

УДК 577.27

Влияние рекомбинантного адресного токсина DARPin-PE40 на динамику роста HER2-положительных опухолей

Е. А. Соколова^{1,2*}, Г. М. Прошкина^{1*}, О. М. Кутова², И. В. Балалаева^{1,2}, С. М. Деев^{1,2,3}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: malehanova@mail.ru, gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 06.06.2017

Принята к печати 04.09.2017

РЕФЕРАТ Разработка адресных токсинов на основе направляющих молекул неиммуноглобулиновой природы представляется актуальной для развития таргетной терапии злокачественных новообразований с высокой экспрессией рецептора-онкомаркера HER2. Ранее на ксенографтной модели HER2-положительной аденокарциномы нами было показано, что адресный токсин DARPin-PE40, содержащий HER2-специфичный полипептид неиммуноглобулиновой природы в качестве направляющего модуля и фрагмент псевдомонадного экзотоксина А в качестве токсического модуля, проявляет противоопухолевый эффект *in vivo*. В данной работе проведен углубленный анализ влияния DARPin-PE40 на динамику роста ксенографтных опухолей у мышей. Показано, что воздействие DARPin-PE40 в дозе 25 и 50 мкг/животное приводит к замедлению роста опухоли, а в дозе 80 мкг/животное вызывает сокращение опухолевого узла с последующим возобновлением роста по окончании терапии. Оценка динамики роста опухолей выявила статистически значимые различия в объеме опухолей у мышей опытных групп по сравнению с контрольной. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования адресного токсина в качестве агента для таргетной терапии опухолей, сверхэкспрессирующих HER2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА неиммуноглобулиновый модуль DARPin, псевдомонадный экзотоксин А, рецептор HER2, таргетная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DARPin – искусственный белок с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein); EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; HER 1–4 – рецепторы 1–4 семейства рецептора эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 1–4); Ni²⁺-NTA – нитрилотриуксусная кислота с иммобилизованными ионами никеля; PE40 – фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (Pseudomonas exotoxin A); PMSF – фенолметилсульфонилфторид; а.о. – аминокислотный остаток (при числе).

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы согласно статистическим данным МНИОИ им. П.А. Герцена Минздрава России за 2015 год является ведущим по частоте встречаемости злокачественных заболеваний у женщин и составляет 20.9% от общего количества ежегодно выявляемых новообразований [1]. Рак молочной железы также занимает печально лидирующее место по смертности от онкологических заболеваний среди женского населения России, и в 2015 году этот показатель составлял 17%. Что касается мировой статистики, то ежегодно в мире пример-

но у 1.6 млн женщин диагностируют рак молочной железы, и примерно 500000 умирают от этого заболевания.

С учетом этих цифр, разработка новых противоопухолевых агентов и новых подходов к терапии онкологических заболеваний является актуальной задачей. Большое развитие в последнее время получила таргетная, или адресная, терапия. Этот подход предполагает нацеленное воздействие на опухолевые клетки за счет использования специфических бифункциональных терапевтических агентов, способных, с одной стороны, избирательно связываться

с опухолевыми клетками, а с другой – эффективно элиминировать их [2].

Одна из наиболее изученных терапевтических мишеней – рецептор HER2 семейства рецептора эпидермального фактора роста человека [3, 4]. Тирозинкиназный рецептор HER2 в норме присутствует во всех типах эпителиальных тканей человека, и его плотность составляет несколько тысяч молекул на клетку. Амплификация гена *HER2* при злокачественной трансформации клетки приводит к сверхэкспрессии кодируемого им рецептора, при этом рецептор HER2 обретает способность к конститутивной гетеродимеризации с другими рецепторами семейства (HER1, HER3, HER4). Непрерывная передача сигнала от мембраны к ядру приводит к повышению клеточной пролиферации, ингибированию апоптоза и, в конечном итоге, к формированию опухоли и метастазированию. Известно, что в 15–20% опухолей молочной железы и рака яичника человека повышен уровень экспрессии гена *HER2* [3, 5].

