

*На правах рукописи*

Годованный Артем Витальевич

**Использование С-концевого домена альфа-фетопротеина для адресной  
доставки противоопухолевых препаратов**

03.01.03 – Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва 2012 г.

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук и во Всероссийском научном центре молекулярной диагностики и лечения.**

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор,  
чл.-корр. РАН  
Гнучев Николай Васильевич

доктор химических наук, профессор,  
чл.-корр. РАН  
Северин Евгений Сергеевич

**Официальные оппоненты:** Соболев Александр Сергеевич, доктор  
биологических наук, профессор, ИБГ РАН,  
заведующий лабораторией

Прасолов Владимир Сергеевич, доктор  
биологических наук, профессор, ИМБ РАН,  
заведующий лабораторией

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биоорганической  
химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита диссертации состоится \_\_\_ марта 2012 года в 11 часов на заседании  
Диссертационного совета Д 002.037.01 при ИБГ РАН по адресу: 119334,  
г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной  
биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991,  
г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан \_\_\_ февраля 2012 года

**Ученый секретарь Диссертационного совета  
канд. фарм. наук**

Грабовская Л.С.

**Актуальность проблемы.** Злокачественные новообразования занимают третье место в структуре смертности от болезней в развитых странах. Высокая токсичность противоопухолевых препаратов является серьезным препятствием на пути развития химиотерапии злокачественных новообразований. Одним из подходов к решению данной проблемы является адресная доставка препаратов в опухолевые клетки. Для реализации стратегии адресной доставки противоопухолевый препарат должен быть связан с векторной молекулой, избирательно взаимодействующей с опухолевыми клетками, и не взаимодействующей с клетками здоровых тканей.

В качестве векторных молекул могут выступать лиганды рецепторов, специфических для опухолевых клеток. Одним из таких рецепторов является рецептор онкофетального белка альфа-фетопротейна, экспрессирующийся клетками многих видов злокачественных опухолей, и отсутствующий на поверхности клеток здоровых тканей. Ранее было показано, что альфа-фетопротейн (АФП), а также его С-концевой фрагмент, эффективно взаимодействуют с опухолевыми клетками и не взаимодействуют со здоровыми клетками организма. Природный АФП человека был использован для создания противоопухолевых препаратов направленного действия, обладавших высокой противоопухолевой активностью.

Предложенные в настоящее время биотехнологические методы получения полноразмерной молекулы АФП в прокариотических системах экспрессии отличаются недостаточно высоким выходом. Основной причиной является низкая эффективность ренатурации полноразмерного АФП, экспрессируемого в составе бактериальных телец включения. Для прохождения ренатурации молекулы АФП необходимо правильное образование 16 дисульфидных связей. Для фолдинга С-концевого фрагмента АФП (рАФПЗд) необходимо формирование 6 дисульфидных связей. Мы предположили, что ренатурация рАФПЗд (с 404 по 609 аминокислотный остаток) будет более эффективной. Данное предположение, а также способность рАФПЗд взаимодействовать с рецептором, явились предпосылками для исследования возможности его использования в качестве векторного белка.

При создании систем адресной доставки препаратов векторная молекула может быть связана как непосредственно с молекулой препарата, так и с макромолекулярным носителем, нагруженным большим количеством молекул препарата. В последнем случае повышается количество молекул препарата, транспортируемых одной векторной молекулой, что является неоспоримым преимуществом систем адресной доставки такого типа. В настоящее время все большее развитие в качестве полимерных носителей препаратов приобретают наночастицы (НЧ) на основе биodeградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA). Присоединение к НЧ (с включенными в их структуру цитостатиками) векторных белков приводит к увеличению противоопухолевой активности этих цитостатиков *in vitro* и *in vivo*.

**Целью** данной работы являлось исследование возможности использования третьего домена АФП человека в качестве векторного белка для создания систем избирательной доставки противоопухолевых препаратов, в том

числе направленной доставки полимерных НЧ, нагруженных указанными препаратами.

В соответствии с целью исследования были сформулированы следующие задачи:

1. получение штамма-продуцента и оптимизация метода выделения рАФПЗд;
2. оценка биологической активности рАФПЗд;
3. получение конъюгата рАФПЗд с цисплатином и исследование его токсичности *in vitro*;
4. получение полимерных НЧ на основе PLGA с включенным паклитакселом или доцетакселом, а также флуоресцентно-меченых НЧ, с присоединенным рАФПЗд, и оценка эффективности и специфичности их взаимодействия с опухолевыми клетками;
5. оценка противоопухолевой активности адресных НЧ, нагруженных паклитакселом и доцетакселом, *in vitro*.

#### **Научная новизна и практическая значимость работы.**

В ходе данной работы было обнаружено, что ренатурация рАФПЗд происходит с высокой эффективностью. Предложенный метод очистки рАФПЗд может быть использован для промышленного биотехнологического производства белка, поскольку использование ионообменной хроматографии на конечных стадиях очистки белка экономически выгоднее, чем использование предложенной в предыдущих методах металло-хелатной хроматографии.

Впервые получены противоопухолевые препараты направленного действия с использованием рАФПЗд в качестве векторного белка. Получен конъюгат векторного белка с цисплатином, обладающий высокой цитотоксической активностью для клеток опухоли и значительно менее токсичный для лимфоцитов *in vitro*. Конъюгат рАФПЗд с цисплатином является активным противоопухолевым препаратом и исследование его противоопухолевой активности *in vivo* является важной задачей.

Получен конъюгат рАФПЗд с полимерными PLGA-НЧ с включенными противоопухолевыми цитостатиками паклитакселом (НЧ-ПАК-рАФПЗд) и доцетакселом (НЧ-ДОЦ-рАФПЗд). Продемонстрирована высокая цитотоксическая активность адресных НЧ для опухолевых клеток *in vitro*, а в случае НЧ-ДОЦ-рАФПЗд – заметная противоопухолевая активность *in vivo*, по сравнению с НЧ-ДОЦ. Таким образом, рАФПЗд можно успешно использовать для повышения эффективности доставки противоопухолевых препаратов с помощью полимерных наночастиц.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы были доложены на Первой международной научной школе «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах» (Ступино, июнь-июль 2009), на Третьем всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов биологов «Симбиоз-Россия 2010» (Нижний Новгород, май 2010), на Школе-конференции молодых ученых «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2010» (Москва, сентябрь 2010), на Второй международной школе «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина» (Ступино, сентябрь 2011), на Четвертом международном

конгрессе по молекулярной медицине (Стамбул, июнь, 2011), на Шестой международной конференции «Биология: от молекулы до биосферы» (г. Харьков, ноябрь, 2011).

Апробация работы состоялась на межлабораторном семинаре лаборатории молекулярной иммуногенетики рака Института биологии гена РАН 20 октября 2011 г.

**Публикации.** По теме диссертации сделано 10 публикаций, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, оформлена одна заявка на выдачу патента РФ на изобретение.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, содержащий ссылки на 149 источников. Диссертация иллюстрирована 41 рисунками, содержит 9 таблиц.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

### 1.1. Выделение и очистка рАФПЗд.

Использованная в данной работе экспрессионная плаزمида была предоставлена заведующим лабораторией Генных технологий ВНИИМДЛ д.б.н. Федоровым А.Н. Экспрессионная плазмида представляет собой последовательность нуклеотидов, кодирующую С-концевой фрагмент АФП Пе 404 – Val 609, клонированную в составе экспрессионного вектора для *E. coli* – рЕТ11с (Novagen). Подробнее получение экспрессионной плазмиды описано ранее.

В результате трансформации клеток штамма *E. coli* В121 (DE3) экспрессионным вектором и оптимизации условий экспрессии, был получен штамм-продуцент с выходом белка 60-70 мг с 1 литра культуры. Рекомбинантный белок преимущественно содержался в тельцах включения. Масса полученного в результате многостадийной отмывки нерастворимого осадка телец включения составила 19% от общей биомассы штамма продуцента. Содержание целевого белка, оцененное с помощью электрофореза в 12% ПААГ, составляло порядка 85-90% от общей белковой фракции телец включения. Полученный осадок солиubilizировали в 6 М растворе хлорида гуанидина с добавлением 2-меркаптоэтанола. Раствор телец включения очищали от примесей липидной природы с помощью гель-фильтрации на Sephadex G-25, при этом производилась замена буфера на 8 М раствор мочевины, содержащий гидрохлорид цистеамина.

