

УДК 615.277.3

# Бактериофаг MS2 – средство доставки для таргетной химиотерапии солидных опухолей

Е. Ф. Колесанова<sup>1\*</sup>, М. В. Мельникова<sup>1</sup>, Т. Н. Большакова<sup>2</sup>, Е. Ю. Рыбалкина<sup>3</sup>, И. Г. Сивов<sup>4</sup><sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8<sup>2</sup>Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18<sup>3</sup>НИИ канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23<sup>4</sup>ООО «Биотехнология», 119048, Москва, ул. Ефремова, 20

\*E-mail: ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru

Поступило в редакцию 29.01.2019

Принято к печати 28.03.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-98-101

**РЕФЕРАТ** Бактериофаг MS2 был использован для таргетной доставки индуктора апоптоза, Tl<sup>+</sup>, в ткань опухоли. Таргетная доставка обеспечивалась iRGD-пептидом, лигандом интегринов, локализуемых преимущественно на поверхности эндотелиоцитов новообразованной сосудистой сети в опухолевой ткани и некоторых опухолевых клетках. Синтезированный пептид конъюгировали с капсидными белками MS2. Ионы Tl<sup>+</sup> из TlNO<sub>3</sub> проникали внутрь частиц фага и прочно связывались с его РНК. Препараты MS2, модифицированного пептидом и наполненного Tl<sup>+</sup>, вызывали гибель культивируемых клеток двух типов рака молочной железы человека и некроз ксенографтов этих опухолей. Ни конъюгат бактериофага MS2 с пептидом без Tl<sup>+</sup>, ни заполненный Tl<sup>+</sup> фаг без пептида, ни он же с неконъюгированным пептидом в растворе не вызывали таких эффектов. Препарат не проявлял острой токсичности в терапевтической дозе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бактериофаг MS2, iRGD-пептид, ионы таллия (I), рак молочной железы, таргетная терапия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ED<sub>50</sub> – эффективная доза (effective dose), при которой эффект составляет 50% от максимально возможного; LD<sub>50</sub> – доза вещества, введение которой вызывает гибель 50% животных; SDS – sodium dodecyl sulphate (додецилсульфат натрия); БОЕ – бляшкообразующие единицы; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ДМАИ – диметиладипимидат; РМЖ – рак молочной железы.

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы усилия разработчиков противоопухолевых лекарств сконцентрированы на препаратах направленного действия на основе как новых, так и уже известных цитостатиков [1]. Наиболее эффективным способом доставки считается использование наноконтейнеров, модифицированных специфичными лигандами (липосом, мицелл, полимерных наночастиц, вирусоподобных частиц, вирусов), заполняемых лекарственными соединениями [2]. Однако применение инновационных средств доставки не решает проблему множественной лекар-

ственной устойчивости опухолей, способную свести на нет все усилия по повышению эффективности лекарственных соединений [3].

Показано, что ионы Tl<sup>+</sup> обладают мощным цитотоксическим действием и подавляют функционирование белковых насосов лекарственной устойчивости опухолевых клеток [4]. Включение Tl<sup>+</sup> в «не протекающий» наноразмерный контейнер, снабженный системой направленной доставки, позволит создать эффективное средство для разрушения опухолей при значительном снижении токсического воздействия Tl<sup>+</sup> на организм в целом. В 1980-х гг. удалось

наполнить  $Tl^+$  частицы вируса осповакцины [5]. Механизм наполнения заключался в образовании прочного соединения между  $Tl^+$  и вирусной РНК [6]. В качестве наноконтейнера нами был выбран бактериофаг MS2, способный размножаться только в клетках *Escherichia coli*, несущих F-пили и не являющихся симбионтами либо патогенами человека [7]. Направленность доставки обеспечивали конъюгацией капсидных белков фага с пептидом  $(Gly)_3$ -iRGD, содержащим фрагмент *cycloSS*-(CRGDKGPDC) (iRGD), ответственный за связывание с интегринами, локализованными преимущественно на внешних мембранах эндотелиоцитов вновь формируемой патологической сосудистой сети солидных опухолей и на ряде опухолевых клеток [8]. В нашей работе проведена экспериментальная проверка эффективности наполненного  $Tl^+$  фага MS2 с адресным пептидом в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение бактериофага MS2 описано в работе [9]. Количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл препарата фага определяли методом титрования в агаровых слоях.

