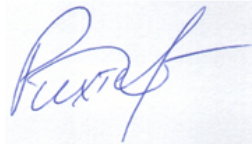


На правах рукописи



Рихтер Владимир Александрович

ЛАКТАПТИН – ОНКТОКСИЧЕСКИЙ ПЕПТИД МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация в виде научного доклада
на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный консультант:

Власов Валентин Викторович, д.х.н., профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, научный руководитель института

Официальные оппоненты:

Зенкова Марина Аркадьевна, д.б.н., профессор, член-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующий лабораторией

Деев Сергей Михайлович, д.б.н., профессор, академик РАН, Государственный научный центр Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, главный научный сотрудник

Мясоедов Николай Фёдорович, д.х.н., профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», заведующий отделом

Защита состоится « 01 » марта 2024 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ 03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: г. Новосибирск, 630090, пр.-кт акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Диссертация в форме научного доклада разослана « » _____ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

к.х.н.



_____ Пестряков П.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Онкологические заболевания являются одной из главных причин смертности взрослого населения и на протяжении последних десятилетий занимают второе место после сердечно-сосудистых заболеваний. Проблема профилактики и терапии онкологических заболеваний является одной из наиболее актуальных биомедицинских проблем во всем мире. Несмотря на внушительный арсенал противоопухолевых препаратов и прогресс в развитии новых методов терапии продолжительность жизни пациентов увеличивается не столь значительно.

Среди всех нозологий рак молочной железы (РМЖ) является ведущей онкопатологией женского населения России. В 2021 году доля этой нозологии составляла 22,1% от всех злокачественных новообразований у женщин. В структуре смертности женщин от злокачественных новообразований РМЖ также занимает первое место (15,8%), при этом уровень 5-летней выживаемости россиянок с РМЖ весьма низок и составляет 58,5%.

Ряд исследовательских институтов и крупных фармацевтических компаний в России и за рубежом ведут поиск потенциальных противоопухолевых агентов, в том числе препаратов против РМЖ.

В настоящее время крайне мало белковых и пептидных противоопухолевых препаратов нашли применение в практическом здравоохранении. Исключение составляют препараты на основе моноклональных антител, которые представляют собой специфический тип лекарственных средств, действующих таргетно на отдельные виды опухолей. Несмотря на значительный прогресс в терапии злокачественных новообразований с введением в клиническую практику этих таргетных препаратов, кардинально ситуация в статистике онкозаболеваний не изменилась.

Таким образом, разработка новых противоопухолевых препаратов и подходов для терапии РМЖ и подавления метастазирования по-прежнему являются актуальными и важнейшими задачами биомедицины и фармацевтики.

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы являлась разработка противоопухолевого препарата на основе цитотоксического пептида человеческого молока.

В ходе исследования решались следующие **задачи**:

1. Выделение и характеристика цитотоксического пептида из человеческого молока;
2. Получение рекомбинантных аналогов этого пептида и выбор наиболее перспективного прототипа для разработки лекарственного препарата;
3. Установление первичной и вторичной структуры выбранного пептида;
4. Изучение цитотоксической активности выбранного пептида в отношении онкотрансформированных клеток животных и человека различного гистогенеза, а также здоровых (немалигнизированных) клеток молочной железы и мезенхимальных стволовых клеток человека *in vitro*;

5. Изучение противоопухолевого и антиметастатического потенциала пептида на моделях гепатокарциномы A1 мыши и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB 231 *in vivo*;
6. Изучение механизма цитотоксического действия пептида в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7;
7. Разработка лекарственного препарата на основе цитотоксического пептида и проведение его доклинических исследований;
8. Разработка подходов для повышения противоопухолевой эффективности лекарственного препарата.

Научная новизна и практическая ценность работы

В результате выполнения работы в молоке человека впервые был обнаружен полипептид, индуцирующий апоптотическую гибель онкотрансформированных клеток млекопитающих. Учитывая происхождение и проапоптотические свойства пептида, авторы назвали его **лактаптином**. На основе природного пептида был получен ряд его рекомбинантных аналогов, один из которых - RL2 по совокупности свойств был выбран для дальнейших исследований. Изучение механизма цитотоксического действия RL2 привело к новым представлениям о возможных путях инициации и развития апоптотических процессов в клетке. На основе RL2 был разработан противоопухолевый лекарственный препарат «Лактаптин» и проведены его доклинические исследования. По результатам исследований препарат был признан безопасным и фармакологически эффективным и рекомендован к клиническим исследованиям.

Некоторые аналоги лактаптина в настоящее время используются в ряде российских и зарубежных лабораторий как модельные молекулы при изучении механизмов клеточной гибели.

Проапоптотический потенциал RL2 был реализован при создании противоопухолевых препаратов нового поколения. Лекарственный препарат, разработанный на основе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact вируса осповакцины, несущего ген RL2 в своём геноме, является первым в России противоопухолевым вирусным препаратом, получившим разрешение Министерства здравоохранения РФ на проведение клинических испытаний. В настоящее время успешно проходит первая фаза клинических исследований VV-GMCSF-Lact в качестве лекарства для терапии рака молочной железы.

Положения, выносимые на защиту

1. Из молока человека выделен пептид с молекулярной массой 8606.5 ± 0.5 Да, индуцирующий апоптоз онкотрансформированных клеток животных и человека. Установлено, что пептид является фрагментом каппа-казеина с 57 по 134 аминокислотный остаток. Учитывая происхождение пептида и его способность индуцировать апоптоз, пептид был назван **лактаптином**.
2. Сконструировано 7 генно-инженерных аналогов лактаптина. Для дальнейших исследований и разработки лекарственного препарата выбран

аналог RL2 - пептид, наиболее близкий к природному лактаптину по своим цитотоксическим свойствам.

3. RL2 является нестрогим упорядоченным пептидом, способным образовывать α -спираль в районах с 9 по 12 и/или с 35 по 42 аминокислотный остаток.

4. RL2 обладает свойствами CPP и проникает в клетку как по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, так и прямым проникновением через плазматическую мембрану.

5. При проникновении в клетку RL2 связывается с белками цитоскелета α и/или β тубулином и α -актинином-1.

6. RL2 индуцирует апоптоз опухолевых клеток как по рецептор-опосредованному, так и по митохондриальному пути. При этом регистрируются следующие признаки апоптотического процесса: транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны, диссипация трансмембранного потенциала митохондрий, активация инициаторных каспаз-8 и -9 и эффекторной каспазы-7, олигонуклеосомная фрагментация ДНК.

7. Предложена модель индукции апоптотической гибели клеток MCF-7 под действием RL2.

8. RL2 подавляет жизнеспособность клеток злокачественных и доброкачественных опухолей и практически не оказывает влияния на жизнеспособность и пролиферацию нетрансформированных клеток молочной железы человека *in vitro*.

9. RL2 эффективно тормозит развитие опухолей и метастазов *in vivo*.

10. На основе RL2 разработан лекарственный препарат «Лактаптин» и проведены его доклинические исследования. Доказана противоопухолевая эффективность препарата и его безопасность при однократном и многократном внутривенном введении животным.

11. Предложен подход для увеличения противоопухолевой эффективности RL2 на основе рекомбинантных слитых белков RL2-опухоль-адресующий пептид.

Публикации и апробация работы

Основные научные результаты отражены в 22 научных статьях и 9 российских и евразийских патентах. Результаты работы были представлены в виде докладов автора на российских и международных конференциях: V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011 г.); Международной конференции «Постгеномные технологии для биомедицины» (Новосибирск, 2012 г.); VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Уфа, 2013 г.); VII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013 г.); 3rd Biotechnology World Congress, Dubai, UAE, 2014); XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2015); VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск,

2015 г.); Global Engage's Biologics Congress (Berlin, Germany, 2016); VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва, 18–22 сентября 2017 г.); Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017), Международной конференции «Постгеном 2018» (Казань, 2018), Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), Международном конгрессе FEBS и YSF FEBS «Molecules of life: Toward new horizons» (онлайн-конференция, 2021).