Рефолдинг белка производили методом разбавления. Выход рефолдинга (отношение количества ренатурированного белка к количеству денатурированного) составил 72%. Для окончательной очистки и концентрирования после рефолдинга раствор рАФПЗд наносили на колонку с анионообменным сорбентом (Q-sepharose Fast Flow), элюировали в градиенте NaCl (0→500 мМ), диализовали против фосфатно-солевого буферного

раствора, pH 7,4. Белок хранили в концентрации 2 мг/мл с добавлением 10%-го глицерина при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Выход по массе рАФПЗд составил 24 мг/л культуры. Основные потери белка происходили при отмывке телец включения (30%), в результате гель-фильтрации (4%), рефолдинге (18,8%), концентрировании с использованием Q-sepharose (5%). Чистота белка составила более 95%.

Таким образом, удалось значительно (в 4,8 раз) увеличить выход рАФПЗд по сравнению с методом очистки, предложенным ранее [Posypanova et al., 2008].

На рисунке 1 представлены результаты электрофореза образцов, отобранных на различных стадиях очистки рекомбинантного С-концевого домена АФП.

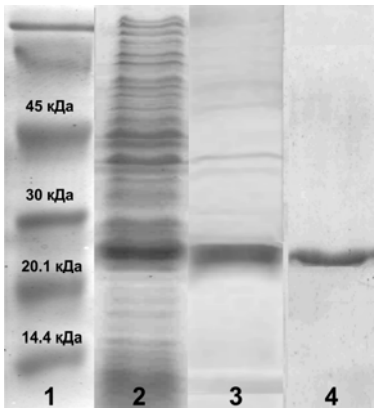


Рис. 1. Результаты электрофоретического анализа образцов, отобранных на различных стадиях очистки С-концевого домена АФП. Дорожки: 1 – маркеры молекулярных масс (Amersham), 2 – лизат биомассы, 3 – раствор солюбилизованных телец включения, 4 – раствор белка, прошедшего все стадии очистки.

По данным электрофоретического анализа молекулярная масса выделенного белка составила приблизительно 22,5 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе рекомбинантного белка. Гомогенность рАФПЗд была подтверждена с помощью ОФ-ВЭЖХ. Результаты анализа представлены на рис. 2.

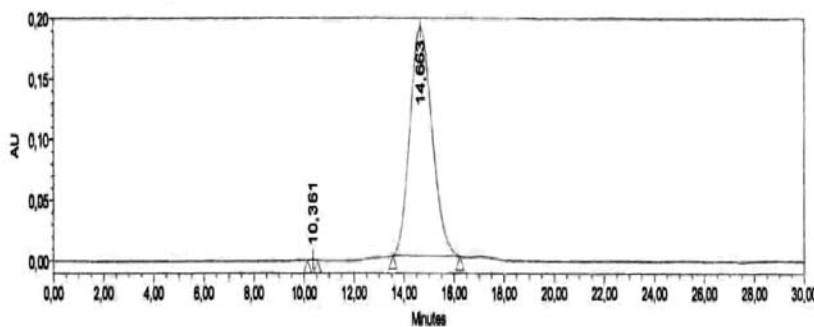


Рис. 2. Результаты анализа рАФПЗд с помощью ОФ-ВЭЖХ (колонка С18, детекция при 280 нм, пик со временем выхода 14,7 мин соответствует рАФПЗд).

С помощью электрофореза в ПААГ в невозстанавливающих условиях (в отсутствие 2-меркаптоэтанола) показано отсутствие олигомерных молекул, стабилизированных межмолекулярными дисульфидными связями.

Масс-спектрометрический анализ рАФПЗд методом MALDI-TOF (рис. 3) показал, что молекулярная масса выделенного белка составляет 22 480 Да. Полученное значение полностью совпадает с расчетным значением и с результатами электрофоретического исследования.

Титрование аминокрупп рАФПЗд с помощью орто-фталевого диальдегида, показало наличие четырех доступных для модификации аминокрупп на одну молекулу белка.

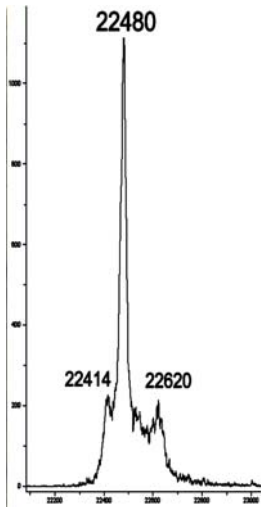


Рис. 3. Результат масс-спектрометрического исследования рАФПЗд с помощью MALDI-TOF. Пик 22480 Да соответствует рАФПЗд.

В выделенном белке методом титрования с помощью реактива Элмана не было обнаружено свободных сульфгидрильных групп, что свидетельствует о полном образовании всех 6-ти дисульфидных связей.

### **1.2. Анализ взаимодействия рАФПЗд с рецептором АФП in vitro.**

Для эффективного применения рАФПЗд в системах направленной доставки необходимо сохранение у выделенного белка способности связываться со специфическими рецепторами АФП на поверхности опухолевых клеток и подвергаться рецептор-опосредованному эндоцитозу. При этом связывание белка с клетками нормальных тканей организма, не несущих рецепторы АФП, должно отсутствовать.

В экспериментах использовали клетки аденокарциномы яичника человека линии SKOV3 и клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, характеризующиеся высоким уровнем экспрессии рецепторов АФП (440 тыс. и 300 тыс. сайтов связывания на одну клетку, соответственно). В качестве модели нормальных клеток организма использовали лимфоциты периферической крови человека. рАФПЗд конъюгировали с изотиоцианатом флуоресцеина и изучали взаимодействие меченого белка с клетками с помощью проточной цитофлуориметрии. Исследование эффективности связывания белка с клетками проводили при +4°C, связывания и эндоцитоза при +37°C, определяя уровень ассоциированной с клетками флуоресценции.

Из представленных на рис. 4 результатов видно, что выделенный описанным выше методом рАФПЗд эффективно и избирательно взаимодействует с опухолевыми клетками, экспрессирующими рецептор АФП. При этом связывание с лимфоцитами, не имеющими рецепторов АФП, отсутствует. Эти данные подтверждают аналогичные результаты, полученные ранее для более крупного рекомбинантного фрагмента АФП человека (357-590 а.к.), и полноразмерной молекулы АФП человека.