Пептид  $(Gly)_3$ -iRGD получали методом автоматического твердофазного синтеза исходя из 9-флуоренил(метоксикарбонил)-аминокислот (ChemPerp, США) (синтезатор 433A, Applied Biosystems, метод FastMoc). Формирование S-S-мостика проводили путем окисления  $I_2$  [10]. Пептид очищали ВЭЖХ на обращенной фазе (колонка C18 Triart, 21 × 250 мм, 10.0 мкм, УМС, Швейцария, рабочая станция Agilent 1100, Agilent, США) в градиенте концентрации  $CH_3CN$  (BioSolve, Израиль) в воде в присутствии 0.1% уксусной кислоты. По данным аналитической ВЭЖХ на обращенной фазе (колонка C18 Triart, 2.1 × 50 мм, 2.0 мкм (УМС), рабочая станция Agilent 1200) с УФ- и масс-спектрометрической детекцией чистота препарата пептида не ниже 95%.

Конъюгацию пептида  $(Gly)_3$ -iRGD с капсидными белками фага MS2 проводили с использованием гомобифункционального реагента диметиладипимидата (ДМАИ, Sigma, США) в молярном соотношении белок фага : пептид: ДМАИ 1 : 20 : 80 по методике [11]. Бактериофаг отделяли от избытка реагентов осаждением 25% раствором полиэтиленгликоля 6000 («Диа-М», Россия) с 1 М NaCl. Осажденный бактериофаг суспендировали в деионизованной воде.

Заполнение бактериофага  $Tl^+$  проводили с использованием  $TlNO_3$  (Sigma-Aldrich, США). Бактериофаг MS2, конъюгированный с пептидом (iRGD-MS2), в количестве  $10^{11}$  БОЕ инкубировали в 3 мл 0.5 мкМ раствора  $TlNO_3$  (5 ч при 38°C) с последующим осаж-

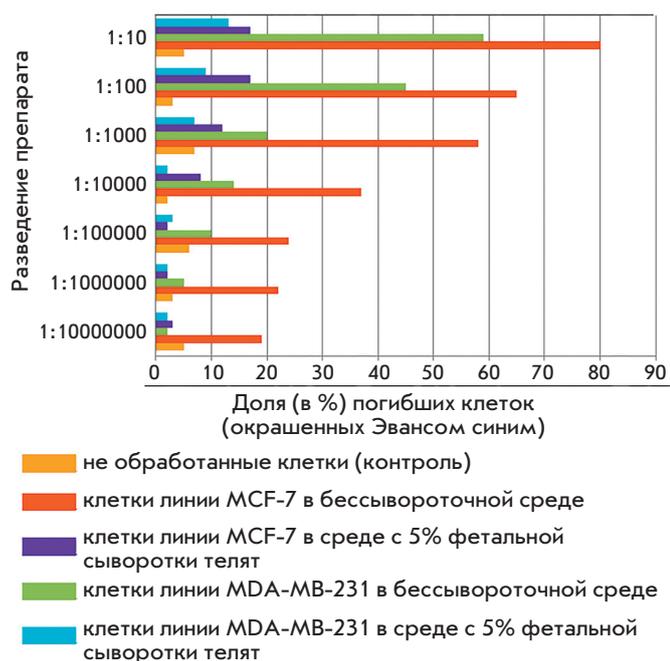
дением, как указано выше, и диализом против фосфатно-солевого буфера (0.14 М NaCl, 0.01 М фосфат натрия, pH 7.4).