Одним из наиболее эффективных белковых токсинов, используемых в адресной терапии, является экзотоксин *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Псевдомонадный экзотоксин представляет собой трехдоменный белок, состоящий из 613 а.о. Мы заменили первый домен экзотоксина (1–252 а.о.), отвечающий за связывание токсина с природным рецептором, на HER2-специфичный неиммуноглобулиновый модуль DARPIn [7], превратив таким образом экзотоксин в токсин направленного действия. Новый класс адресных молекул неиммуноглобулиновой природы на основе искусственных белков с анкириновыми повторами – DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins), все шире и шире используется в молекулярно-биологических исследованиях в качестве адресных модулей [8–10]. DARPins не содержат остатков цистеина, что позволяет продуцировать эти белки непосредственно в цитоплазме *Escherichia coli*, отличаются высоким уровнем экспрессии в бактериальной системе, представлены мономерами в растворе, не склонны к агрегации и характеризуются высокой устойчивостью к протеазам [11]. Перечисленные особенности дают каркасным белкам значительные преимущества перед иммуноглобулинами в качестве альтернативных адресных компонентов в составе мультифункциональных соединений, предназначенных для диагностики и терапии различных заболеваний.

Нами проведен анализ динамики противоопухолевого эффекта адресного токсина на основе фрагмента псевдомонадного экзотоксина А и HER2-специфичного каркасного белка DARPIn *in vivo* на ксенографтной модели аденокарциномы молочной железы человека с высокой экспрессией рецептора-мишени HER2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение высокоочищенного препарата адресного токсина DARPIn-PE40 для *in vivo* исследований

Ген *DARPIn-PE40* экспрессировали в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3) как описано в [12]. Свежевыращенные трансформанты (из расчета 1 колония на 1 мл среды) вносили в 25 мл автоиндукционной среды TBP-5052 [13], содержащей 2 мМ MgSO₄, 25 мМ Na₂HPO₄, 25 мМ KH₂PO₄, 50 мМ NH₄Cl, 0.5% глицерина, 0.05% глюкозы, 0.2% лактозы, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% триптона, 0.1 г/л ампициллина, и растили в 250-мл колбе в течение 24 ч при 25°C до достижения культурой оптической плотности OD₆₀₀ = 20–25. Клетки осаждали центрифугированием на охлажденной центрифуге при 6000 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса (200 мМ Трис-НСl, 500 мМ сахароза, 1 мМ EDTA, pH 8.0, 60 мкг/мл лизоцима). Полученную суспензию разбавляли стерильной водой, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки помещали на ледяную баню и разрушали с использованием звукового дезинтегратора Vibra Cell (Sonic, США) в режиме – 10 с обработка ультразвуком, 10 с охлаждение, всего 30 циклов. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин на охлажденной центрифуге. К осветленному супернатанту добавляли ингибитор протеаз PMSF (1 мМ) и 100 мМ NaCl. Для удаления нуклеиновых кислот к лизату при постоянном помешивании добавляли по каплям полиэтиленимин до конечной концентрации 0.03%. После добавления полиэтиленимина лизат перемешивали в течение 15 мин при 4°C, центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g. Полученный лизат фильтровали через фильтр 0.22 мкм, добавляли имидазол (до конечной концентрации 30 мМ) и NaCl (500 мМ) и наносили на колонку Ni²⁺-NTA (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенную буфером: 20 мМ Na-Pi, pH 7.5, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазол. Целевой белок DARPIn-PE40 элюировали, используя линейный градиент имидазола (30–500 мМ). Пик, сошедший с колонки при ~150 мМ имидазола, использовали для очистки с использованием ионообменной хроматографии. Белок переводили в буфер, содержащий 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, с использованием колонки PD10 (GE Healthcare, США). Раствор белка разбавляли в 3 раза буфером 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0 и наносили на колонку MonoQ5/50 GL (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0. Для элюции белка использовали линейный градиент NaCl (0–1 М). DARPIn-PE40 элюировался с колонки при концентрации NaCl, рав-