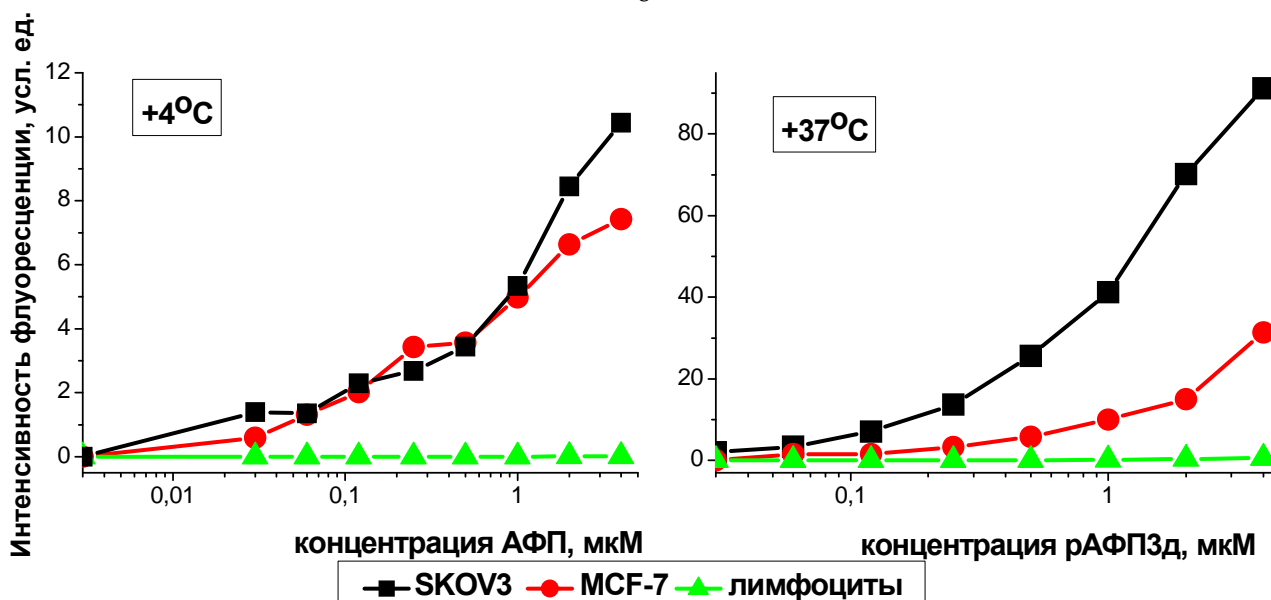


Рис. 4. Связывание (+4°C) и связывание+эндоцитоз (+37°C) флуоресцентно меченного рекомбинантного С-концевого домена альфа-фетопротейна человека клетками аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3, аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 и лимфоцитами периферической крови человека.

Для оценки прочности взаимодействия рАФПЗд с рецептором АФП были определены величины констант диссоциации комплекса белок/рецептор по методу Скэтчарда [147]. На рисунке 21.1 представлены кривые связывания выделенного рАФПЗд с опухолевыми клетками в координатах Скэтчарда.

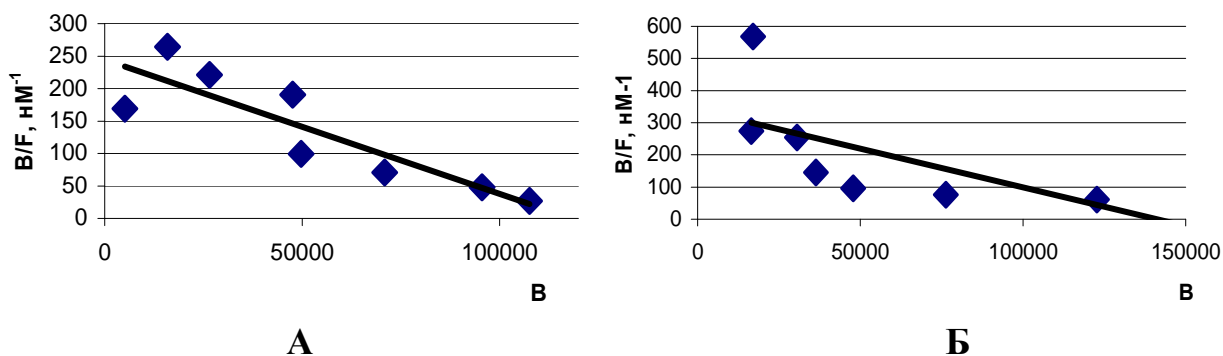


Рис. 4.1. Зависимость эффективности связывания рАФПЗд с опухолевыми клетками от концентрации рАФПЗд в координатах Скэтчарда. А – клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, Б – клетки аденокарциномы яичников человека линии SKOV3.

Рассчитанные значения Кд рАФПЗд/рецептор и значения Кд АФП/рецептор, определенные ранее, представлены в таблице 1 [121].



Таблица 1. Значения Кд рАФПЗд/рецептор и значения Кд АФП/рецептор для клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 и аденокарциномы яичников человека линии SKOV3.

Линия клеток	MCF-7	SKOV3
Значение Кд, М		
АФП/рецептор	$30.0 \times 10^{-7}$	$6.4 \times 10^{-7}$
рАФПЗд/рецептор	$4.8 \times 10^{-7}$	$4.2 \times 10^{-7}$

Сравнивая значения Кд можно сделать вывод, что рАФПЗд образует более прочный комплекс с рецептором АФП на поверхности опухолевых клеток линии MCF-7, чем альфа-фетопротеин.

### ***1.2.1. Исследование специфичности связывания рАФПЗд с рецептором АФП.***

Для исследования специфичности связывания опухолевые клетки инкубировали в буфере с избытком рАФПЗд в течение 1 часа при +4°C, после чего клетки отмывали и инкубировали с меченым белком. Предварительная инкубация клеток с избытком рАФПЗд (блокировка рецептора) приводила к снижению уровня связывания рАФПЗд с поверхностью опухолевых клеток на 62%. Снижение уровня связывания свидетельствует в пользу специфического характера взаимодействия выделенного рАФПЗд с опухолевыми клетками.

### **2.1. Синтез конъюгата рАФПЗд с цис-дихлордиаминплатиной (цисплатином).**

В качестве противоопухолевого препарата для создания системы направленного транспорта на основе рАФПЗд был выбран цитостатик алкилирующего действия цисплатин. Схема получения конъюгата представлена на рис. 5.

На первой стадии синтеза рАФПЗд модифицировали с помощью N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионата (SPDP). Этот реагент, содержащий активированную сложноэфирную группу, позволяет при взаимодействии с первичными аминогруппами белка вводить защищенную тиольную группу. Соотношение остатков 3-(2-дитиопиридил)пропионата к рАФПЗд составило 3,6 к 1. На каждой стадии очистка продукта реакции (модифицированного белка) осуществлялась с помощью гель-фильтрации на Sephadex G-25.

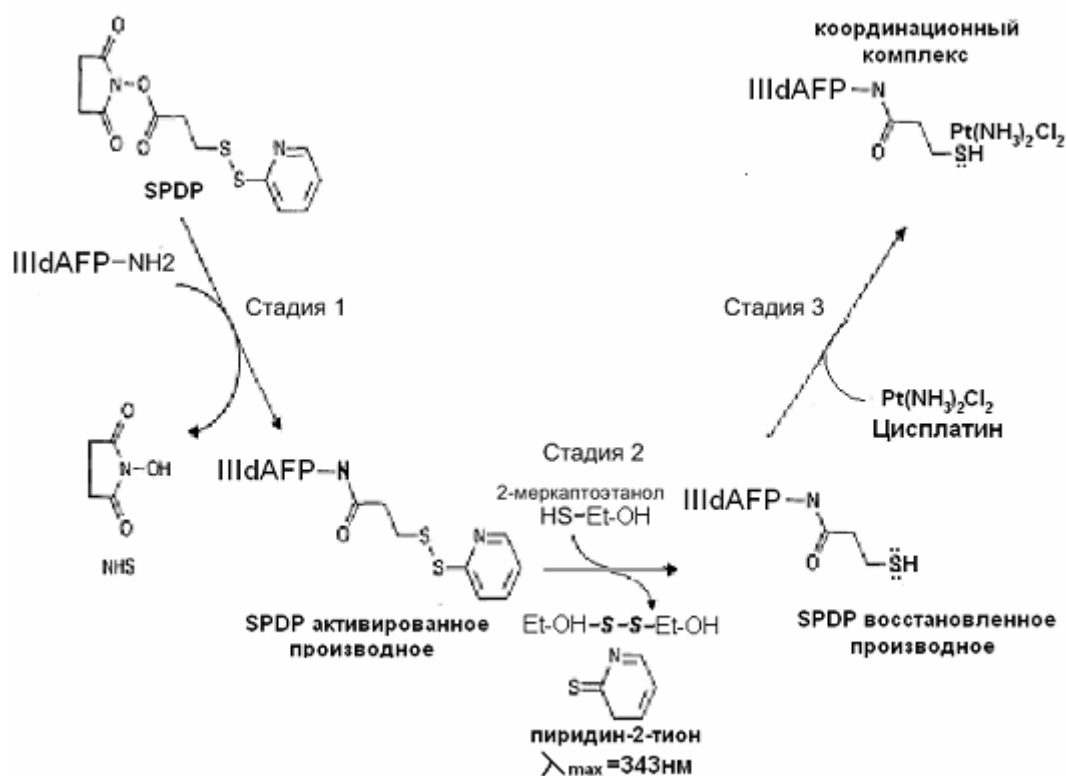


Рис. 5. Схема синтеза конъюгата цисплатина с С-концевым доменом альфа-фетопротеина с использованием в качестве сшивающего реагента N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионата (SPDP).