Личный вклад автора

Представленные в работе данные получены либо лично автором, либо при его непосредственном участии. По отдельным частям работы под научным руководством автора были защищены четыре диссертации на соискание ученой степени кандидата наук (Кулигина Е.В., Фомин А.С., Немудрая А.А. и Чинак О.А.) и одна диссертация на соискание ученой степени доктора наук (Коваль О.А.).

В основном экспериментальная работа выполнялась в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН. Огромный и неоценимый вклад в работу внесли сотрудники лаборатории Кит Ю.Я., Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Аронов П.А., Потапенко М.О., Романова И.В., Нскипелая В.В., Фомин А.С., Немудрая А.А., Нуштаева А.А., Чинак О.А.

Масспектрометрический анализ лактапина был выполнен Егоровым Ц.А. и Мусалымовым А.Х. (ИБХ РАН, г. Москва). Работы по конструированию генно-инженерных аналогов проводились с участием Тикуновой Н.В., Бабиной И.Н. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) и Рошке В.В. (Cogenesis, USA). Спектры кругового дихроизма были получены Ломзовым А.А. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск), ЯМР спектры были получены к.х.н., с.н.с. Шернюковым А.В. и м.н.с. Овчеренко С.С. (ИОХ СО РАН, Новосибирск). Эксперименты на животных проводились с участием Каледина В.И., Николина В.П. и Завьялова Е.Л. (ИЦИГ СО РАН, Новосибирск). Доклинических исследования безопасности препарата проведены в Лаборатории биологических испытаний ИБХ РАН, г. Пушкино.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Работа состоит из шести блоков:

1. Выделение и характеристика цитотоксического пептида из человеческого молока и получение рекомбинантных аналогов этого пептида;
2. Выбор наиболее перспективного рекомбинантного аналога для разработки противоопухолевого лекарственного препарата и установление первичной и вторичной структуры выбранного пептида;
3. Оценка цитотоксической активности, противоопухолевого и антиметастатического потенциала выбранного рекомбинантного аналога на культурах онкотрансформированных клеток различного гистогенеза *in vitro* и моделях опухолей животных и человека *in vivo*.
4. Изучение механизма цитотоксического действия пептида в отношении онкотрансформированных клеток молочной железы человека и выявление

белков - мишеней цитотоксического пептида в онкотрансформированных клетках;

5. Разработка лекарственного препарата на основе цитотоксического пептида и проведение его доклинических исследований;
6. Разработка подходов для повышения противоопухолевой эффективности лекарственного препарата.

При выполнении работы исследования по всем шести направлениям развивались параллельно и дополняли друг друга. Для решения поставленных задач применялись современные физико-химические и молекулярно-биологические подходы, позволившие получить достоверные и воспроизводимые результаты.

Выделение и очистку цитотоксического пептида из молока человека проводили серией последовательных хроматографий, что позволило получить целевой пептид в гомогенном состоянии. Характеризацию полученного пептида осуществляли методом MALDI-TOF спектрометрии.

Генно-инженерные аналоги цитотоксического пептида были получены как в про-, так и в эукариотических системах. Для установления особенностей структуры наиболее перспективного рекомбинантного аналога RL2 использовали методы кругового дихроизма (КД) и ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Оценку цитотоксической активности RL2 *in vitro* проводили на культурах опухолевых клеток мыши и человека различного гистогенеза, а также на здоровых клетках молочной железы и жировой ткани. Противоопухолевый потенциал онкотоксического пептида оценивали в отношении гепатокарцинома HA-1 при различной локализации опухоли, способах, дозах и продолжительности введения RL2, а также в отношении ксенографтов аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231. Для изучения антиметастатической активности RL2 использовали гепатокарциному HA-1 мыши с применением моделей спонтанного и искусственного метастазирования.

Статистическую обработку результатов экспериментов *in vitro* проводили с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. Для оценки статистической значимости результатов, полученных в экспериментах на животных, применяли непараметрический U-критерий Манна Уитни. При $p < 0.05$ различия между группами считали достоверными.

При исследовании механизма онкотоксического действия RL2 на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 оценивали такие признаки клеточной гибели как транслокацию фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны, изменение трансмембранного потенциала митохондрий, активацию инициаторных и эффекторных каспаз, а также фрагментацию ядерной ДНК опухолевых клеток.

Анализ локализации RL2 в клетках проводили методом флуоресцентной микроскопии. Белковые молекулы - мишени рекомбинантного аналога лактапина RL2 в клетке выявляли с использованием MALDI-TOF масс-

спектрометрического анализа. В работе предложен механизм апоптотической гибели клеток рака молочной железы MCF-7, индуцируемой RL2.

Фармацевтическая разработка и доклинические исследования (ДКИ) лекарственного препарата «Лактаптин» проведены в соответствии с требованиями, предъявляемыми к лекарственным средствам для парентерального введения. По результатам ДКИ препарат рекомендован для клинических исследований.

В работе предложен подход повышения противоопухолевой эффективности лекарственного препарата на основе RL2 – создание слитых белков, состоящих из RL2 и опухоль-адресующего пептида, обеспечивающего специфическое взаимодействие препарата с клетками опухоли.

1. Выделение лактаптина из человеческого молока

Используя стандартные методы фракционирования - ионообменная хроматография на сорбенте Fractogel TSK DEAE-650 (S) (Merck, Германия), хроматография на CM-Toyopearl 650 M (Toyo Soda Manufacturing CO., LTD., Япония), аффинная хроматография на цибакрон-сефарозе (Pharmacia, Швеция), высокоэффективная жидкостная хроматография на обращенно-фазовом сорбенте Protein C4 (Vydac, США), мы получили в гомогенном состоянии пептид, индуцирующий гибель опухолевых клеток. На каждом этапе очистки анализировали цитотоксическую активность хроматографических фракций в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Фракции, обладающие наибольшей цитотоксической активностью, объединяли и использовали для дальнейшей очистки цитотоксического агента. В результате пептид с кажущейся молекулярной массой ~ 12 кДа был получен в гомогенном состоянии (рисунок 1).

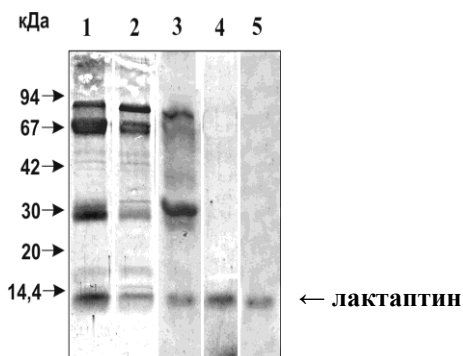


Рис. 1. Анализ белков хроматографических фракций, индуцирующих гибель клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. ЭФ в 12% SDS-ПААГ. Дорожки соответствуют цитотоксическим фракциям плазмы человеческого молока, полученным последовательными хроматографиями на сорбентах: 1 - белки плазмы человеческого молока; 2 - DEAE-Fractogel; 3 - CM-Fractogel; 4 - цибакрон-сефароза; 5 - Protein C4. Белки окрашены куасси R250.

Методом MALDI-TOF спектрометрии установлено, что полученный пептид имеет молекулярную массу 8606.5 ± 0.5 Да. Несовпадение молекулярных масс, определенных методом гель-электрофореза и методом масс-спектрометрии, обусловлено, по-видимому, аномальной подвижностью этого пептида в геле, характерной для коротких (<10 кДа) полипептидов.