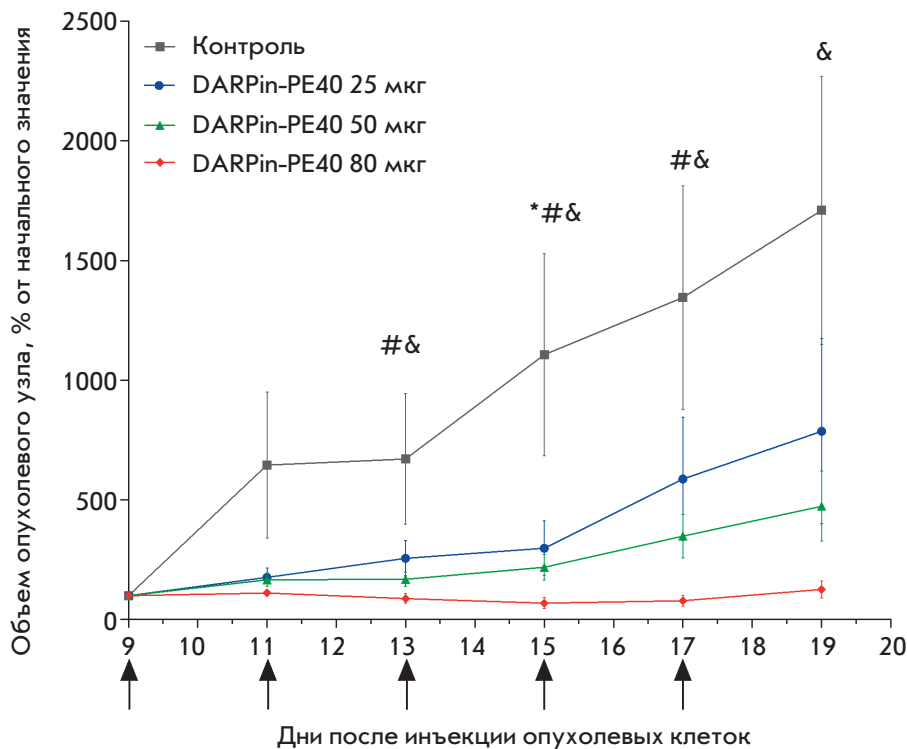


Рис. 1. Кривые роста ксенографтных опухолей SK-BR-3 у животных разных групп. За день 0 принят день подкожной инъекции клеток SK-BR-3 мышам. Дни инъекций DARPin-PE40 обозначены стрелками. *, #, & – статистически значимое различие между контрольной и опытными группами: 25, 50 и 80 мкг DARPin-PE40 соответственно ($p < 0.05$, критерий Даннета, $n = 5$)

ной примерно 500 мМ. Выход целевого белка составил 140 мг на 1 л культуры.

Оценка противоопухолевой эффективности DARPin-PE40 *in vivo*

Противоопухолевую активность определяли на ксенографтной опухоли человека. Бестимусным мышам линии BALB/c nude в возрасте 6–8 нед. вводили подкожно 10^7 клеток аденокарциномы молочной железы человека линии SK-BR-3 в 200 мкл фосфатно-солевого буфера. Сверхэкспрессию HER2 в опухолевой ткани подтверждали *ex vivo* методом иммуногистохимического анализа с использованием набора HercepTest (Dako, США). Мониторинг роста опухоли проводили, используя стандартную методику определения размеров опухоли с помощью штангенциркуля, измеряя два диаметра. Объем опухоли рассчитывали по формуле: $V = a \times b^2/2$, где a – больший диаметр, b – меньший диаметр [14]. Начиная с 9 дня после инъекции опухолевых клеток, когда средний объем опухоли составлял ~ 100 мм³, животных произвольным образом разделили на опытные и контрольную группы (по пять в каждой группе). Животным опытных групп через день вводили в хвостовую вену по 200 мкл DARPin-PE40 в фосфатно-солевом буфере в общей дозе 25 мкг/животное (пять инъекций по 5 мкг белка на 9, 11, 13, 15 и 17 дни), 50 мкг/животное (пять инъекций по 10

мкг белка на 9, 11, 13, 15 и 17 дни) или 80 мкг/животное (четыре инъекции по 20 мкг белка на 9, 11, 13 и 15 дни). Животным контрольной группы вводили по 200 мкл фосфатно-солевого буфера на 9, 11, 13, 15 и 17 дни после инъекции опухолевых клеток. При достижении опухолевым узлом объема ~ 2500 мм³ животных подвергали процедуре эвтаназии. Для построения кривых роста опухолей использовали рассчитанные значения объема опухоли, выраженные в процентах от значений на начальный момент времени (в день начала терапии). Данные представляли как среднее \pm стандартная ошибка среднего в каждой временной точке.