На второй стадии в результате восстановления остатков 3-(2-дितिопиридил)пропионата при взаимодействии с 2-меркаптоэтанолом образуется свободная сульфгидрильная группа. В процессе восстановления выделяется пиридин-2-тион, обладающий характерным поглощением при 343 нм. Полное прохождение реакции наблюдается уже через 10 минут после ее начала, о чем можно судить по профилю увеличения оптической плотности раствора при 343 нм.

После восстановления модифицированный рАФПЗд отделяли от низкомолекулярных компонентов реакции с помощью гель-фильтрации. Фракцию белка, выходящую в свободном объеме колонки, собирали непосредственно в раствор, содержащий 10-кратный молярный избыток цисплатина (стадия 3).

Измерение содержания платины в полученном конъюгате производили с помощью атомно-адсорбционной спектрометрии. Соотношение платина/рАФПЗд в полученном конъюгате составило 1,3/1.

## **2.2. Исследование цитотоксической активности конъюгата рАФПЗд с цисплатином.**

Исследования цитотоксической активности конъюгата рАФПЗд с цисдихлордиаминоплатиной *in vitro*, производилось в сравнении с цисплатином-субстанцией. Для исследования использовали клетки линии SKOV3 и лимфоциты периферической крови человека. Клетки инкубировали в среде с препаратами в течение 72 ч. Количество выживших клеток определяли по

сравнению с необработанным контролем с помощью МТТ-теста. Результаты эксперимента представлены на рис. 6.

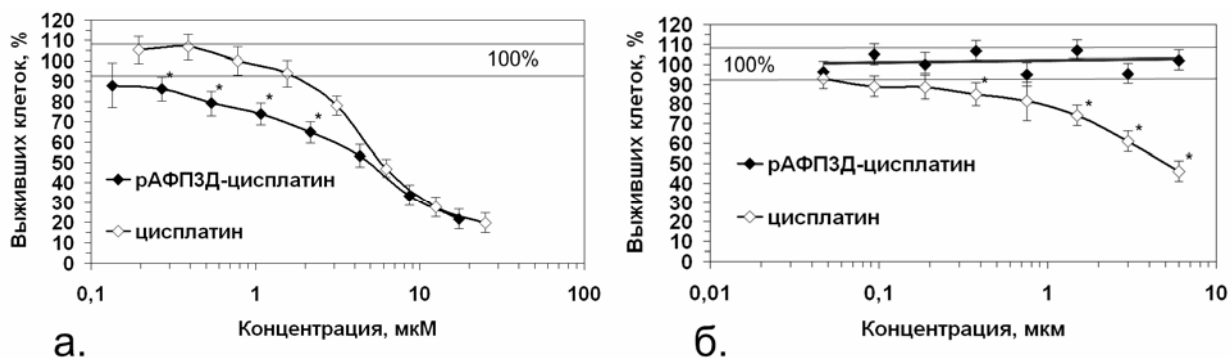


Рис. 6. Выживаемость клеток аденокарциномы яичника человека линии SKOV3 (а.) и лимфоцитов периферической крови человека (б.) после 72 ч инкубации с конъюгатом рАФПЗд с цисплатином и свободным цисплатином; \*  $p < 0,05$ .

Результаты типичного эксперимента показали, что полученный конъюгат обладает выраженной цитотоксичностью для опухолевых клеток. В то же время, конъюгат не проявил цитотоксичности по отношению к лимфоцитам в выбранном диапазоне концентраций. Значения  $IC_{50}$  для препаратов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Цитотоксичность конъюгата цисплатина с рекомбинантным С-концевым фрагментом альфа-фетопротейна, оцениваемая по значению  $IC_{50}$  - концентрации препарата, при которой наблюдается гибель 50 % клеток

	Цисплатин	АФПЗД-цисплатин
Клетки аденокарциномы яичников	$IC_{50} = 5,8 \mu M$	$IC_{50} = 4,9 \mu M$
Лимфоциты периферической крови	$IC_{50} = 5 \mu M$	-*

\* При обработке препаратом в максимальной концентрации 6  $\mu M$  ингибирования роста клеток не наблюдалось.

Полученные данные согласуются с результатами исследований цитотоксичности конъюгатов на основе полноразмерного природного АФП человека описанных ранее.

Одним из ограничений к применению цисплатина в схемах химиотерапии является его сильное негативное влияние на систему кроветворения, выражающееся в снижении количества всех форменных элементов крови. Поэтому снижение токсичности конъюгата для лимфоцитов периферической крови имеет важное практическое значение.

### **3.1. Получение полимерных наночастиц с включенным паклитакселом и доцетакселом.**

Для получения систем направленного транспорта противоопухолевых препаратов с использованием макромолекулярных носителей был разработан

метод получения полимерных наночастиц с включением паклитаксела и доцетаксела. Для получения НЧ использовали сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) – нетоксичный биodeградируемый полимер, давно зарекомендовавший себя в медицинской практике.

Паклитаксел (ПАК) и доцетаксел (ДОЦ) представляют собой противоопухолевые препараты, токсическое действие которых связано с ингибированием деполимеризации тубулина. Оба препарата являются гидрофобными, поэтому для их включения в состав НЧ был выбран распространенный метод простого эмульгирования, применяемый для включения гидрофобных препаратов. Основные этапы данного метода представлены на рис. 7.

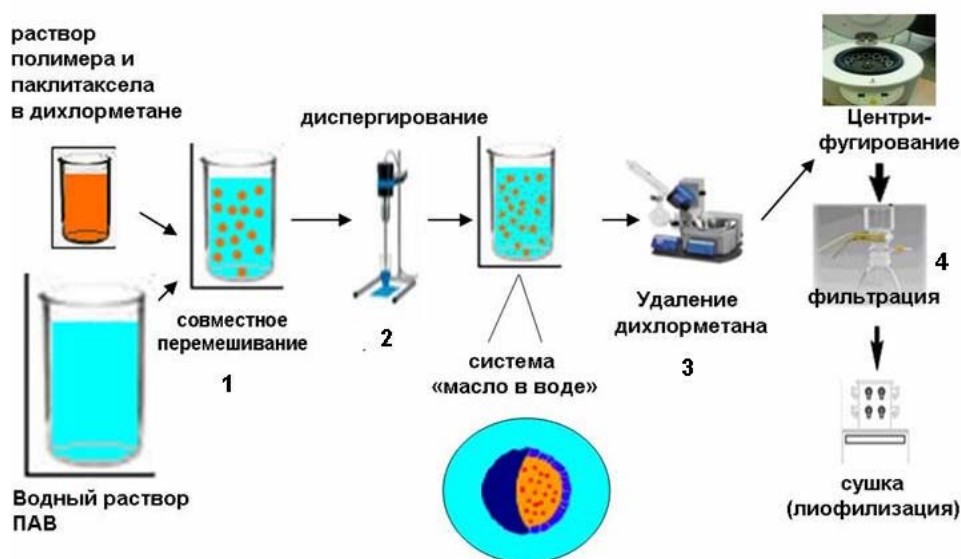


Рис. 7. Схема получения полимерных НЧ методом простого эмульгирования. На стадии 1 раствор полимера и включаемого вещества в хлористом метиле при перемешивании добавляли к водному раствору поверхностно-активного вещества (ПАВ). На стадии 2 полученную крупнодисперсную эмульсию каплей органической фазы, стабилизированную поверхностно-активным веществом диспергировали, в результате чего образовывалась мелкодисперсная эмульсия (т.н. система «масло-вода»). На стадии 3 из раствора выпаривали органический растворитель, и из каплей органической фазы получались НЧ. На стадии 4 НЧ собирали центрифугированием, фильтровали от агломератов и лиофилизовали.