Количество включенных в вирионы и присутствующих в среде  $Tl^+$  определяли согласно [12]. Суспензию наполненных  $Tl^+$  частиц фага центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин для удаления осадка солей таллия, разводили 50 мМ буфером трис-HCl, pH 9.0 до концентрации (условно)  $10^8$  БОЕ/мл, денатурировали нагреванием в течение 30 мин при +70°C с РНКазой в 0.05% SDS, затем регистрировали тушение флуоресценции (длины волн возбуждения – 340 нм, эмиссии – 465 нм, спектрофлуориметр UV-1900, Shimadzu, Япония) натриевой соли 1,3,6,8-пирентетрасульфоновой кислоты (BOC Sciences APP, США) ионами  $Tl^+$ . По калибровочной кривой зависимости степени тушения флуоресценции 1,3,6,8-пирентетрасульфоновой кислоты от  $[Tl^+]$  рассчитывали количество  $Tl^+$  в препарате фага. Количество  $Tl^+$  в буферном растворе после диализа определяли без предварительной денатурации.

Цитотоксическое действие iRGD-MS2- $Tl^+$  на клетках в культуре исследовали на линиях MCF-7 (гормонзависимый рак молочной железы (РМЖ)) и MDA-MB-231 (гормоннезависимый РМЖ). Клетки культивировали в бессывороточной среде (MSC1 Pan BioTech) и в той же среде с 5% фетальной сыворотки телят. Препарат iRGD-MS2- $Tl^+$  вносили в 10-кратных разведениях, начиная с концентрации  $10^8$  БОЕ/мл. В качестве контроля использовали препарат iRGD-MS2 (фаг, конъюгированный с пептидом, без  $Tl^+$ ). Погибшие клетки подсчитывали после окрашивания Эвансом синим.

Противоопухолевое действие препарата iRGD-MS2- $Tl^+$  тестировали на мышах nude с MCF-7- или MDA-MB-231-ксенографтами. Мышам внутривенно вводили  $10^5$ – $10^6$  клеток MCF-7 или MDA-MB-231, а через 14 дней мышам опытных групп в течение 10 дней 1 раз в день вводили внутривенно по 200 мкл суспензии, содержавшей iRGD-MS2- $Tl^+$  в количестве, соответствующем  $10^8$  БОЕ/кг, контрольным – iRGD-MS2, MS2- $Tl^+$  или MS2- $Tl^+$  + iRGD (в растворе, 2 мкг/кг) в таком же количестве и объеме раствора. В каждой опытной и контрольной группах было по 11 животных. Некротическую активность препарата определяли как отношение площади некротизированной ткани к общей площади опухоли через 12 дней после окончания введения препаратов фага по результатам анализа цифровых изображений гистологических срезов, сканированных на ScanScore CS2.

Предварительное исследование острой токсичности препарата iRGD-MS2- $Tl^+$  проводили на 10 крысах (самках) WKY (Wistar-Kyoto) весом 200–250 г. Крысы содержали в условиях 12-часового све-



**Рис. 1.** Результаты токсического действия препарата iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> на культуры опухолевых клеток (% гибели клеток)

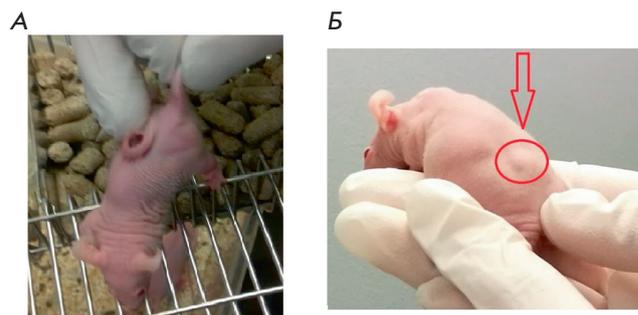
того дня на стандартном лабораторном корме и воде *ad libitum*. Однократно внутривенно вводили 10<sup>8</sup> БОЕ/животное в объеме 500 мкл. Регистрировали состояние животных в течение 3 недель с момента введения препарата.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, и правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) в РФ, утвержденных приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате инкубации бактериофага MS2 (как модифицированного, так и не модифицированного пептидом iRGD) в среде с TI<sub>NO<sub>3</sub></sub> получены препараты MS2, содержавшие TI<sup>+</sup> в количестве 2.0 × 10<sup>-9</sup> г-экв таллия в расчете на 10<sup>8</sup> БОЕ. Количество TI<sup>+</sup> на 1 БОЕ составило 2.0 × 10<sup>-17</sup> г-экв (≈4 фг на 1 БОЕ, т.е. 400 нг в 10<sup>8</sup> БОЕ). В буферном растворе, против которого диализовали наполненный таллием бактериофаг, TI<sup>+</sup> не обнаружен, что свидетельствует о его прочном связывании с РНК фага внутри частиц MS2.