Для количественной оценки противоопухолевого эффекта начальную стадию кривой опухолевого роста у животных каждой группы описывали уравнением $V = V_0 \times e^{kt}$, где V_0 – значение объема опухолевого узла в начальный момент времени, соответствующий началу терапии, k – коэффициент скорости роста опухоли. Значения k определяли путем линеаризации экспоненциальной фазы роста опухоли (логарифмирования значений объема опухоли) с последующей линейной аппроксимацией. Период удвоения опухоли рассчитывали по формуле $\ln 2/k$. Данные представляли с помощью диаграмм размаха, отражающих значения медианы, 25-го и 75-го перцентилей и разброса значений в каждой группе животных.

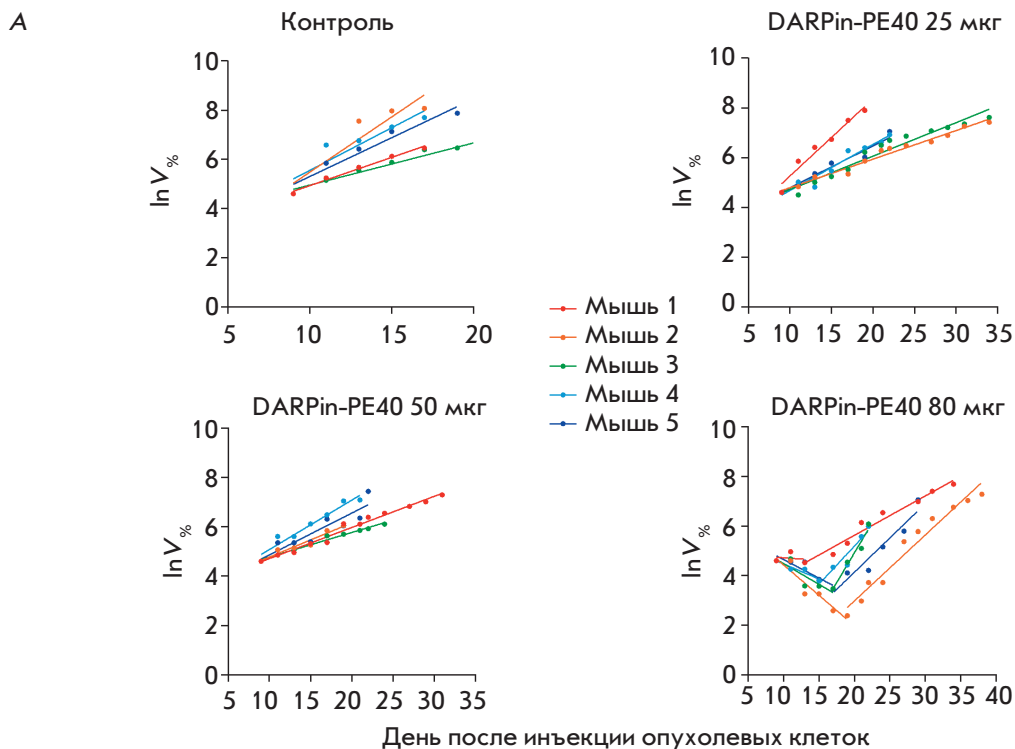
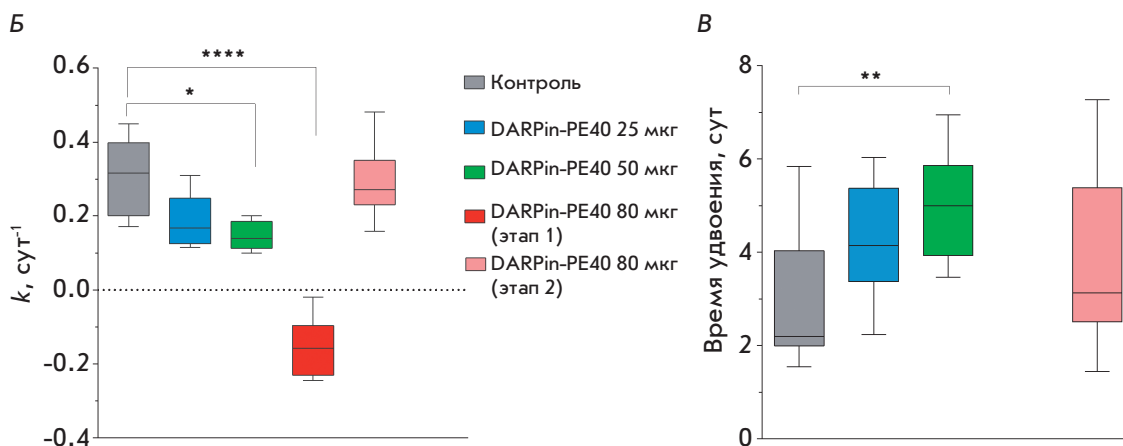