При оптимизации метода получения НЧ с включенными ПАК и ДОЦ пользовались двумя основными критериями отбора. *Во-первых*, для эффективного рецептор-опосредованного эндоцитоза диаметр получаемых НЧ должен быть около 75 нм. Однако есть сообщения об эффективном эндоцитозе связанных с вектором НЧ с диаметром порядка 220 нм. *Во-вторых*, эффективность включения ПАК и ДОЦ должна быть максимальной (под эффективностью включения препарата подразумевается отношение количества включенного в состав НЧ препарата к изначально взятому количеству препарата). Гидродинамический радиус НЧ измеряли методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС). Наилучшие параметры были получены при использовании PLGA 50/50, поливинилового спирта (ПВС) в качестве ПАВ и ультразвукового дезинтегратора для диспергирования эмульсии. Средний

гидродинамический диаметр полученных в результате разработанного метода НЧ составил  $216 \pm 62$  нм, с эффективностью включения ПАК 62%, и  $211 \pm 65$  нм с эффективностью включения ДОЦ 74%. При получении данных образцов использовали концентрацию полимера 20 мг/мл, соотношение водной и органической фаз составило 5/1, диспергирование проводили при мощности 65 Ватт.

### **3.2. Разработка метода связывания наночастиц с рАФПЗд.**

В ходе данного исследования применили три различных подхода к связыванию рАФПЗд с поверхностью НЧ. Используемые подходы можно разделить на две группы: ковалентное связывание с поверхностью НЧ и нековалентная адсорбция белка на поверхности НЧ.

#### ***3.2.1. Нековалентная адсорбция векторного белка на поверхности наночастиц.***

Было использовано два различных метода, приводящих к адсорбции рАФПЗд на поверхности НЧ.

Адсорбция белка в процессе получения НЧ. При данном подходе, рАФПЗд был использован как стабилизатор эмульсии в процессе получения НЧ. Для этого раствор полимера в хлористом метиле добавляли к водному раствору БСА и рАФПЗд, взятых в массовом соотношении 9/1 с концентрацией 10 мг/мл. После завершения всех стадий получения НЧ векторный белок оказывался адсорбированным на их поверхности. Количество белка, адсорбированного на поверхности, составляло приблизительно 6-7% от массы НЧ. Гидродинамический диаметр таких частиц составил 450 нм.

Адсорбция белка после получения НЧ. При таком подходе НЧ инкубировали с раствором белка в течение 24 часов при 4°C, затем отделяли центрифугированием. Количество адсорбированного таким методом белка составляло приблизительно 0,5% по массе. Диаметр частиц составил 211 нм.

#### ***3.2.2. Ковалентное связывание белка с поверхностью НЧ.***

Получение наночастиц со свободными карбоксильными группами. Получаемые описанным выше методом НЧ не имеют на своей поверхности функциональных групп, удобных для модификации. Поэтому, для введения карбоксильных групп поливиниловый спирт (ПВС), используемый как стабилизатор эмульсии в процессе получения НЧ, был модифицирован по гидроксильным группам янтарным ангидридом. Схема реакции представлена на рис. 9.

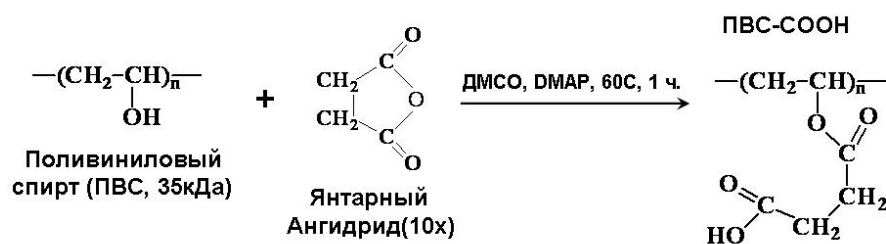


Рис. 9. Схема модификации поливинилового спирта ангидридом янтарной кислоты.

Введение в состав молекулы остатка янтарной кислоты было доказано по наличию сигналов его метиленовых протонов в области 2,5-2,7 ppm на  $^1\text{H}$  ЯМР-спектре. При получении НЧ образуется прочный комплекс полимера с модифицированным ПВС. Есть свидетельства в пользу того, что такой комплекс стабилен и не разрушается после серии повторяющихся отмывок.

#### Получение НЧ, конъюгированных с рАФПЗд (рАФПЗд-НЧ).

Конъюгирование карбоксильных групп полученных частиц с аминокетонами рАФПЗд производили с помощью водорастворимого 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида. Активация карбоксильных групп на поверхности НЧ производилась при значении рН 4.5, так как при таком значении рН раствора взаимодействие с карбодиимидом происходит наиболее активно. После стадии активации к раствору НЧ добавляли 2-меркаптоэтанол. 2-меркаптоэтанол образует стабильный комплекс с избытком не вступившего в реакцию карбодиимида, тем самым препятствуя прохождению возможных побочных реакций. Далее раствор НЧ с активированными карбоксильными группами добавляли к раствору белка при рН 8.2. Образование амидной связи наилучшим образом происходит при основных значениях рН, поскольку в таких условиях аминокетон находится в реакционноспособном депротонированном состоянии. рАФПЗд-НЧ отделяли центрифугированием.

Количество связанного белка составляло примерно 1,5% от массы НЧ. Увеличения размера НЧ в результате конъюгирования с рАФПЗд обнаружено не было.

### **3.3. Исследование связывания и эндоцитоза флуоресцентно-меченных наночастиц, конъюгированных с рАФПЗд.**

#### ***3.3.1. Получение НЧ с введенной флуоресцентной меткой.***

Для исследования эндоцитоза НЧ на основе PLGA был разработан метод введения в их состав флуоресцентной метки. В качестве флуоресцентной метки использовали противоопухолевый антибиотик доксорубин – флуорофор, обладающий мощной флуоресценцией в красной области. Для получения флуоресцирующих НЧ PLGA, содержащий концевую свободную карбоксильную группу конъюгировали с аминокетонной доксорубина с применением дициклогексилкарбодиимида. Из синтезированного конъюгата полимера с доксорубином с применением описанного выше метода были получены НЧ, с ковалентно присоединенной флуоресцентной меткой (НЧ-Ф).

#### ***3.3.2. Исследование специфичности и уровня связывания наночастиц с рецептором АФП на поверхности клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7.***

В качестве основного критерия, по которому оценивалась успешность использованных методов получения НЧ-рАФПЗд, была выбрана специфичность их взаимодействия с опухолевыми клетками, экспрессирующими рецептор АФП. Взаимодействие считалось специфичным в случае, если блокировка рецептора АФП приводила к снижению уровня связывания флуоресцирующих НЧ с поверхностью клеток.

Блокировка рецептора осуществлялась путем предварительной инкубации клеток с избытком рАФПЗд. Исследование уровня связывания и

эндоцитоза флуоресцентно меченных НЧ проводили на линии клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

Связывание НЧ-Ф изучали при +4°C. Уровень ассоциированной с клетками флуоресценции определяли с помощью проточного цитофлуориметра. Полученные результаты представлены на рис. 10. Из представленных результатов видно, что специфический характер носило только связывание НЧ с ковалентно присоединенным рАФПЗд, так как в результате блокировки рецептора уровень связывания достоверно снижался на 30%. Снижения уровня связывания НЧ с нековалентно присоединенным векторным белком обнаружено не было, что говорит об отсутствии специфического взаимодействия.

Далее в экспериментах использовали только меченые НЧ, ковалентно связанные с векторным белком (рАФПЗд-НЧ-Ф).

