

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-8-3-6
© Коллектив авторов, 2018

Е. Ю. Григорьева¹, Ю. В. Стукалов¹, А. В. Смирнова¹, Е. Ю. Колдаева¹,
Н. С. Калыгина¹, В. Н. Кулаков², А. Ю. Барышников¹

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ С ¹⁸⁸RE С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ АНТИ-ICO-25 (MUC1) И АНТИ-ICO-80 (CD5) НА МОДЕЛЯХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ SKOV-3 (РАК ЯИЧНИКА) И JURKAT (Т-ЛИМФОБЛАСТНАЯ ЛИМФОМА)

¹ ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина" Минздрава РФ, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24; e-mail: grig-elen11@mail.ru

² Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна ФМБА РФ, Россия, 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46; e-mail: vikov38@mail.ru

Перспективным направлением лучевой терапии является адресная (таргетная) радиоиммунотерапия. В разработанной конструкции опухолеспецифичностью обладали моноклональные антитела анти-ICO-25 (MUC1) и анти-ICO-80 (CD5), а терапевтическим радионуклидом является ¹⁸⁸Re. Адресность (таргетность) созданных конструкций была показана *in vitro* на моделях клеточных линий SKOV-3 (рак яичника) и Jurkat (Т-лимфобластная лимфома), которые характеризуются наличием на мембране специфических рецепторов к соответствующим антителам. Результаты оценки кратковременной цитотоксичности показали 90 – 93 % гибель клеточных популяций, что свидетельствует о перспективности изучаемых конструкций с направленной доставкой в создании диагностических и терапевтических препаратов онкологического назначения.

Ключевые слова: терапия; радиоиммунотерапия; ¹⁸⁸Re; моноклональные антитела; анти-ICO-25 (MUC1); анти-ICO-80 (CD5).

Одним из успешных вариантов лучевой терапии является адресная (таргетная) радиоиммунотерапия. Основной проблемой при ее внедрении в практическую медицину является сохранение специфичности опухолетропного носителя после связывания с конструкцией радионуклида, обеспечивающего радиобиологический эффект.

Для создания препаратов мы предлагаем использовать конструкции на основе синтезированных нами дендримеров (Д) [1]. Структура такой конструкции с моноклональными антителами (Mab) представлена на рис. 1. Внешний слой Д химически модифицируется, что обеспечивает контроль качества препарата, степень гидрофобности его ядра и прицельной доставки конструкции внутрь или на поверхность опухолевых клеток. В качестве терапевтического радионуклида в конструкциях использовали ¹⁸⁸Re ($T_{1/2} = 17$ ч, β -излучение — $E_{\text{CP}} = 764$ кэВ, γ -излучение — $E_{\text{CP}} = 155$ кэВ) в виде перрената натрия с радиохимической чистотой ≥ 95 % (генератор рения-188 ГРЕН-1, Акционерное общество "Государственный научный центр Российской Федерации — Физико-энергетический институт им. А. И. Лейпунского" (АО "ГНЦ РФ — ФЭИ"), Обнинск, Калужская обл.), для его связывания с конструкцией, в которой присутствовал сафранин (сафранин Т, Fluka, США).

Цель данной работы — изучение на модели опухолевых клеток возможности применения полученных конструкций в качестве средства направленной доставки противоопухолевых радионуклидов в мишень — опухолевую клетку. Исследованы дендример-сафранин-Mab (анти-ICO-25 (MUC1)) — ¹⁸⁸Re (I); дендример-сафранин-Mab (анти-ICO-80 (CD5)) — ¹⁸⁸Re (II) и [¹⁸⁸Re]-перренат натрия (III).

Экспериментальная часть

Токсикологические испытания исходного Д проводили на здоровых мышках-самках Balb/c массой 18 – 20 г. Исходный Д вводили внутривенно в 0,2 мл 10 % ДМСО в физиологическом растворе. Испытывали 10 различных доз, формируя группы из 8 особей. В качестве контроля 8 животным вводили 0,2 мл 10 % ДМСО в физиологическом растворе. Испытывали дозы в интервале от 100 до 1500 мг на 1 кг массы тела. Наблюдение за животными осуществляли в течение 1 мес, ежедневно отмечая изменения в их состоянии и поведении и проводя взвешивание. Погибших мышей вскрывали и макроскопически оценивали выраженные изменения внутренних органов.