Рис. 2. Анализ роста ксенографтных опухолей SK-BR-3 у животных разных групп. А – линейаризация экспоненциальной фазы роста опухолей ($V\%$ – значение объема опухоли в процентах от значения на момент начала терапевтического воздействия). Показаны данные для индивидуальных животных в каждой группе; Б – диаграмма размаха значений коэффициента скорости роста опухоли k ; В – диаграмма размаха значений периода удвоения опухоли (* $-p < 0.05$, ** $-p < 0.01$, **** $-p < 0.0001$)



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На предыдущих этапах работы нами был создан и детально охарактеризован *in vitro* агент направленного действия для высокоэффективной таргетной терапии HER2-положительных опухолей – рекомбинантный адресный токсин DARPin-PE40. Данный агент обладает противоопухолевым эффектом, который выражается в торможении роста ксенографтных опухолей *in vivo* [15]. Адресный модуль в данной конструкции представлен молекулой неиммуноглобулиновой природы на основе искусственного белка с анкириновыми повторами – DARPin, способной узнавать рецептор HER2 с высокой аффинностью ($K_D = 3.8$ нМ) [7]. В качестве цитотоксического моду-

ля в конструкции использовали фрагмент PE40 (молекулярная масса 40 кДа) псевдомонадного экзотоксина А, который лишен природного рецепторсвязывающего домена [16]. Генетическую конструкцию, кодирующую этот гибридный белок, экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3). Гибридный белок DARPin-PE40 очищали с помощью металл-хелатной и анионообменной хроматографии.

В данной работе проведен углубленный анализ влияния DARPin-PE40 на динамику роста экспериментальных опухолей *in vivo*. Использовали бестимусных мышей линии BALB/c nude (6–8 нед.) с подкожно привитой аденокарциномой молочной железы человека SK-BR-3 (см. «Экспериментальную часть»),

которым повторно внутривенно вводили DARPin-PE40 в общей дозе 25, 50 или 80 мкг на животное (1.25, 2.5 или 4 мг/кг соответственно).

Определение динамики роста опухолей выявило выраженный противоопухолевый эффект рекомбинантного адресного токсина DARPin-PE40: были обнаружены статистически значимые различия в объеме опухолей у мышей опытных групп по сравнению с контрольной ($p < 0.05$) (рис. 1).

У опухолей как контрольной, так и опытных групп животных, получивших DARPin-PE40 в дозах 25 и 50 мкг, наблюдался экспоненциальный характер начальной стадии роста (рис. 2А). При этом на фоне воздействия DARPin-PE40 опухоли росли существенно медленнее: показано статистически значимое снижение коэффициента скорости роста опухоли (рис. 2Б) и соответственно увеличение периода удвоения опухоли (рис. 2В) в опытных группах по сравнению с контрольной. Этот эффект может объясняться сокращением доли делящихся клеток в растущем опухолевом узле в результате цитотоксического действия адресного токсина. Развитие экспериментальных опухолей при действии DARPin-PE40 в максимальной использованной дозе (80 мкг) характеризовалось наличием двух этапов. На первом этапе во время инъекций DARPin-PE40 наблюдалось экспоненциальное сокращение объема опухолей в среднем на 60% относительно объема к моменту начала терапии. На втором этапе после окончания инъекций DARPin-PE40 опухоли возобновили экспоненциальный рост (рис. 2).