С использованием базы данных "Mascot" было установлено, что молекулярная масса полученного пептида совпадает с молекулярной массой продукта трипсинолиза фрагмента 66 - 123 каппа-казеина человека (параметр score = 51, NCBI accession NP_005203). На рисунке 2 представлены полная аминокислотная последовательность выделенного пептида. Обнаруженный нами пептид ранее не был описан. Учитывая происхождение пептида и его способность индуцировать апоптоз, мы назвали его **лактаптином**.

Каппа-казеины млекопитающих достаточно хорошо изучены. Расшифрованы первичные структуры этого белка, выделенного из молока различных животных, и установлено, что его последовательность у млекопитающих довольно консервативна. При этом, большинство различий в первичной структуре находится в участке белка, соответствующем выделенному нами пептиду. По-видимому, видоспецифичность каппа-казеинов определяется именно этим участком.

2. Получение рекомбинантных аналогов лактаптина

Поскольку выделение лактаптина непосредственно из человеческого молока было достаточно проблематичным из-за ограниченности источников сырья и низкого выхода конечного продукта, для дальнейшего изучения его свойств и функций были созданы генно-инженерные аналоги этого пептида.

Для получения рекомбинантных аналогов лактаптина в прокариотической системе использовали штамм *E.coli* BL21(DE3). В структуру пептидов при клонировании были введены дополнительные последовательности, содержащие 6 остатков гистидина и обеспечивающие эффективное выделения целевых продуктов аффинной хроматографией на металл-хелатирующих сорбентах. Были получены штаммы продуценты четырёх генно-инженерных аналогов лактаптина, отличающиеся по длине клонируемого фрагмента. Рекомбинантные аналоги лактаптина в эукариотической системе получали с использованием клеток яичника китайского хомячка CHO. На рисунке 2 представлены последовательности выбранных для клонирования пептидов.

Все семь клонированных пептидов были выделены из культуральной среды и очищены до гомогенного состояния. Было проведено сравнение цитотоксических свойств природного лактаптина и полученных рекомбинантных пептидов. Пептид RL2 по своим цитотоксическим свойствам оказался наиболее близок к природному лактаптину, и поэтому дальнейшие исследования свойств и биологических функций пептида, а также разработку лекарственного препарата проводили с использованием RL2.

3. Структура RL2

3.1. Первичная структура RL2

Рекомбинантный аналог лактаптина RL2 представляет собой фрагмент казеина с 23 по 134 а.о., имеющий остаток метионина на N-конце и C-концевую последовательность из 6 остатков гистидина, облегчающую хроматографическую очистку пептида с использованием металл-хелатных аффинных сорбентов (рисунок 2).

Фрагмент последовательности каппа-казеина, содержащий лактаптин, и рекомбинантные аналоги лактапина



Рис. 2. **А.** Каппа-казеин, лактаптин и его генно-инженерные аналоги. RL1, RL2, RL3, RL4 – аминокислотные последовательности пептидов, клонированных в *Escherichia coli*. M-1, M-2, M-3 – аминокислотные последовательности пептидов, клонированных в клетках СНО. Серым оттенком выделены совпадающие последовательности лактапина и его генно-инженерных аналогов.

Б. Последовательность RL2: **красным** цветом выделены положительно заряженные аминокислотные остатки; **зелёным** – гидрофобные и алифатические аминокислотные остатки.

Последовательность RL2 обогащена положительно заряженными (на рисунке 2 выделены **красным** цветом) и гидрофобными (на рисунке 2 выделены **зелёным** цветом) аминокислотными остатками. Кроме того, 16.5% аминокислот в RL2 - это остатки пролина. Пептид имеет суммарный положительный заряд. Все вышеперечисленные особенности структуры определяют свойства RL2, которые будут описаны ниже.

3.2. Вторичная структура RL2

Известно, что биологические свойства белков реализуются через взаимодействия с клеточными структурами. Эти взаимодействия, в свою очередь, обусловлены вторичной, третичной и иногда четвертичной структурой белка. При этом пространственная структура белка определяется его первичной структурой. Кроме того, на конформацию белка существенно влияют свойства среды, в которой он находится. Для установления вторичной структуры RL2 были получены спектры кругового дихроизма пептида в гидрофильном (0,9% NaCl) и гидрофобном (50% трифторэтанол) окружении в диапазоне температур от 10 до 90° С.

Спектры RL2 в физиологическом растворе характеризуются глубоким минимумом при 198 нм, который указывает на большую долю неупорядоченных участков в структуре пептида. Нагревание раствора RL2 до 90° С приводит к уменьшению глубины этого пика, что говорит об уменьшении количества неупорядоченных участков. Более того, этот пик смещается вправо в сторону 206 нм, а в районе 222 нм появляется пик с молярной эллиптичностью меньше нуля. В совокупности, появление пиков на 206 и 222 нм указывает на то, что содержание α -спиралей в составе молекулы увеличивается. Спектр денатурированного RL2 после охлаждения практически не отличается от исходного спектра, что указывает на обратимость процесса денатурации.

Для определения участков RL2, которые образуют α -спирали при нагревании, были сняты спектры ядерного магнитного резонанса пептида. Было установлено, что участки RL2 с 9 по 12 и с 35 по 42 а.о способны приобретать или стабилизировать конформацию α -спирали в мембраноподобных средах и при нагревании в физиологическом растворе.

RL2 содержит один остаток цистеина (на рисунке 2 выделен жёлтым цветом) и согласно данным электрофоретического анализа в невосстанавливающих условиях представляет собой смесь димерной и мономерной форм (рисунок 3).

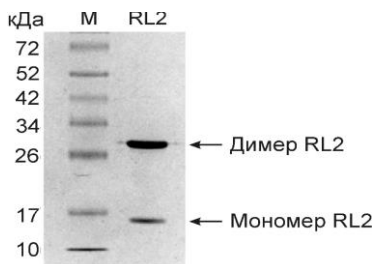


Рис. 3. Электрофоретический анализ RL2 в 13% ПААГ в невосстанавливающих условиях. М – набор белков с известными молекулярными массами.

Таким образом, можно утверждать, что RL2 является нестрогим упорядоченным пептидом, способным в мембраноподобных средах и при нагревании в физиологическом растворе образовывать α -спираль в районах с 9 по 12 и/или с 35 по 42 а.о.

4. Цитотоксическая активность RL2

Исследование цитотоксической активности RL2 проводили на клетках опухолевых линий человека и мыши различного гистогенеза, на клетках первичных культур, полученных из образцов опухолей пациентов с аденокарциномой и фиброаденомой молочной железы человека, а также на клетках здоровой ткани молочной железы и мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани (MSC). Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ теста (Рисунок 4).

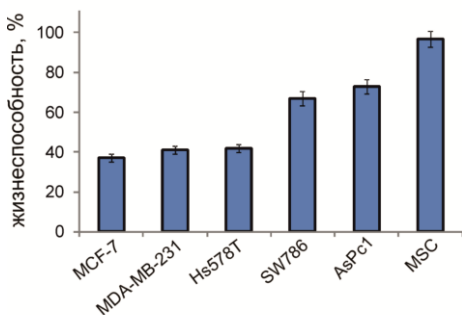


Рис. 4. Влияние RL2 (0.2 мг/мл, 48 часов) на жизнеспособность опухолевых клеток человека различного гистогенеза: аденокарцинома молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231, Hs578T), прямой кишки (SW837), поджелудочной железы (AsPc1), и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (MSC). Данные представлены как относительное среднее значение (%) $\pm$ SD по сравнению с контрольными клетками (100%) по результатам трех независимых экспериментов.

Показано, что RL2 подавляет жизнеспособность опухолевых клеток человека различного гистогенеза и не влияет на жизнеспособность немалигнизированных клеток жировой ткани. Клетки аденокарциномы молочной железы оказались наиболее чувствительны к цитотоксическому действию RL2.