Mab – анти-ICO-80 (CD5) и анти-ICO-25 (MUC1) – получены и охарактеризованы ранее в НИИ клиниче-

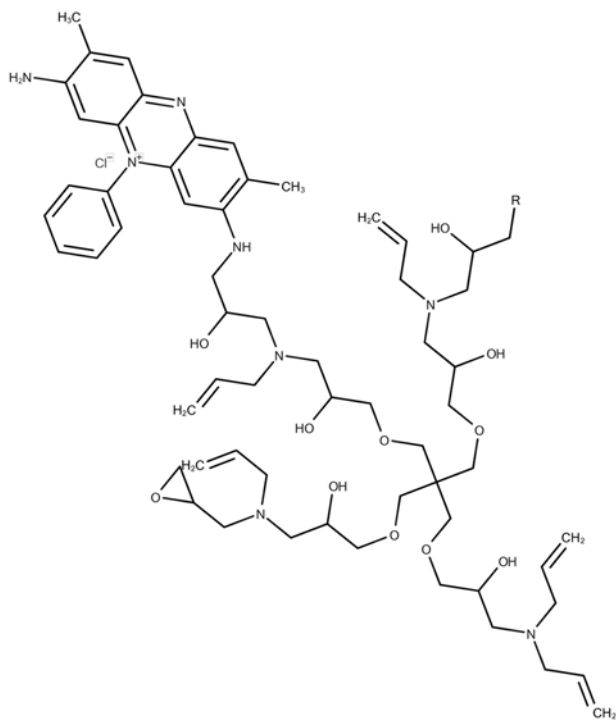


Рис. 1. Конструкция на основе Д с Mab; R — Mab анти-ICO-25 (MUC1) или Mab — анти-ICO-80.

ской онкологии [2 – 4]. В качестве модельных объектов выбраны стабильные опухолевые клеточные линии Jurkat (Т-лимфобластная лимфома), и SKOV-3 (рак яичника), которые характеризуются наличием на их мембране специфических рецепторов к соответствующим антителам. Клетки линии Jurkat (ATCC® TIB-152™) имеют рецепторы CD5, способные связывать анти-ICO-80 и интернализироваться [5, 6]. Для клеточной линии SKOV-3 (ATCC® HTB-77™) характерно конститутивное наличие на мембране клетки белка (MUC1) [7], специфичного для анти-ICO-25, который позволяет попасть внутрь клетки Д с таргетной частью. Клеточные линии SKOV-3 и Jurkat предоставлены ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина” Минздрава РФ.

Культивирование клеток линии SKOV-3 проводили в среде RPMI1640, содержащей L-глутамин 1,5 мМ (Sigma, США), гентамицин 40 нг/мл (ICN, США), телячьей эмбриональной сыворотку 10 %; рутинное поддержание осуществляли согласно рекомендаций производителя. Культивирование клеток линии Jurkat осуществляли согласно требований производителя методом лимитирующих разведений в среде RPMI1640, содержащей L-глутамин 2 мМ (Sigma, США), гентамицин 40 нг/мл (ICN, США), аминокислоты и витамины (ICN, США), 10 % телячьей эмбриональной сыворотку, 10 мМ HEPES (Sigma, США). Частичную смену среды для поддержания логарифмической фазы роста клеток осуществляли каждые 2 сут.

При работе с Mab концентрацию белка определяли по “Bicinchoninic acid protein assay kit” (Sigma-Aldrich № B9643). Инкубацию проводили в термостате при 37 °С в течение 30 мин. Затем смесь охлаждали, измеряли оптическую плотность (OD) при $\lambda = 562$ нм на спектрофотометре (“Пикон” РФ).

Инкубацию клеток проводили в условиях автоматического CO₂-инкубатора с водяной рубашкой (NU-4750E) при температуре + 37 °С в присутствии 5 % CO₂. Данные условия культивирования не изменяли при работе с клетками.

Активность конструкций как потенциальных противоопухолевых радиофармацевтических препаратов оценивали в соответствии с действующими в РФ рекомендациями по проведению доклинических исследований [8]. В качестве критерия использовали индекс цитотоксической гибели клеток, который определяли рекомендованными методами [8].