Принимая во внимание гетерогенность опухоли и высокую генетическую нестабильность опухолевых клеток [17], одной из причин недостаточной эффективности DARPin-PE40 может быть наличие или появление устойчивой популяции опухолевых клеток, которая приводит к дальнейшей прогрессии опухоли по окончании терапевтического воздействия. Кроме того, поскольку условия эксперимента моделировали ситуацию терапевтического воздействия на уже сформировавшийся опухолевый узел, ограничения в эффективности адресного токсина можно связать и с его недостаточным проникновением вглубь опухолевой ткани. Это, в свою очередь, обусловлено рядом особенностей строения опухоли *in vivo*, включающих многочисленные межклеточные контакты, давление

интерстициальной жидкости, а также присутствие внеклеточного матрикса. Таким образом, наряду с увеличением дозировки и/или продолжительности терапии, перспективным подходом к усилению противоопухолевого эффекта рекомбинантного адресного токсина DARPin-PE40 может стать сочетание его действия с направленным повышением проникающей способности и накопления в опухоли. Подходы к решению данной проблемы довольно разнообразны и включают, в частности, контроль образования компонентов внеклеточного матрикса и/или их деградацию [18–20], а также временное нарушение межклеточных контактов в опухоли [21]. Последний подход показал свою эффективность при использовании HER2-специфичных полноразмерных терапевтических антител [22] и, по-видимому, является одним из перспективных путей развития таргетной противоопухолевой терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование каркасных белков неиммуноглобулиновой природы, в частности, DARPins, в качестве адресных (направляющих) молекул актуально для разработки новых агентов для таргетной противоопухолевой терапии. В работе исследована динамика противоопухолевой активности адресного токсина DARPin-PE40, в составе которого HER2-специфичный DARPin объединен в единую полипептидную цепь с токсическим фрагментом псевдомонадного экзотоксина А. Эффективность и достоверность противоопухолевого действия DARPin-PE40 свидетельствуют о перспективности его дальнейшего исследования как агента для таргетной терапии опухолей с высокой экспрессией рецептора-онкомаркера HER2. ●

Работа по получению рекомбинантного адресного токсина поддержана грантом РФФ (проект № 14-24-00106П); анализ противоопухолевого эффекта адресного токсина на животных выполнен при поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 6.7109.2017/9.10).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.
- Madhumathi J., Verma R.S. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2012. V. 15. P. 300–309.
- Поляновский О.Л., Лебедеко Е.Н., Деев С.М. // *Биохимия.* 2012. Т. 77. Вып. 3. С. 289–311.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N. // *Bioessays.* 2008. V. 30. P. 904–918.
- Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. // *Science.* 1987. V. 235. P. 177–182.
- Kreitman R.J. // *Aaps J.* 2006. V. 8. P. E532–E551.

7. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. P. 1211–1227.
8. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
9. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Biochimie.* 2015. V. 118. P. 116–122.
10. Verdurmen W.P., Luginbühl M., Honegger A., Plückthun A. // *J. Control Release.* 2015. V. 200. P. 13–22.
11. Plückthun A. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. V. 55. P. 489–511.
12. Соколова Е.А., Шульга А.А., Стрёмовский О.А., Балалаева И.В., Прошкина Г.М., Деев С.М. // *Биол. мембраны.* 2016. Т. 33. № 6. С. 429–434.
13. Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 207–234.
14. Geran R.I., Greenberg N.H., Macdonald M.M., Schumacher A.M., Abbott B.J. // *Cancer Chemother. Rep.* 1972. V. 3. P. 1–104.
15. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., Shilova O., Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. // *J. Control Release.* 2016. V. 233. P. 48–56.
16. Соколова Е.А., Здобнова Т.А., Стрёмовский О.А., Балалаева И.В., Деев С.М. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. Вып. 12. С. 1680–1686.
17. Pribluda A., de la Cruz C.C., Jackson E.L. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. P. 2916–2923.
18. Eikenes L., Tufto I., Schnell E.A., Bjorkoy A., De Lange Davies C. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. P. 359–368.
19. Cheng J., Sauthoff H., Huang Y., Kutler D.I., Bajwa S., Rom W.N., Hay J.G. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. P. 1982–1990.
20. Zeisberger S.M., Odermatt B., Marty C., Zehnder-Fjällman A.H., Ballmer-Hofer K., Schwendener R.A. // *Br. J. Cancer.* 2006. V. 95. P. 272–281.
21. Beyer I., Cao H., Persson J., Song H., Richter M., Feng Q., Yumul R., van Rensburg R., Li Z., Berenson R., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. P. 3340–3351.
22. Beyer I., van Rensburg R., Strauss R., Li Z., Wang H., Persson J., Yumul R., Feng Q., Song H., Bartek J., et al. // *Cancer Res.* 2011. V. 71. P. 7080–7090.