Как видно из рис. 1, в бессывороточной среде препарат iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> проявлял цитотоксическое

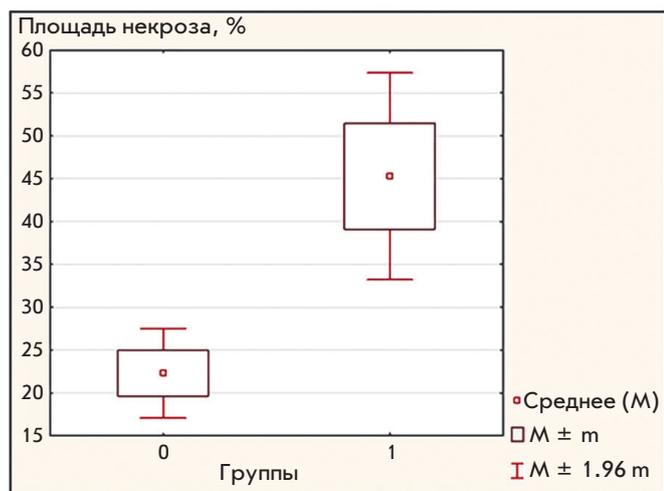


**Рис. 2.** Ксенографт опухоли MDA-MB-231 у мышей nude до (А) и после (Б) лечения препаратом iRGD-MS2-TI<sup>+</sup>

действие на клетки и гормонзависимого, и гормоннезависимого РМЖ. В случае гормонзависимого РМЖ (клетки MCF-7) ED<sub>50</sub> препарата iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> составляла чуть менее 10<sup>5</sup> БОЕ/мл культуральной жидкости, а статистически значимое превышение цитотоксического эффекта препарата по сравнению с контролем наблюдалось вплоть до концентрации 10 БОЕ/мл. Клетки гормоннезависимого РМЖ MDA-MB-231 были более устойчивыми к действию препарата: ED<sub>50</sub> для этих клеток в бессывороточной среде составляла 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> БОЕ/мл, а статистически значимое превышение цитотоксического эффекта препарата над контролем наблюдалось до концентрации 10<sup>4</sup> БОЕ/мл. В среде с сывороткой цитотоксическое действие iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> проявлялось намного слабее, что может свидетельствовать о конкуренции между компонентами сыворотки и частицами iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> за проникновение в клетки.

У мышей с ксенографтами MCF-7 и MDA-MB-231 через 12 дней после введения препарата iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> наблюдалось уменьшение объема опухоли по сравнению с контрольными группами животных (рис. 2). Гистохимически показано некротизирующее действие iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> на соответствующие опухоли. Из рис. 3 видно, что препарат iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> вызывал некроз ткани опухоли (*p* < 0.05) более эффективно, чем препараты фага с пептидом, но без TI<sup>+</sup>, фага с TI<sup>+</sup>, но без пептида, фага с TI<sup>+</sup> и с неконъюгированным пептидом в растворе.