В 96-луночные культуральные планшеты, обработанные для снижения клеточной адгезии, вносили суспензию клеток в чистой среде в количестве 200000 клеток на лунку в триплетах. Контролем служили нативные клетки и клетки с добавлением III с радиоактивностью 0,05 МБк. Конструкции I, II с таким же уровнем радиоактивности вносили в экспериментальные лунки, после чего планшет культивировали при 37 °С в 5 % CO₂. Сроки инкубации клеток — 0,5, 1, 3 и 6 ч. Через 30 мин инкубации собирали среду и заменяли ее на чистую. Осаждения клеток добивались трех-

Таблица 1
Динамика кратковременной выживаемости клеточной популяции линий SKOV-3 и Jurkat в зависимости от времени инкубации с I, II, III (радиоактивность ¹⁸⁸Re = 0,05 МБк)

Продолжительность инкубации, ч	Линия SKOV-3			Линия Jurkat		
	I	III		II	III	
	количество выживших клеток	% выживших клеток к посеянному (200 тыс.)	% выживших клеток к посеянному (200 тыс.)	количество выживших клеток	% выживших клеток к посеянному (200 тыс.)	% выживших клеток к посеянному (200 тыс.)
0,5	37104 ± 1018*#	18,55 ± 0,51	29,22 ± 0,76	9230 ± 940,70*#	4,08 ± 0,47	28,16 ± 1,33
1	17116 ± 274*#	8,56 ± 0,14	26,77 ± 1,60	13407 ± 397,71*#	6,70 ± 0,20	33,79 ± 0,22
3	16935 ± 586*#	8,47 ± 1,47	26,65 ± 0,69	13056 ± 417,72*#	6,53 ± 1,04	32,99 ± 1,50
6	15743 ± 360*#	7,87 ± 0,19	26,22 ± 2,27	10693 ± 403,90*#	6,68 ± 1,01	29,03 ± 1,15

* Различия с группой III достоверны ($p < 0,05$).

Различия с группами интактных клеток достоверны ($p < 0,03$).

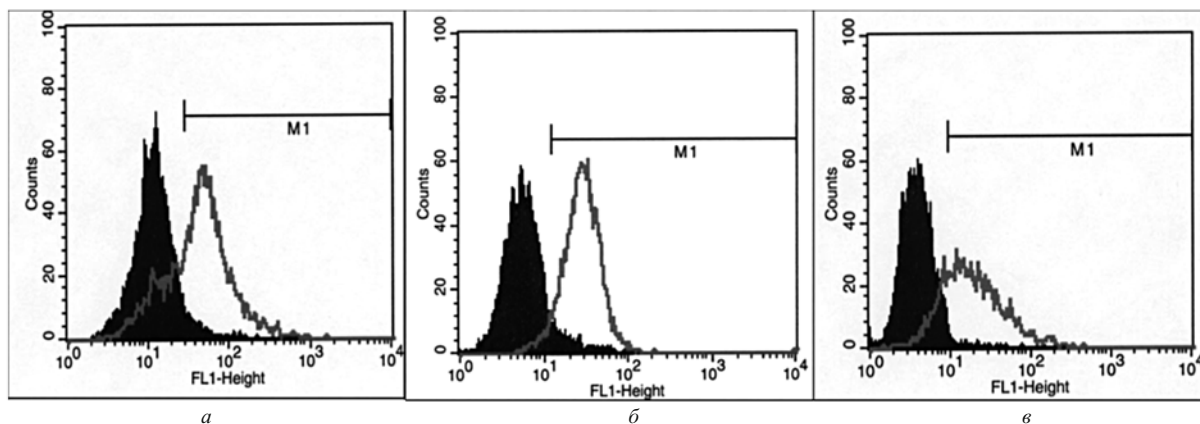


Рис. 2. Результаты исследования клеточной популяции методом проточной цитофлуориметрии: *a* — количественная оценка Mаб MUC1-позитивных (ICO-25+) клеток на линии SKOV-3; заполненная гистограмма — негативный контроль, пустотелая гистограмма — антиген-позитивные клетки (85,3 %); *б* — количественная оценка Mаб CD5-позитивных (ICO-80+) клеток Jurkat; заполненная гистограмма — негативный контроль, пустотелая гистограмма — антиген-позитивные клетки (90,3 %), интенсивность флуоресценции 39,8; *в* — анализ специфического связывания IV с клетками линии SKOV-3; заполненная гистограмма — негативный контроль, пустотелая гистограмма — антиген-позитивные клетки (73,1 %).

кратным (с заменой среды) центрифугированием при 1000 об/мин. Далее собирали клетки и определяли их радиоактивность и радиоактивность суммарного отмывочного раствора, содержащего погибшие клетки. Аналогичную процедуру проводили для всех клеток, но продлевали инкубацию после замены до 1, 3 и 6 ч в полной среде для культивирования [9]. Перед каждой временной точкой проводили микроскопический мониторинг состояния и подсчет живых клеток методом Гольдмана [10], параллельно проводили радиометрические измерения.

Количества I, II, III рассчитывали в соответствии с молярностью вносимого ^{188}Re (1 МБк ^{188}Re — 0,00015 нМ). Для полного связывания ^{188}Re брали не менее чем 100-кратный избыток модифицированного Д. Добавляли III в исследуемые соединения *ex tempore*.