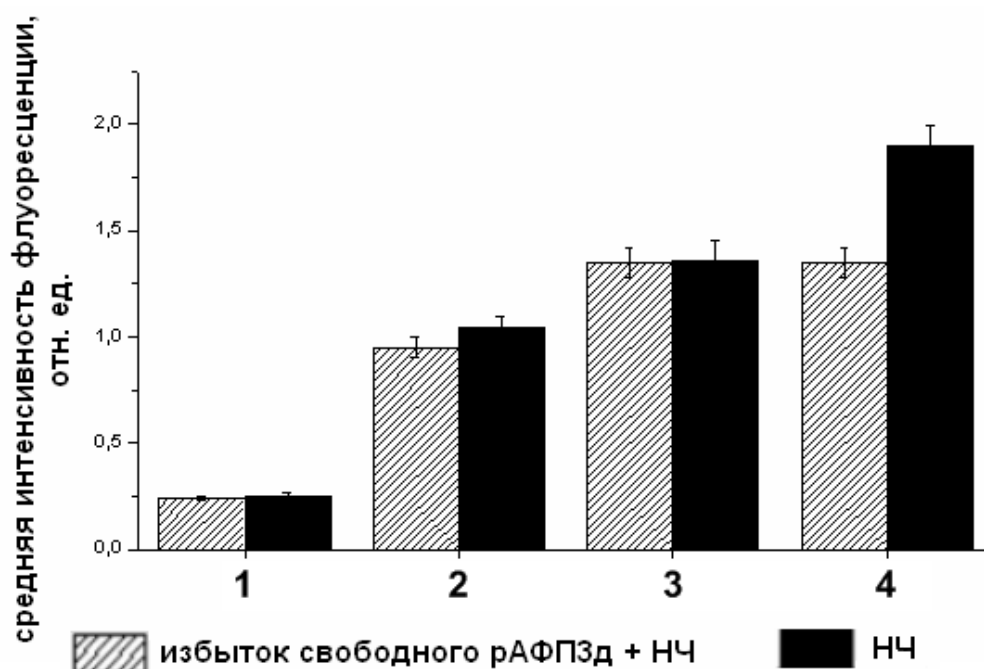


Рис. 10. Исследование уровня и специфичности связывания комплекса и конъюгата НЧ с рАФПЗд, оцениваемое по интенсивности флуоресценции клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 после 1 ч инкубации при +4°C. 1 – НЧ без векторного белка, 2 – НЧ с адсорбированным рАФПЗд в процессе получения НЧ, 3 – НЧ с адсорбированным рАФПЗд после получения, 4 – НЧ, ковалентно связанные с рАФПЗд.

### 3.3.3. Исследование связывания и эндоцитоза наночастиц, конъюгированных с рАФПЗд, клетками аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7.

Инкубации опухолевых клеток с рАФПЗд-НЧ-Ф при 37°C в течение 2 часов приводила к повышению интенсивности флуоресценции клеток в 1.5-2 раза по сравнению с инкубацией 4°C. Следует отметить, что, для НЧ-Ф без вектора, увеличения интенсивности флуоресценции при 37°C не наблюдалось (рис. 11).

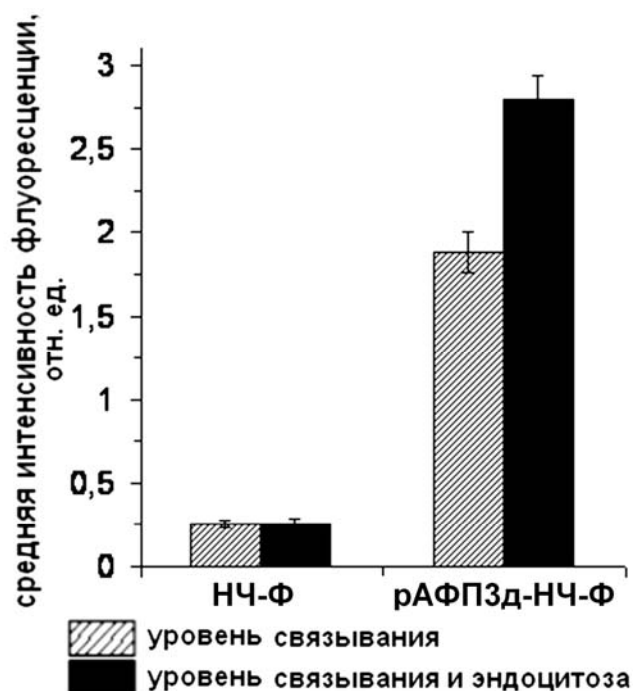


Рис. 11. Исследование уровня связывания и связывания/эндоцитоза НЧ-Ф и рАФПЗд-НЧ-Ф клетками аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7.

### 3.4. Исследование цитотоксической активности наночастиц, конъюгированных с рАФПЗд, с включенным паклитакселом и доцетакселом.

#### *3.4.1. Исследование цитотоксической активности рАФПЗд-НЧ с включенным паклитакселом (НЧ-ПАК-рАФПЗд) и доцетакселом (НЧ-ДОЦ-рАФПЗд), для опухолевых клеток.*

Для исследования цитотоксической активности НЧ с включенным ПАК (НЧ-ПАК) использовали клетки линии MCF-7 и резистентной к антрациклиновым антибиотикам сублинии MCF-7<sup>Adr</sup>. Клетки инкубировали с препаратами в течение 2 часов, после чего отмывали от препаратов и далее культивировали 72 ч в среде без препаратов. Было показано, что цитотоксическая активность НЧ-ПАК-рАФПЗд, оцененная по показателю IC<sub>50</sub>, была в 25 раз выше активности свободного ПАК и примерно в 3 раза выше активности НЧ-ПАК (рис. 12). Следует отметить, что пустые НЧ без ПАК не обладали токсичностью (данные не приведены) и, следовательно, эффект НЧ реализуется за счет действия химиопрепарата, включенного в состав НЧ.

Увеличение цитотоксической активности НЧ с вектором, по-видимому, является прямым следствием повышения уровня эндоцитоза рАФПЗд-НЧ по сравнению с НЧ без вектора. НЧ без вектора проникают в клетки по механизму макропиноцитоза, свободный ПАК – посредством пассивной диффузии. Согласно литературным данным в случае макропиноцитоза значительная фракция НЧ (около 75%) попадает в рециклирующие эндосомы и подвергается экзоцитозу. В случае же НЧ с вектором, большая часть НЧ попадает во вторичные эндосомы и экзоцитозу не подвергается.



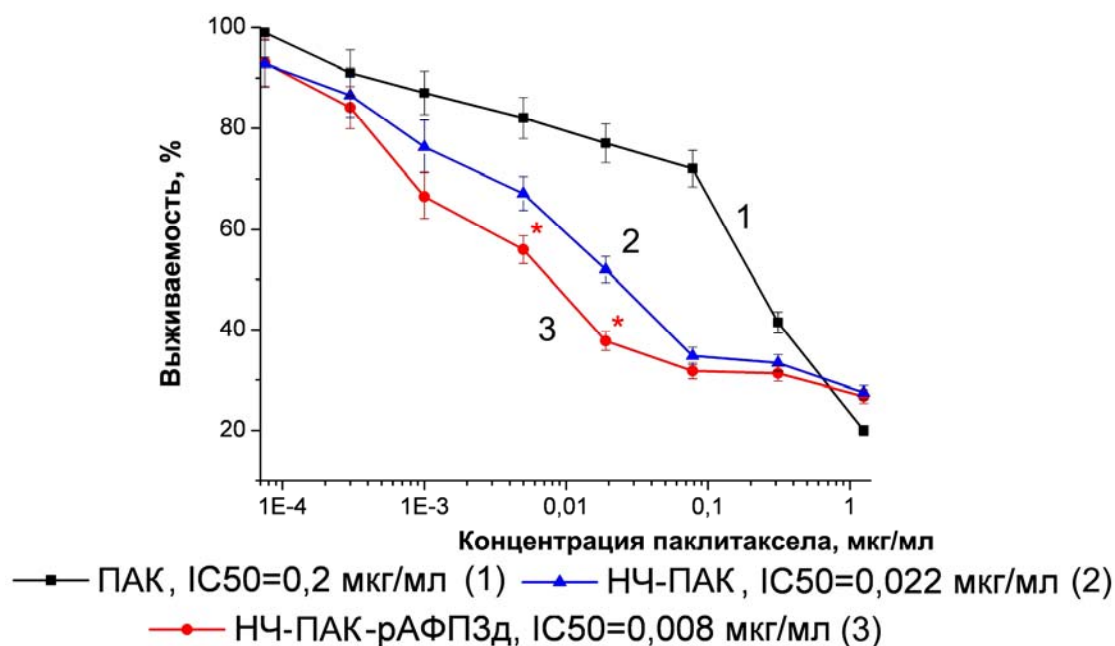


Рис. 12. Цитотоксическая активность ПАК в свободной форме и в составе НЧ в отношении опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы человека линий MCF-7;

\* - различия достоверны,  $p < 0,01$ .