Исследование острой токсичности препарата iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> на крысах WKY (Wistar-Kyoto) показало, что однократное введение препарата iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> в дозе 10<sup>8</sup> БОЕ/животное, т.е. 1.6-2.0 мкг TI/кг, не привело к гибели ни одного животного за 3 недели наблюдения. Не выявлено заметных изменений в поведении животных. Суммарная



**Рис. 3.** Площадь некротизированной ткани опухолей у мышей с ксенографтами РМЖ. Группа «1» – опытные животные, получавшие препарат iRGD-MS2-TI<sup>+</sup>; группа «0» – контрольные животные, получавшие препараты iRGD-MS2, MS2-TI<sup>+</sup> или MS2-TI<sup>+</sup> с неконъюгированным (растворенным) iRGD-пептидом

доза TI<sup>+</sup>, обеспечивающая достижение терапевтического эффекта (4 мкг/кг), была меньше его LD<sub>50</sub> (20 мг/кг) в 5000 раз.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Направленная доставка токсичного иона металла с помощью фагового дисплея на основе частиц iRGD-

MS2-TI<sup>+</sup> в сосудистую сеть опухолевой ткани вызывает эффективный распад всей массы опухоли при значительном снижении вероятности токсического воздействия на организм в целом. Это позволяет рекомендовать iRGD-MS2-TI<sup>+</sup> к доклиническим исследованиям с целью создания лечебного препарата для терапии рака молочной железы. Поскольку пептидный лиганд iRGD взаимодействует с интегринами α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> и α<sub>v</sub>β<sub>5</sub> на поверхности эндотелиоцитов патологической сосудистой сети [8], этот препарат может быть эффективен и в отношении других солидных опухолей, в которых идет интенсивный патологический неангиогенез. ●

*Работа частично поддержана финансированием от ООО «Биотехнология». Разработка методик синтеза пептида (Gly)<sub>3</sub>-iRGD и его конъюгации с бактериофагом MS2 выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы. Синтез пептида выполнен на оборудовании ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ). Эксперименты на животных проводили в НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова Минздрава РФ. Авторы благодарят А.А. Чистова (ИБМХ, ИБХ) за проведение анализа iRGD-пептида.*

*Материалы статьи отражены в Патенте РФ № 2599462 «Способ полисигнальной активации апоптоза клеток злокачественных солидных опухолей», заявка в Патентное ведомство США (№ 15/757,285 от 02.03.2018) и Европейское патентное ведомство (PCT – WO 2017052419).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee M.S., Dees E.C., Wang A.Z. // Oncology (Williston Park). 2017. V. 31. № 3. P. 198–208.
- Fan Y., Moon J.J. // Vaccines. 2015. V. 3. № 3. P. 662–685.
- Ставровская А.А., Стромская Т.П. // Биохимия. 2008. Т. 73. № 5. С. 735–750.
- Korotkov S.M., Brailovskaya I.V., Kormilitsyn B.N., Furaev V.V. // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2014. V. 28. № 4. P. 149–156.
- Zasukhina G.D., Vasilyeva I.M., Sdirkova N.I., Krasovsky G.N., Vasyukovich L.Ya., Kenesariyev U.I., Butenko P.G. // Mutat. Res. 1983. V. 124. № 2. P. 163–173.
- Ke A., Ding F., Batchelor J.D., Doudna J.A. // Structure. 2007. V. 15. № 1. P. 281–287.
- Leclerc H., Edberg S., Pierzo V., Delattre J.M. // J. Appl. Microbiol. 2000. V. 88. № 1. P. 5–21.
- Ruoslahti E. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2017. V. 110–111. P. 3–12.
- Княжев В.А., Сивов И.Г., Сергиенко В.И. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2002. Т. 20. № 2. С. 23–26.
- Andreu D., Albericio F., Sole N.A., Munson M.C., Ferrer M., Barany G. // Methods Mol. Biol. 1994. V. 35. P. 91–169.
- Synthetic peptides as antigens. / Eds van Regenmortel M.H.V., Muller S. Elsevier, 1999.
- Donnelly D., Mihovilovic M., Gonzalez-Ros J.M., Ferragut J.A., Richman D., Martinez-Carrion M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 24. P. 7999–8003.