ЯМР-спектры снимали на спектрометре Bruker WH-360 (Германия) с рабочей частотой 360 МГц. ТСХ проводили с использованием пластинок с силикагелем типа Si 60 (размер частиц 5–17 мкм) фирмы Fluka (США). Хроматограммы проявляли в парах иода. Данные Д по ТСХ: R_f 0,15 (хлороформ — метанол, 8:2), 0,54 (хлороформ — метанол, 7:3).

Для статистической обработки данных применялся непараметрический критерий Манна — Уитни.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований острой токсичности на мышах исходного Д были определены основные токсикологические характеристики: летальная доза LD_{100} , равная 1500 мг на 1 кг массы тела, и максимально переносимая доза МПД, равная 375 мг на 1 кг массы тела животного. Рассчитанная среднесмертельная доза LD_{50} составила 771 мг на 1 кг массы тела. Порог острого действия совпадал с максимально переносимой дозой. В переносимых дозах Д не вызывал никаких отклонений в поведении или состоянии животных. Зона острого токсического действия LD_{50} Lim равна 2,05, что характеризовало вещество как безопасное [12–14].

Mаб из асцита мышей Balb/c очищали в соответствии с работой [15]. Среднее количество наработанных Mаб ICO-25 — 5 мг, антител ICO-80 — 10 мг. Активность Mаб была проверена в реакции непрямой иммунофлуоресценции в концентрациях от 1–25 мкг/мл. Оптимальной оказалась концентрация ICO-25 — 4 мкг/мл (рис. 2, *a*), а ICO-80 — 10 мкг/мл (рис. 2, *б*).

Таблица 2

Данные радиометрических измерений при оценке кратковременной выживаемости клеточной популяции линий SKOV-3 и Jurkat в зависимости от времени инкубации с I и II (радиоактивность ^{188}Re = 0,05 МБк)

Продолжительность инкубации, ч	Линия SKOV-3 (I)			Линия Jurkat (II)		
	внесенная радиоактивность, СРМ	радиоактивность клеток, осевших на пластик, СРМ	выжившие клетки, %	внесенная радиоактивность, СРМ	радиоактивность клеток, осевших на пластик, СРМ	выжившие клетки, %
0,5	780452 ± 5096	168784 ± 386*	21,63 ± 0,05	794505 ± 4963	34480 ± 2778*	4,34 ± 0,35
1	806442 ± 3610	75472 ± 877*	9,36 ± 0,11	819010 ± 2671	64015 ± 427*	7,82 ± 0,06
3	823524 ± 424	76190 ± 192*	9,25 ± 0,29	823730 ± 3932	60278 ± 459*	7,33 ± 0,05
6	790592 ± 2424	73762 ± 39*	9,33 ± 0,28	784260 ± 6317	63133 ± 2043*	7,72 ± 0,05

* Различия с группой III достоверны ($p < 0,05$).

Далее МАb связывали с модифицированным Д. Поскольку связывание с модифицированным Д могло изменить конформацию антител, то была протестирована их способность выявлять антиген при титровании антител в связанном состоянии. Так для I в среднем определяли 70 % антиген-позитивных клеток (рис. 2, в).

При культивировании клеток линий SKOV-3 и Jurkat в присутствии III происходит гибель клеточной популяции через 30 мин от начала эксперимента, и до 6 ч их выживаемость составляла 26 – 33 % (различия в группах не были статистически значимыми ($p > 0,1$) для всех временных точек). Таким образом, было показано незначительное цитотоксическое действие III на клеточную популяцию.

При культивировании клеток SKOV-3 с I уже через 30 мин количество выживших клеток составило 18,6 %, а через 1 ч — 8,6 % и далее не менялось ($p > 0,1$) (табл. 1). Результаты микроскопии и радиометрии (табл. 2) согласуются между собой, а выявленная на клеточной линии SKOV-3 цитотоксичность после добавления I была частично связана с природой MUC1. Этот протеогликан семейства муцинов позволяет сохранить клеточные контакты и при неблагоприятных условиях его основная изоформа напрямую связывает SH2-домен белка GRB2, образуя комплекс MUC1/GRB2/SOS1, который отвечает за передачу сигнала опосредованного Ras, чем инициирует процессы аутофагии/апоптоза [16].

При культивировании клеток Jurkat с II (активность $^{188}\text{Re} = 0,05$ МБк) через 30 мин количество выживших клеток составило 4,08 – 4,34 %, в течение последующих 1 – 6 ч количество погибших клеток не менялось, выживаемость составляла 6,53 – 7,82 % (табл. 1, 2).