При оценке цитотоксической активности RL2 в отношении первичных культур клеток молочной железы человека (нормальные клетки, фиброаденоматоз и аденокарцинома молочной железы) установлено, что наибольшей чувствительностью к действию RL2 обладают клетки аденокарциномы молочной железы человека ($IC_{50} = 0.25 \pm 0.046$ мг/мл). Чувствительность клеток доброкачественной фиброаденомы к действию RL2 была достоверно ниже (не менее чем в 1,5 раза) чувствительности клеток аденокарциномы. Клетки первичной культуры здоровой ткани молочной железы человека оказались нечувствительны к действию RL2 (рисунок 5).

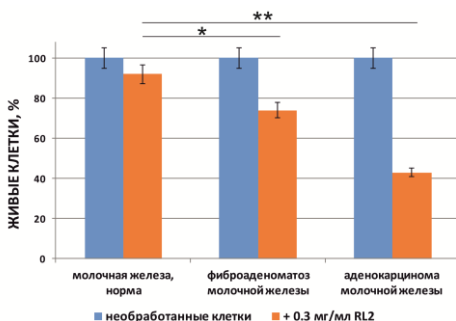


Рис. 5. Изменение жизнеспособности клеток первичных культур злокачественных (n=3), доброкачественных (n=3) опухолей и здоровых (немалигнизированных) тканей (n=2) молочной железы человека под действием RL2 (0,3 мг/мл, 48 часов). Данные представлены как относительное среднее значение (%) $\pm$ SD по сравнению с контрольными клетками (100%), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Таким образом, показано, что RL2 подавляет жизнеспособность опухолевых клеток - злокачественной и доброкачественной опухолей, и практически не оказывает влияния на жизнеспособность и пролиферацию нетрансформированных "здоровых" клеток молочной железы человека.

Для изучения противоопухолевой эффективности RL2 в отношении опухолей человека *in vivo* необходимо использовать иммунодефицитных животных, что делает эксперимент существенно дороже. Кроме того, в случае гормон-зависимых линий клеток для развития опухолей необходимы инъекции гормонов экспериментальным животным, что значительно усложняет эксперимент и согласно данным литературы и нашему опыту не позволяет получить достаточную группу животных с близкими размерами опухолей. Поэтому были предприняты попытки найти мышинные онкотрансформированные клетки, чувствительные к действию RL2 и способные формировать опухоли при трансплантации животным. Для этого была собрана панель опухолевых клеток мыши и исследована цитотоксическая активность RL2 в отношении этих клеток (рисунок 6).

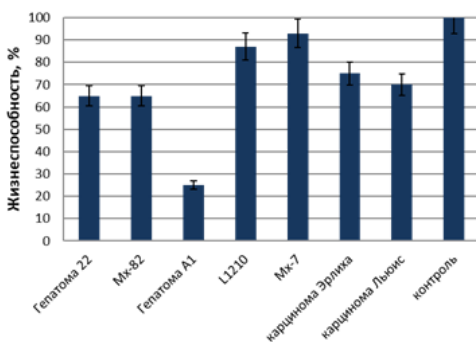


Рис. 6. Цитотоксическая активность RL2 в отношении клеток опухолей мыши. Клетки инкубировали с RL2 (50 мкг/мл) 48 ч и оценивали жизнеспособность методом МТТ. Данные жизнеспособности представлены как относительное среднее значение (%) $\pm$ SD по сравнению с контрольными клетками (100%), обработанными PBS, по результатам трех независимых экспериментов.

По результатам проведенных экспериментов наиболее чувствительной к цитотоксическому действию RL2 оказалась гепатокарцинома А1 мыши (НA-1)

(рисунок 6), которую далее использовали для оценки противоопухолевой эффективности пептида *in vivo*.

5. Противоопухолевая и антиметастатическая эффективность RL2

Гепатокарцинома HA-1 мыши является очень удобной опухолевой моделью поскольку опухолевые клетки способны формировать как солидные опухоли при подкожной и внутримышечной трансплантации, так и асцитную опухоль при трансплантации в брюшную полость. Кроме того, HA-1 активно метастазирует в печень, что позволяет использовать ее для исследований антиметастатической активности препарата. При проведении исследований клетки гепатокарциномы HA-1 трансплантировали самкам мышей линии A/Sp (12 - 16 недель) внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно или внутривенно; детектировали развитие опухоли и/или метастазов, затем внутривенно или внутрибрюшинно вводили препарат RL2.

В качестве человеческой опухолевой модели использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB 231, подкожно трансплантированные иммунодефицитным мышам SCID. RL2 вводили внутривенно. Животные контрольной группы получали физиологический раствор по той же схеме, что и RL2.

5.1. Противоопухолевая эффективность RL2 в отношении опухоли HA-1, трансплантированной в брюшную полость

Общая выживаемость пациентов является одной из важнейших характеристик результата лечения онкологических заболеваний. При этом даже не слишком значительное на первый взгляд увеличение продолжительности жизни больных может иметь важное значение в клинической практике. Так, применяемый при лечении рака молочной железы препарат тамоксифен увеличивает выживаемость пациенток на 8%, что снижает смертность от РМЖ в Европе на 64 тыс. жизней ежегодно.

Оценку непосредственного онкотоксического действия RL2 на опухоль *in vivo* проводили согласно схеме, представленной на рисунке 7А. Противоопухолевую эффективность препарата оценивали по общей выживаемости мышей экспериментальной и контрольной групп (рисунок 7Б).

Согласно полученным результатам средняя продолжительность жизни мышей экспериментальной группы (n=8), получивших 2 инъекции RL2 в дозе 12,5 мг/кг, составила 18.3 ± 0.53 дней, тогда как средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы (n=9) - 12.2 ± 0.43 дней ($p < 0.001$).

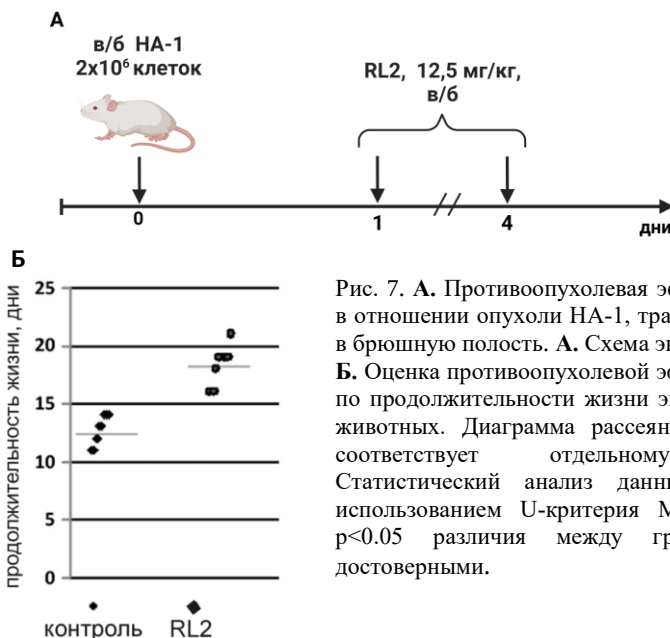


Рис. 7. А. Противоопухолевая эффективность RL2 в отношении опухоли HA-1, трансплантированной в брюшную полость. А. Схема эксперимента.

Б. Оценка противоопухолевой эффективности RL2 по продолжительности жизни экспериментальных животных. Диаграмма рассеяния; каждая точка соответствует отдельному животному. Статистический анализ данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия между группами считали достоверными.

Таким образом, показано, что RL2 оказывает противоопухолевое действие на опухоль внутрибрюшинной локализации (асцит) и значительно увеличивает продолжительность жизни животных-опухоленосителей.

