші поточні видатки	2800	1,000
<b>Разом:</b>			<b>200,000</b>
в т.ч. накладні витрати			33,300
% їх до основної заробітної плати			36,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор  
Інституту біології клітини НАН України  
академік НАН України

Андрій СИБІРНИЙ

(підпис)

25255758  
М.П.

Науковий керівник роботи  
Старший науковий співробітник  
Інституту біології клітини НАН України  
к.б.н. Ярослав БОБАК  
(підпис)