Эти данные свидетельствуют о том, что связывание антитела с поверхностным рецептором клеток и их фиксация в результате иммунологической реакции происходит в первые 30 мин. Затем начинается интернализация белка и развивается желаемый для противоопухолевой терапии биологический эффект адресной

доставки (таргетного действия) — гибель опухолевых клеток.

Таким образом, предлагаемая конструкция является перспективной при разработке препаратов для адресной (таргетной) радиотерапии опухолей в связи со специфическим связыванием, позволяющим удерживать радионуклид (^{188}Re) на/в опухолевых клетках, что было подтверждено в результате оценки кратковременной цитотоксичности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. В. Стукалов, А. С. Масько, Н. С. Калыгина и др., *Рос. биотер. ж.*, **9**(3), 23 (2010).
2. А. Ю. Барышников, *Гематол. и трансфузиол.*, № 8, 4 – 7 (1990).
3. И. А. Карпов, А. Ю. Барышников, К. Л. Чимишкян и др., *Вестник РОИЦ*, № 1, 7 – 9 (1991).
4. А. Д. Каприн, Л. М. Александрова, В. В. Старинский, *Исслед. и практика в мед.*, **2**(2), 53 – 62 (2015).
5. S. Loisel, A. Pierre-Alain, J. Golay, et al., *Mol. Cancer*, **10**, 42 (2011).
6. Y. Nishimura, Barbara E. Bierer, W. K. Jones, et al., *Euro. J. Immunol.*, **18**(5), 747 – 753 (1988).
7. G. Shahbazi, M. Abdolahi, *J. Med. Sci.*, **12**(8), 256 – 266 (2012).
8. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, гл. 39, Гриф и К., Москва (2012).
9. E. Yu. Grigorieva, Yu. V. Stukalov, A. V. Smirnova, *Abstrs. of the Int. Forum Nanotechn.*, Moscow (2008), Abstr. Scientific and technological sections, V. 2, pp. 296 – 298.
10. R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 4th Ed. (2000).
11. А. М. Пакен, *Эпоксидные соединения и эпоксидные смолы*, ГХНТИ, Ленинград (1962).
12. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963).
13. Т. А. Гуськова, *Токсикология лекарственных средств*, Русский врач, Москва (2003), с. 51 – 78.
14. Е. Ю. Колдаева, Е. Ю. Григорьева, Ю. В. Стукалов, *Рос. биотер. ж.*, **9**(3), 13 – 14 (2010).
15. П. К. Иванов, А. С. Гриневич, А. А. Молодык и др., *Рос. биотер. ж.*, **5**(3), 26 – 34 (2006).
16. Y. Li and P. J. Cozzi, *Cur. Cancer Drug Targets*, **7**(3), 259 – 271 (2007).

Поступила 06.06.16

CYTOTOXICITY OF STRUCTURES BASED ON DENDRIMERS WITH ^{188}RE RADIONUCLIDE AND MONOCLONAL ANTIBODIES ANTI-ICO-25 (MUC1) AND ANTI-ICO-80 (CD5) ON MODELS OF SKOV3 (OVARY CANCER) AND JURKAT (T-LYMPHOBLAST LYMPHOMA) TUMOR CELL LINES

E. Yu. Grigor'eva^{1*}, Yu. V. Stukalov¹, A. V. Smirnova¹, E. Yu. Koldaeva¹, N. S. Kalygina¹, V. N. Kulakov², and A. Yu. Baryshnikov¹

¹ “N. N. Blokhin National Medical Research Cancer of Oncology”, Moscow, 115478 Russia

² A. I. Burnazyans Federal Medical Biophysical Center, Federal Medico-Biological Agency of Russia, Moscow, 123182 Russia

* e-mail: grig-elen11@mail.ru

Targeted radioimmunotherapy is a promising approach in radiotherapy. We have synthesized tumor-specific compounds using monoclonal antibodies anti-ICO-25 (MUC1) and anti-ICO-80 (CD5) with ^{188}Re isotope therapeutic radionuclide. Specificity of compounds was shown *in vitro* using SKOV3 (ovary cancer) and Jurkat (T-lymphoblast lymphoma) tumor cell lines, which are known to have surface receptors on their membrane specific to the indicated antibodies. Short-term cell survival tests revealed 90 – 93% death of tumor cells showing good prospects of proposed targeted delivery structures for developing cancer diagnostics and therapy.

Keywords: radioimmunotherapy; ^{188}Re isotope; monoclonal antibodies; anti-ICO-25 (MUC1); anti-ICO-80 (CD5).