5.2. Противоопухолевая эффективность RL2 в отношении подкожно или внутримышечно трансплантированной гепатокарциномы HA-1

Развитие опухоли при подкожной и внутримышечной трансплантации животным (2×10^5 клеток/мышь) происходило по-разному. При трансплантации в мышечную ткань опухоль развивалась быстрее, чем при подкожной трансплантации, что, вероятно, обусловлено лучшим кровоснабжением мышцы по сравнению с подкожной клетчаткой. Лечение опухоли, трансплантированной внутримышечно, начинали с 10-го дня после имплантации опухолевых клеток, в то время как терапию подкожно трансплантированной опухоли - с 15-ого дня после трансплантации.

При исследовании эффективности RL2 в отношении внутримышечно трансплантированной гепатокарциномы HA-1 препарат вводили в нескольких дозах для оценки, в том числе, его дозозависимого эффекта. Схема эксперимента представлена на рисунке 8. Дальнейшее увеличение дозы RL2 ограничено растворимостью пептида и максимально возможным объемом раствора для в/в введения животным.

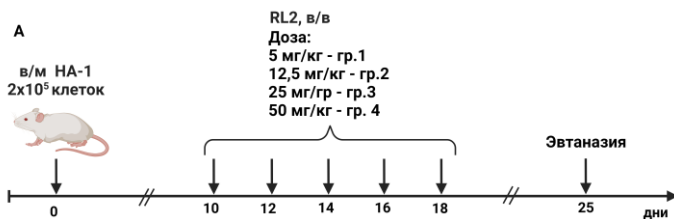


Рис. 8. Схема эксперимента по исследованию противоопухолевой эффективности RL2 в отношении внутримышечно трансплантированной гепатокарциномы HA-1 в зависимости от дозы введенного препарата.

В ходе эксперимента измеряли размер опухолей в опытных и контрольных группах. В конечной точке эксперимента опухоли вырезали и взвешивали.

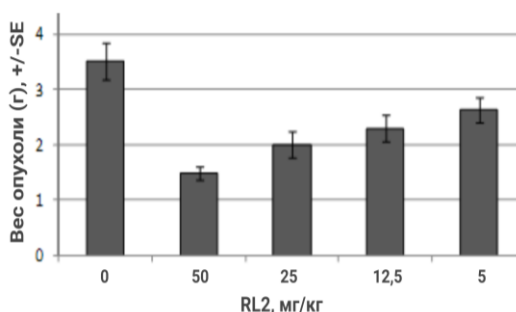


Рис. 9. Противоопухолевая эффективность RL2 в отношении внутримышечной гепатокарциномы HA-1. Влияние дозы препарата. Представлены средние значения $\pm$ SE (n=6). Статистический анализ данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Согласно полученным данным RL2 обладает значительной противоопухолевой эффективностью: при внутривенном введении препарата в дозе 50 мг/кг вес опухолей животных опытной группы меньше веса опухолей контрольных животных более чем в 2 раза.

Токсичность препарата RL2 в использованных дозах оценивали по изменению веса животных в ходе эксперимента. Статистически значимого снижения веса при использовании высоких доз препарата отмечено не было, однако при переходе от дозы 25 мг/кг к дозе 50 мг/кг у животных наблюдалась «вздыбленность» волосяного покрова, что указывает на проявление токсических эффектов препарата в этой дозе. Поэтому в дальнейших экспериментах *in vivo* доза RL2 не превышала 40 мг/кг.

Терапию подкожно трансплантированной опухоли HA-1 проводили согласно схеме, представленной на рисунке 10А. Действие RL2 на рост опухоли показано на рисунке 10Б. Лечение животных по указанной схеме позволяет добиться более чем двукратного торможения роста опухоли по сравнению с контрольной группой.

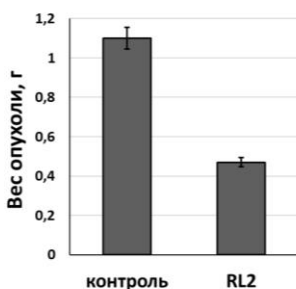
На рисунке 10В представлены фотографии животных, получавших RL2, и из контрольной группы. Видно, что физическое состояние животных, получавших RL2, существенно лучше, чем состояние нелеченых животных: мышь более упитанна и имеет ровный и гладкий шерстяной покров, что свидетельствует о

лучшем «качестве жизни» леченых мышей, если это понятие можно применять к экспериментальным животным.

А



Б



В

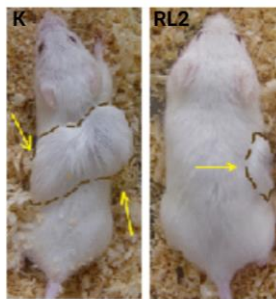


Рис. 10. Противоопухолевая эффективность RL2 в отношении подкожно трансплантированной гепатокарциномы HA-1. **А** – Схема эксперимента. В/в введение RL2 в дозе 25 мг/кг, курсом из 3 инъекций, с интервалом в один день. **Б** - Торможение роста опухоли при терапии RL2 (средний вес опухолей животных контрольной (n=6) и экспериментальной (n=6) групп); Представлены средние значения±SE (n=6). Статистический анализ данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. **В** – внешний вид животных контрольной и экспериментальной групп.

В результате проведенных экспериментов установлено, что препарат RL2 эффективно тормозит развитие гепатокарциномы HA-1 мыши различной локализации (подкожная, внутримышечная, внутрибрюшинная) при различных способах введения препарата (в/в, в/бр). Диапазон терапевтических доз препарата RL2 без проявления токсических эффектов составляет 12,5 – 40 мг/кг.

5.3. Антиметастатическая активность RL2 на мышах с перевиваемыми опухолями

Хирургическое удаление опухоли в настоящее время остается одним из наиболее результативных методов лечения, эффективность которого часто снижается в результате развития раннего метастазирования. Развитие метастазов является одной из главных причин смертности при онкологических заболеваниях и стадией, лимитирующей эффективность химиотерапии.

Основными путями метастазирования являются: лимфогенный, когда опухолевые клетки распространяются с лимфой по лимфатическим сосудам, и

гематогенный - распространение клеток опухоли по кровеносным сосудам, обычно по венам. Лимфогенный путь метастазирования является предпочтительным для большинства карцином, в том числе для рака молочной железы (РМЖ). Ранние метастазы обнаруживаются в близлежащих (регионарных) лимфоузлах – в подмышечной области. Типичными для РМЖ являются метастазы в кости, которые могут возникать как изолированно, так и одновременно с метастатическими очагами в других органах и тканях. Также нередко рак молочной железы метастазирует в легкие. В легкие метастазы могут распространяться как гематогенным, так и лимфогенным путем. Метастазы в головной мозг чаще всего свидетельствуют о запущенном опухолевом процессе и их появление не исключено даже после курсов химиотерапии. В большинстве случаев клетки метастазов являются менее дифференцированными по сравнению с клетками первичной опухоли и в связи с этим - более злокачественными и агрессивными.

На сегодняшний день не существует препаратов, эффективно предотвращающих образование вторичных очагов опухоли в организме, поэтому исследование антиметастатического потенциала разрабатываемых противоопухолевых препаратов является крайне важной задачей.

Оценку способности исследуемого препарата ингибировать метастазирование проводят на животных с перевиваемыми опухолями с использованием любых моделей спонтанного метастазирования. При этом изучают действие препарата как на развитие первичного опухолевого узла, так и на выраженность метастатического процесса.

5.3.1 Ингибирование спонтанного метастазирования гепатокарциномы НА-1 препаратом RL2 при росте первичной опухоли

Гепатокарцинома НА-1 мыши - агрессивная опухоль, метастазирующая преимущественно в печень. Для исследования ингибирования спонтанного метастазирования НА-1 препаратом RL2 эксперимент проводили согласно схеме, представленной на рисунке 11. Лечение начинали при достижении опухоли стадии сформировавшегося узла (день 5).