При исследовании противоопухолевой активности НЧ для клеток резистентной сублинии MCF-7<sup>Adr</sup> было выявлено, что наиболее высокой активностью обладал препарат НЧ-ПАК-рАФП3д (рисунок 13). Значение IC<sub>50</sub> для НЧ-ПАК-рАФП3д в 2,5 раза превышало IC<sub>50</sub> для НЧ-ПАК и в 7 раз IC<sub>50</sub> для ПАК.

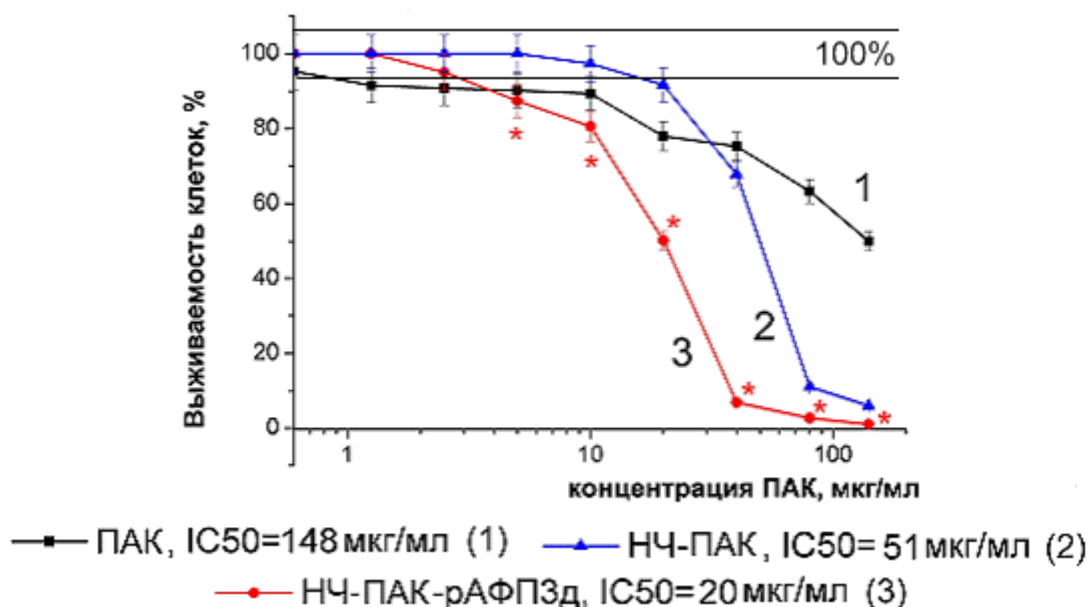


Рис. 13. Цитотоксическая активность ПАК в свободной форме и в составе НЧ в отношении опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы человека линий MCF-7<sup>Adr</sup>, устойчивой к антибиотикам антрациклинового ряда;

\* - различия достоверны,  $p < 0,05$  (для концентраций 5 и 10 мкг/мл различия достоверны для препаратов НЧ-паклитаксел и НЧ-паклитаксел-рАФП3д).

Важно отметить, что включение ПАК в НЧ позволяет преодолеть резистентность опухолевых клеток, обусловленную функционированием pgr170, локализованного в плазматической мембране клеток MCF-7<sup>Adr</sup>. Причем присоединение белкового вектора к НЧ значительно увеличивает эффективность этого процесса.

Таким образом, показано, что НЧ-ПАК-рАФП3д обладают высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток MCF-7 и MCF-7<sup>Adr</sup>.

Цитотоксическую активность НЧ с включенным ДОЦ (НЧ-ДОЦ) исследовали в отношении клеток лейкоза мыши линии P388 (рис. 14).

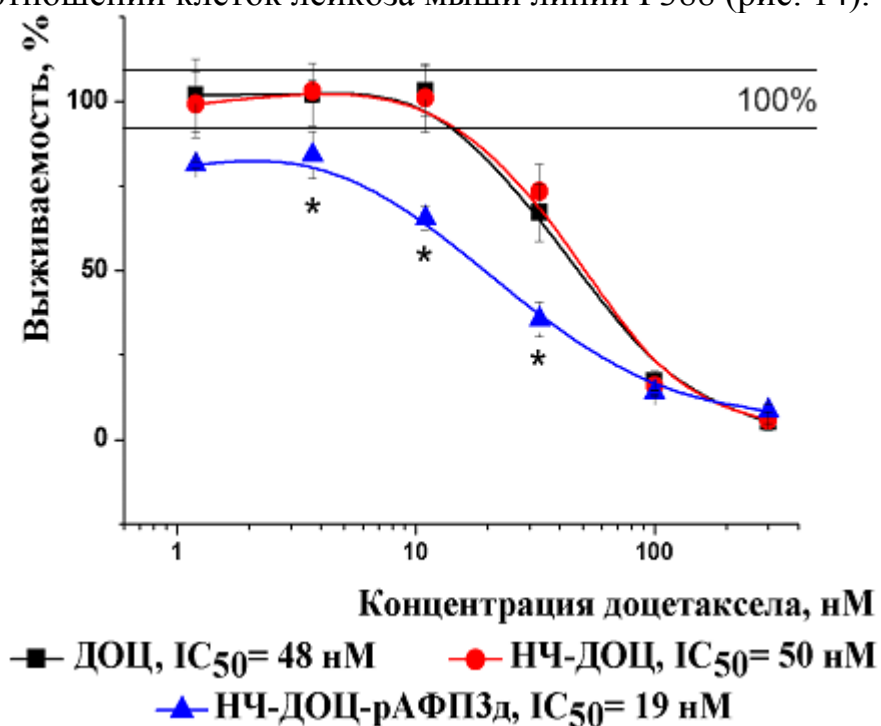


Рис. 14. Цитотоксическая активность ДОЦ в свободной форме и в составе НЧ в отношении клеток лейкоза мыши линии P388; \* p < 0,01.

Было показано, что цитотоксическая активность НЧ-ДОЦ-рАФП3д после 96 ч инкубации с клетками в 2,5 раза превышала активность ДОЦ и НЧ-ДОЦ (рис. 15). При этом активность НЧ-ДОЦ не отличалась от активности свободного препарата. Представленные данные свидетельствуют об эффективности использования НЧ с рАФП3д в качестве векторной молекулы.

### 3.4.2. Исследование накопления и токсичности НЧ-ПАК-рАФП3д для лимфоцитов.

Для исследования эффективности накопления и цитотоксической активности НЧ использовали покоящиеся лимфоциты периферической крови, в которых отсутствует экспрессия рецепторов АФП. Высокая токсичность для лимфоцитов является основным ограничением к применению паклитаксела и доцетаксела. Показано, что уровень накопления меченых рАФП3д-НЧ-Ф в лимфоцитах не отличался от уровня накопления НЧ-Ф (табл. 3).

Таблица 3. Сравнение уровня накопления НЧ-Ф в опухолевых клетках аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 и лимфоцитах периферической крови человека, оцениваемое по интенсивности флуоресценции клеток после 1 ч инкубации при 37°C.

	Средняя интенсивность флуоресценции, отн.ед.	
	MCF-7	Лимфоциты
НЧ-Докс	$0.25 \pm 0.02$	<b>0.004</b>
НЧ-Докс-рАФПЗд	$2.8 \pm 0.14$	<b>0.005</b>

Цитотоксическая активность НЧ-ПАК-рАФПЗд в отношении нормальных лимфоцитов была низкой и практически не отличалась от активности свободного паклитаксела (рис. 15).