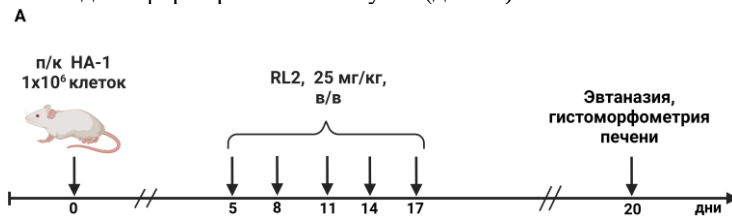


Рис. 11. Ингибирование спонтанного метастазирования препаратом RL2. Схема эксперимента.

После эвтаназии у экспериментальных животных извлекали опухоль и печень. Опухоль взвешивали, печень фиксировали в формалине и затем проводили гистоморфологические исследования срезов ткани печени, окрашенных гематоксилином-эозином и пикрофуксином (по Ван-Гизону). Для

верификации и анализа данных использовали морфометрическую полуколичественную оценку состояния тканевых структур зоны хирургического перелома с помощью стандартной тест-сетки (морфометрический анализ). Подсчеты проводились в 30 полях зрения. Распространенность метастатического процесса оценивали как процент площади, занятой метастазами, по отношению к площади среза.

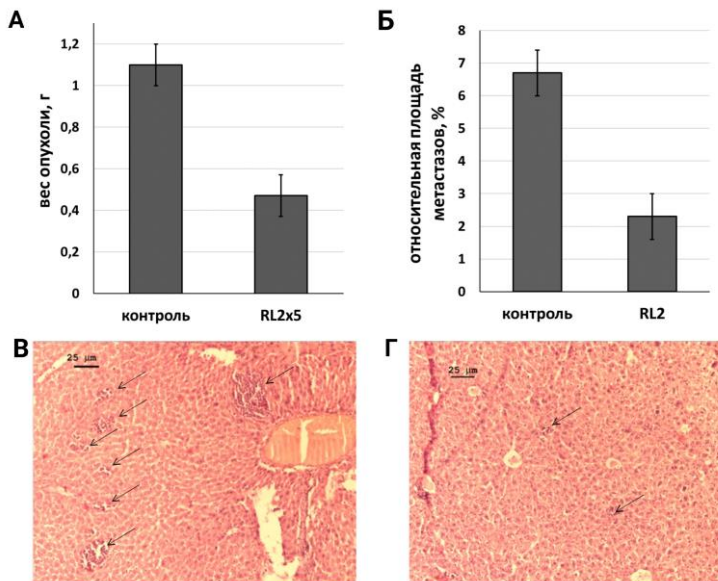


Рис. 12. Противоопухолевая и антиметастатическая активность RL2. Изменение веса опухоли HA-1 (А) и относительной площади метастазов HA-1 в печени мышей (Б) в контрольной группе и группе, получавшей RL2. В, Г - срезы печени мышей-опухоленосителей контрольной и экспериментальной групп, соответственно. Стрелками указаны области метастазов. Окраска гематоксилин – эозином. Увеличение x400.

Установлено, что при наличии первичного опухолевого узла RL2 не только тормозит рост опухоли более чем в 2 раза, 0.47 ± 0.05 г vs 1.10 ± 0.22 г (рисунок 12А), но и в 3 раза уменьшает площадь, занимаемую метастазами гепатомы HA-1 в печени, $2.3 \pm 0.4\%$ vs $6.7 \pm 0.7\%$ в контрольной группе (рисунок 12Б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что RL2 является перспективным химиотерапевтическим препаратом, оказывающим не только противоопухолевое, но и выраженное антиметастатическое действие.

5.3.2. Антиметастатическое действие RL2 при удалении первичного опухолевого узла

Исследование антиметастатической активности RL2 при удалении первичного опухолевого узла проводили согласно схеме, представленной на рисунке 13. Животных с опухолями разделяли на группы ($n=7$) и начинали лечение RL2 или ФНО- α (препарат сравнения) при достижении опухолевыми

узлами линейных размеров в среднем 8 мм². Животные контрольной группы получали физиологический раствор.

На 22-ые сутки после трансплантации опухолевых клеток опухоли удаляли и взвешивали. Оперированных мышей оставляли для дальнейшей оценки продолжительности жизни и уровня метастазирования (рисунок 13).

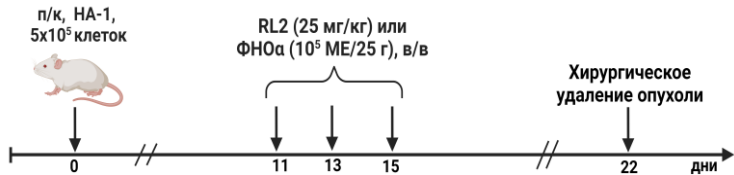


Рис. 13. Схема эксперимента по исследованию влияния RL2 на формирование метастазов при удалении первичного опухолевого узла (оценки процесса метастазирования по продолжительности жизни).

На рисунке 14 представлены диаграммы, отражающие изменения веса опухоли при терапии HA-1 препаратами RL2 и ФНОα и продолжительности жизни экспериментальных животных.

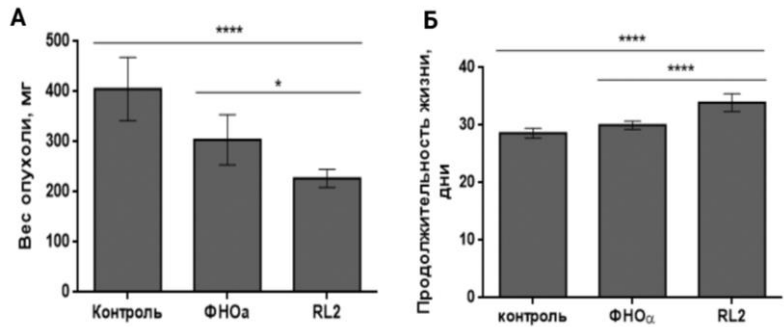


Рис. 14. Терапия гепатомы HA-1 препаратами RL2 и ФНОα. Вес опухоли (А) и продолжительность жизни (Б) животных контрольной и экспериментальных групп (* - $p \leq 0.05$, **** - $p \leq 0.0001$).

В результате проведенных экспериментов показано, что RL2, в отличие от ФНОα, достоверно тормозит рост опухоли (рисунок 14А, таблица 1) и увеличивает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей после удаления первичного опухолевого узла (рисунок 14Б, таблица 1).

Таблица 1. Лечение RL2 увеличивает выживаемость животных при моделировании процесса метастазирования при удалении первичного опухолевого узла

Препарат, доза	Вес опухоли, мг	Продолжительность жизни, дни
Физраствор 0,5 мл	405 ± 63	28,6 ± 0,86
RL2, 25 мг/кг, 2 инъекции	227 ± 18	33,9 ± 1,55
ФНОα, 10 ⁵ МЕ/25 г, 2 инъекции	304 ± 50	30 ± 0.71

Ввиду того, что НА-1 – это агрессивная, быстро метастазирующая опухоль, можно предположить, что увеличение продолжительности жизни животных является следствием подавления метастазирования.

5.3.3. Исследование антиметастатического действия RL2 на модели послеоперационных метастазов

Наиболее эффективным методом лечения злокачественных новообразований является хирургическое удаление опухолевого узла, но при этом, в ряде случаев хирургическое вмешательство может спровоцировать распространение опухолевых клеток, индуцирующих образование метастазов (т.н. рецидивы после оперативного вмешательства). Такие рецидивы могут быть следствием разрастания неудаленных или неразрушенных фрагментов ткани опухоли как в месте первичной опухоли, так и в близлежащих лимфопутях или лимфоузлах. Для предотвращения подобных рецидивов, например, при раке молочной железы, при удалении опухоли проводится удаление регионарных лимфоузлов. Моделирование послеоперационного метастазирования и разработка методов борьбы с такими проявлениями является очень актуальной задачей.