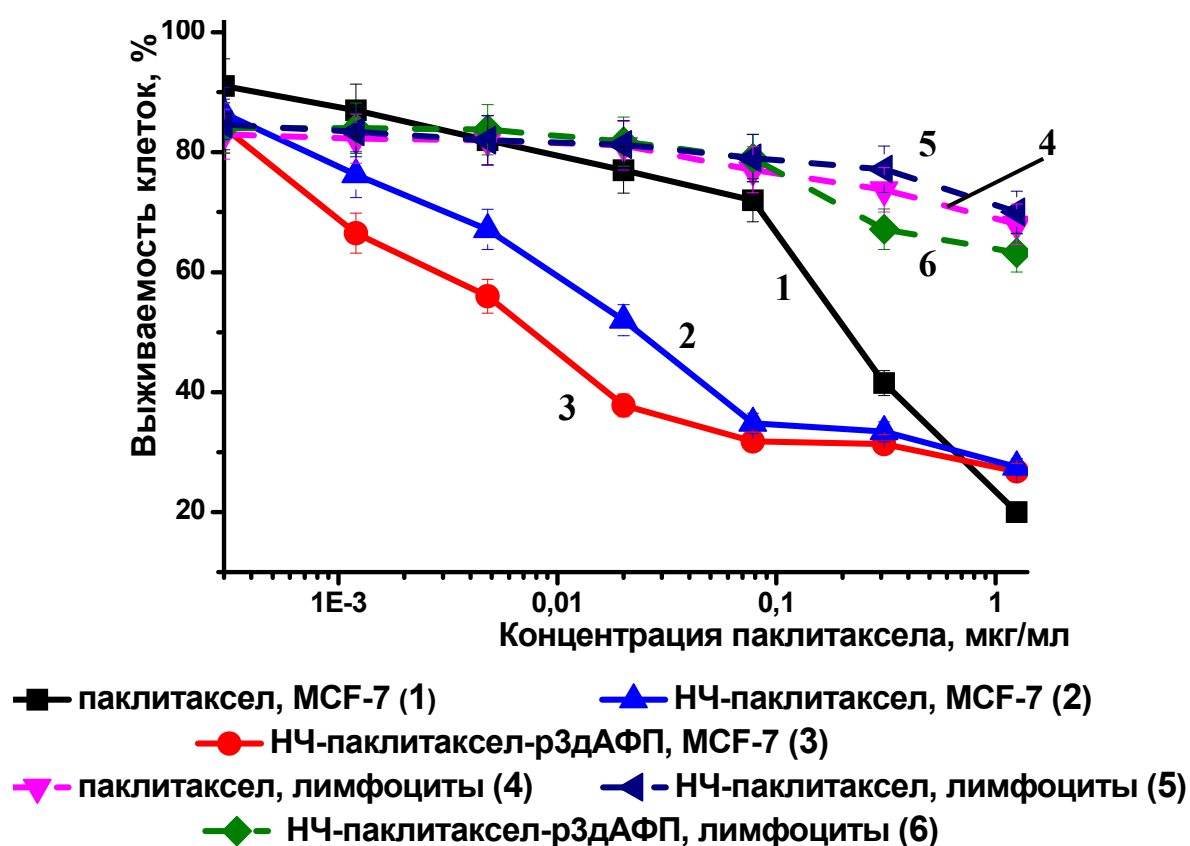


Рис. 15. Сравнение цитотоксической активности свободного ПАК и ПАК в составе НЧ для клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7 и лимфоцитов периферической крови человека.

Представленные результаты свидетельствуют в пользу того, что НЧ-ПАК-рАФПЗд проявляют более выраженный токсический эффект, по сравнению со свободным препаратом, только в отношении опухолевых клеток, но не лимфоцитов. Таким образом, можно сделать вывод об избирательности действия НЧ с ковалентно-присоединенным рАФПЗд.

### Выводы.

1. Получен штамм-продуцент E.Coli BL21(DE3) С-концевого домена АФП (рАФПЗд) и оптимизирован метод выделения и очистки рАФПЗд.
2. Показано, что меченный рАФПЗд специфически связывается с клетками аденокарциномы яичника человека линии SKOV3 и аденокарциномы молочной железы человека линии MCF-7, но не взаимодействует с лимфоцитами периферической крови человека *in vitro*.
3. Разработан способ получения конъюгата рАФПЗд с цисплатином и продемонстрирована выраженная цитотоксичность конъюгата для клеток SKOV3 и отсутствие токсичности для лимфоцитов периферической крови человека *in vitro*.
4. Получены адресные наночастицы на основе PLGA с ковалентно присоединенным рАФПЗд, с включенными паклитакселом и доцетакселом; продемонстрирована способность адресных НЧ к более эффективному связыванию с опухолевыми клетками по сравнению с НЧ без векторного белка.
5. Ковалентное присоединение рАФПЗд к НЧ, содержащим паклитаксел и доцетаксел, приводит к значительному повышению цитотоксической активности цитостатиков для клеток лейкоза мыши линии P388, аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, а также для клеток резистентной сублинии MCF-7<sup>Adr</sup>. При этом токсичность НЧ-ПАК-рАФПЗд для лимфоцитов периферической крови человека не превышает токсичность НЧ-ПАК.

### Список опубликованных работ по теме диссертации.

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК:

1. Годованный А.В., Саватеева М.В., Сотниченко А.И., Яббаров Н.С., Климова О.В., Гнучев Н.В., Северин С.Е. Изучение противоопухолевой активности *in vitro* конъюгата рекомбинантного С-концевого домена АФП с цисплатином. // Молекулярная медицина, 2011, № 1, С. 44-48.
2. Годованный А.В., Воронцов Е.А., Гукасова Н.В., Позднякова Н.В., Василенко Е.А., Яббаров Н.Г., Дубовик Е.Г., Северин С.Е., Северин Е.С., Гнучев Н.В. Разработка подхода избирательной доставки паклитаксела в составе наночастиц, связанных с рекомбинантным фрагментом альфа-фетопротеина человека, в опухолевые клетки. // Доклады Академии Наук, 2011, том 439, № 2, с. 260–262.
3. Годованный А.В., Воронцов Е.А., Гукасова Н.В., Позднякова Н.В., Василенко Е.А., Яббаров Н.Г., Северин С.Е., Северин Е.С., Гнучев Н.В. Противоопухолевая активность наносомальных систем направленной доставки, приготовленных на основе PLGA-наночастиц, паклитаксела и рекомбинантного фрагмента альфа-фетопротеина *in vitro*. // Российские нанотехнологии, 2012, том 7, № 1-2, с. 57-63.

## Тезисы конференций:

- 1) Годованный А.В., Сотниченко А.С., Саватеева М.В., Гнучев Н.В. Использование рекомбинантного III домена альфа-фетопротейна человека для адресной доставки противоопухолевых препаратов. Материалы 1-ой Международной Научной Школы «Наноматериалы и Нанотехнологии в живых системах», с. 192, Моск. обл. (2009).
- 2) Годованный А.В., Гукасова Н.В., Данилевский М.В., Климова О.В., Рябцева М.С. Использование наноразмерных лекарственных форм для увеличения биологической активности препаратов, пролонгации их действия и преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Стендовый доклад. III Международный конкурс научных работ молодых ученых. III Международный форум по нанотехнологиям, Москва. Компакт-диск с материалами. (2010).
- 3) Годованный А.В., Воронцов Е.А., Гнучев Н.В. Исследование токсичности *in vitro* субмикронных частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с включением паклитаксела. Устный доклад. Материалы III Всероссийского конгресса биологов "Симбиоз-Россия 2010", с. 27.
- 4) Годованный А.В., Данилевский М.А., Гнучев Н.В. Исследование токсичности *in vitro* субмикронных частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с включением паклитаксела. Устный доклад. Материалы конференции Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины-2010, с. 45.
- 5) Годованный А.В., Гукасова Н.В. Разработка метода связывания наночастиц на основе PLGA с рекомбинантным C-концевым доменом альфа-фетопротейна. Устный доклад. Материалы 2-ой Международной школы «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина», с. 203, Моск. обл. (2011).
- 6) Gukasova N., Godovanniy A., Moskaleva E. et al. Targeted delivery of anticancer drugs using rhAFPfr-linked PLGA-nanoparticles by receptor-mediated endocytosis. Abstracts of the 4th International Congress of Molecular Medicine, Istanbul (2011), p. 102.
- 7) Дубовик Е.Г., Годованный А.В., Василенко Е.А. Создание полимерных наночастиц, конъюгированных с фрагментом альфа-фетопротейна, для направленной доставки доксорубина. Материалы Шестой Международной конференции «Биология: от молекулы до биосферы», Харьков (2011), с. 138-139.