В проведенном исследовании послеоперационные метастазы моделировали путем внутривенного введения опухолевых клеток в кровяное русло. Для изучения возможности применения RL2 в качестве препарата, препятствующего инсеминации опухолевыми клетками в процессе хирургического удаления опухоли, препарат вводили животным перед трансплантацией клеток опухоли, моделируя таким образом обычную в клинической практике схему применения химиотерапевтических препаратов (рисунок 15).



Рис. 15. Схема эксперимента по предотвращению развития послеоперационных метастазов при терапии RL2. Самки A/Sn, 10 - 12 недель. Опытная группа (n=8) – RL2, в/в, 25 мг/кг; контрольная группа (n=8) – физраствор, в/в.

Эффективность лечения RL2 оценивали по изменению продолжительности жизни животных-опухоленосителей из экспериментальной и контрольной групп. Средняя продолжительность жизни животных в группе, получавшей RL2, составила $20,8 \pm 0,38$ дня, в то время как в контрольной группе - $18,7 \pm 0,37$ дней (рисунок 16).

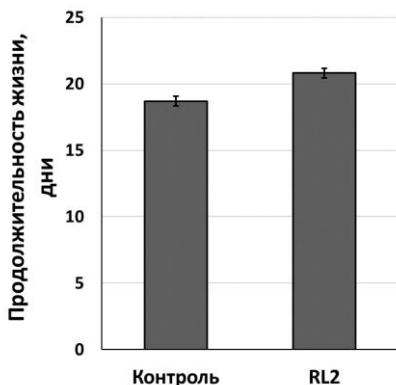


Рис. 16. Применение RL2 до трансплантации опухолевых клеток в кровяное русло увеличивает продолжительность жизни животных. Достоверность различий между группами оценивали как $p < 0.005$

Таким образом, однократное применение RL2 в дозе 25 мг/кг позволило увеличить продолжительность жизни животных с моделью послеоперационных метастазов опухоли HA-1.

5.3.4. Влияние длительности курса терапии RL2 на продолжительность жизни мышей с искусственными метастазами

Для получения искусственных метастазов клетки гепатокарциномы HA-1 вводили внутривенно и проводили терапию RL2 согласно схеме, представленной на рисунке 17. Задачей эксперимента было исследование эффективности антиметастатической активности RL2 в зависимости от продолжительности курса лечения.

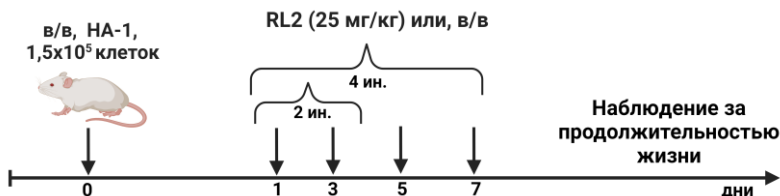


Рис. 17. Схема терапии опухоли HA-1 препаратом RL2 в модели искусственного метастазирования. Самки A/Sp, 10 - 12 недель, в/в трансплантация клеток HA-1 ($1,5 \times 10^5$ клеток). Опытная группа 1 ($n=8$) – в/в введение RL2, 25 мг/кг, курсом из 2х инъекций; опытная группа 2 ($n=8$) – в/в введение RL2, 25 мг/кг, курсом из 4х инъекций; контрольная группа ($n=8$) – в/в введение физраствора по той же схеме, что RL2.

Эффективность терапии оценивали по увеличению продолжительности жизни животных, получавших препарат, относительно контрольных животных, получавших физиологический раствор. Согласно полученным данным RL2 достоверно увеличивает продолжительность жизни животных с искусственными метастазами, однако увеличение длительности курса терапии препаратом RL2 от

2х до 4х инъекций не влияет на выживаемость животных (рисунок 18). Продолжительность жизни мышей, получивших 2 или 4 инъекции RL2 составила $25,42 \pm 2,14$ и $25,57 \pm 2,14$ дня, соответственно. Продолжительность жизни контрольных животных составила $21,7 \pm 0,75$.

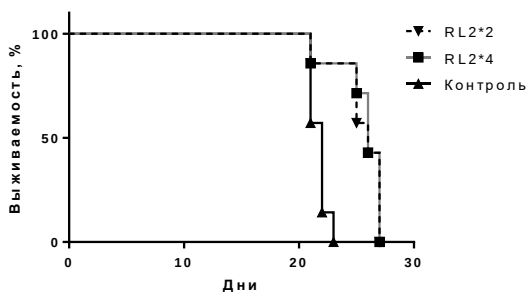


Рис. 18. Влияние продолжительности курса лечения препаратом RL2 на продолжительность жизни животных с искусственными метастазами гепатомы HA-1.

Таким образом, установлено, что увеличение продолжительности курса лечения опухоли HA-1 в модели искусственного метастазирования препаратом RL2 не приводит к достоверному повышению эффективности терапии, и курс, состоящий из 2 инъекций, достаточен для ингибирования метастазирования.

5.4. Противоопухолевая эффективность RL2 в отношении опухолей человека в модели ксенографтов (*in vivo*)

Для оценки противоопухолевой эффективности RL2 в отношении опухолей человека использовали клетки аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231, показавшие высокую чувствительность к онкотоксическому действию RL2 *in vitro* (рисунок 4). Клетки MDA-MB-231 широко применяются для исследования новых противоопухолевых препаратов в модели ксенографтов. В отличие от клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, клетки MDA-MB-231 позволяют моделировать гормон-независимую трижды негативную опухоль молочной железы. Трижды негативные опухоли молочной железы, как правило, являются агрессивными опухолями с "плохим прогнозом", поражающими молодых женщин и не поддающимися терапии гормональными препаратами.

Для подкожной трансплантации готовили суспензию клеток MDA-MB-231 в PBS и к полученной суспензии добавляли матригель (BD Bioscience), чтобы соотношение суспензии клеток и матригеля по объему составляло 2:1, с концентрацией $(3.5 - 4) \times 10^7$ клеток/мл. Перевивочная доза составляла $(3.5 - 4) \times 10^6$ клеток/мышь.

При достижении опухолями размера 20 - 130 мм³ животных разделяли на группы (n=9) так, чтобы средний объем опухоли в группе был одинаковым (количество животных с большими и маленькими опухолями в каждой из групп должно быть одинаковым). Животные экспериментальной группы получали RL2, животные контрольной группы – физраствор. Схема терапии опухолей препаратом RL2 представлена на рисунке 19.



Рис. 19 Противоопухолевая эффективность RL2 в отношении опухолей человека, трансплантированных иммунодефицитным животным. Схема эксперимента.

В данном эксперименте исследуемый препарат вводили животным в дозе 40 мг/кг поскольку опухолевые клетки человека менее чувствительны к онкотоксическому действию RL2 по сравнению с клетками мыши HA-1. В то же время, как было показано выше, эта доза не вызывает токсических эффектов при внутривенном введении животным.

Оценку общего состояния животных в течение эксперимента проводили путем клинического осмотра с фиксацией видимых отклонений жизненных показателей. Линейные размеры опухолей определяли в день рандомизации (День 0) и затем каждые 5 дней.

Объем опухолей рассчитывали по формуле (1):

$$V \text{ мм}^3 = L \times W^2 / 2, \quad (1)$$

где L - наибольший диаметр опухоли, W – наименьший.

Динамика роста опухолей представлена на рисунке 20А.

По окончании эксперимента у мышей контрольной и опытной групп опухоли извлекали и взвешивали (рисунок 20 Б, В). Противоопухолевую эффективность RL2 определяли по эффективности торможения роста опухоли животных опытной группы относительно опухолей в контрольной группе. Индекс торможения роста опухоли ТРО (%) рассчитывали по формуле (2):

$$\text{ТРО (\%)} = (M_k - M_o) \times 100 / M_k, \quad (2),$$

M_o – средняя масса опухоли животных экспериментальной группы,

M_k - средняя масса опухоли животных контрольной группы.

Показано, что препарат рекомбинантного лактапина в дозе 40 мг/кг вызывает достоверное торможение роста аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, индекс торможения роста опухоли (ТРО) составил 43%. По критериям оценки ингибирующего эффекта RL2 относится к категории препаратов умеренной эффективности, имеющих $\text{ТРО} \geq 20 - 50\%$. Эффект препарата проявляется при его введении на ранней стадии развития опухолевого процесса, является выраженным и стабильным.

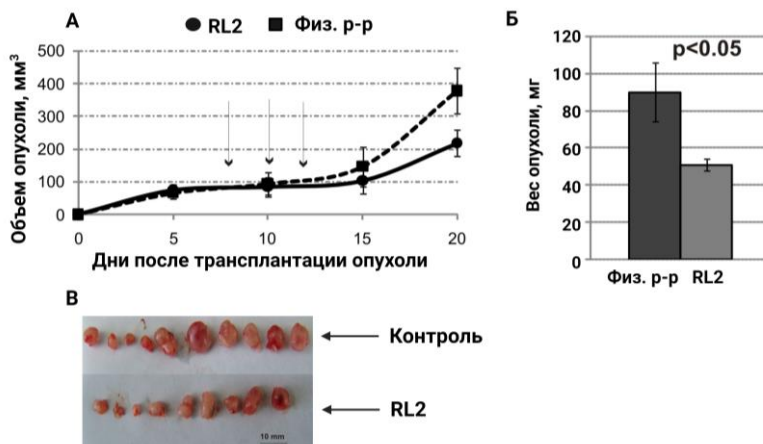


Рис. 20. Противоопухолевая эффективность RL2 в отношении опухоли человека MDA-MB-231, подкожно трансплантированной мышам SCID (самки, массой 15 - 25 г, получены из SPF вивария ИЦиГ СО РАН). **А.** Динамика роста опухоли MDA-MB-231. **Б.** Вес опухолей мышей контрольной группы и мышей, получавших RL2. **В.** Фото опухолей мышей контрольной (n=10) и опытной (n=9) групп.

Исходя из полученных данных по оценке противоопухолевого и антиметастатического потенциала рекомбинантного аналога лактапина можно заключить, что препарат RL2 обладает противоопухолевой и антиметастатической активностью в отношении опухолей животных и человека и может рассматриваться в качестве прототипа для разработки противоопухолевых лекарственных средств.

6. Механизм цитотоксического действия RL2

При разработке новых лекарственных средств необходимым условием успешного продвижения биологически активных молекул является понимание механизма их действия на ткани/органы мишени.

К настоящему моменту насчитывается более десяти известных механизмов клеточной гибели. По морфологическим признакам долгое время выделяли три основных механизма гибели клеток: апоптоз, аутофагию и некроз.

При исследовании цитотоксического действия лактапина, выделенного из молока человека, на клетки MCF-7 было показано, что пептид индуцирует гибель клеток, сопровождающуюся морфологическими изменениями, характерными для апоптоза: разрушением клеточного монослоя; откреплением клеток от пластиковой поверхности; конденсацией цитоплазмы и ядер, а также уменьшением числа и снижением интенсивности флуоресценции митохондрий в присутствии родаминовых красителей.

Апоптоз является запрограммированной формой гибели клеток и опосредуется ферментами семейства цистеин-зависимых аспартат-специфических протеаз (каспаз). Апоптоз может быть активирован двумя

механизмами: рецептор-опосредованным (внешним) и митохондриальным (внутренним). Рецептор-опосредованный путь апоптотической гибели клеток основан на активации «рецепторов смерти» и характерен для неповрежденных клеток. Активации митохондриального пути подвержены патологически измененные клетки, в которых инициация действия каспаз происходит за счет работы белков семейства Bcl-2. После получения сигнала к гибели наступает индукторная фаза апоптоза. В этот период происходит активация инициаторных каспаз, белка p53 и белков семейства Bcl-2. Во время следующей, эффекторной фазы, происходит экстернализация фосфатидилсерина (PS) на внешнюю поверхность мембран, что является классической характерной чертой апоптотических клеток. Кроме того, происходит снижение мембранного потенциала митохондрий, образование апоптосомы, повышается проницаемость митохондриальной мембраны и происходит активация эффекторных каспаз, которые блокируют биосинтез белков и активируют ДНКазу CAD (caspase-activated DNase — «ДНКазы, активируемая каспазами»), что приводит к гибели клетки. В результате образуются апоптотические тельца, содержащие элементы ядра и интактные органеллы.

В отличие от некроза, апоптоз характеризуется отсутствием нарушения структурной целостности биологических мембран, следовательно, отсутствием выхода содержимого цитоплазмы во внеклеточное пространство, и проходит без развития воспаления и структурных и функциональных дефектов ткани.

В случае противоопухолевых лекарственных средств способность индуцировать гибель опухолевых клеток по пути апоптоза, без развития полномасштабного воспалительного процесса является несомненным преимуществом.

Для дальнейшего продвижения RL2 в качестве противоопухолевого лекарства важно было установить механизм его онкотоксического действия.

Для изучения апоптотической гибели клеток *in vitro* используют методы детекции характерных морфологических изменений (потеря целостности и деполяризация плазматической мембраны, экстернализация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность клеточной мембраны, деполяризация митохондриальной мембраны, фрагментация ДНК) и анализа изменений молекулярного профиля клеток (активация каспаз, белков семейства Bcl-2 и других). Методы морфологической оценки апоптотических процессов включают: 1) микроскопический анализ с использованием витальных красителей и красителей, селективно выявляющих пикнотизированный хроматин, 2) флуоресцентно-микроскопический анализ и проточную цитофлуориметрию), 3) электронно-микроскопические методы, 4) выявление олигонуклеосомной деградации ДНК, 5) биохимический анализ (ИФА, ИГХ, вестерн-блот) белков-маркеров, участвующих в запуске апоптотической гибели.

При исследовании механизма цитотоксического действия RL2 на клетки MCF-7 проведен анализ основных биохимических маркеров апоптоза клеток, включающий: анализ транслокации PS на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны; анализ изменений трансмембранного

потенциала митохондрий; анализ активации инициаторных каспаз-8, -9 и эффекторной каспазы-7; и анализ активации ДНКазы DFF40 и олигонуклеосомной фрагментации ДНК клеток.

6.1. Транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность плазматической мембраны клеток MCF-7

Экспозиция полярной части фосфатидилсерина (PS) с внутренней стороны липидного бислоя на внешнюю является одним из наиболее характерных изменений плазматической мембраны клетки при апоптозе. Известно, что в нормальных клетках ассиметричное распределение PS в липидном бислое плазматической мембраны поддерживается АТФ-зависимыми транслоказами. При апоптозе происходит ингибирование транслоказ и активация трансмембранного фермента скрамблазы, катализирующего диффузию полярной части PS через липидный бислой, что приводит к симметричному распределению PS на внутренней и внешней стороне цитоплазматической мембраны клеток.

Методы выявления апоптотических клеток основаны на дифференциальном окрашивании мембраны флуоресцентно-меченым белком аннексин V, который связывается с полярной частью PS. При этом апоптотические клетки остаются не проницаемыми для йодида пропидия (PI), окрашивающего клеточные нуклеиновые кислоты. Использование PI в паре с аннексином V позволяет дифференцировать ранние апоптотические, некротические либо вторично некротические клетки.

Для того, чтобы оценить изменения плазматической мембраны клеток MCF-7 под действием RL2 клетки окрашивали индикаторами FITC-аннексин V/PI и анализировали проточной цитофлуориметрией. (рисунок 21). Изменение уровня транслокации PS на внешнюю поверхность плазматической мембраны в клетках, обработанных RL2, определяли относительно базового уровня в не обработанных, контрольных клетках.

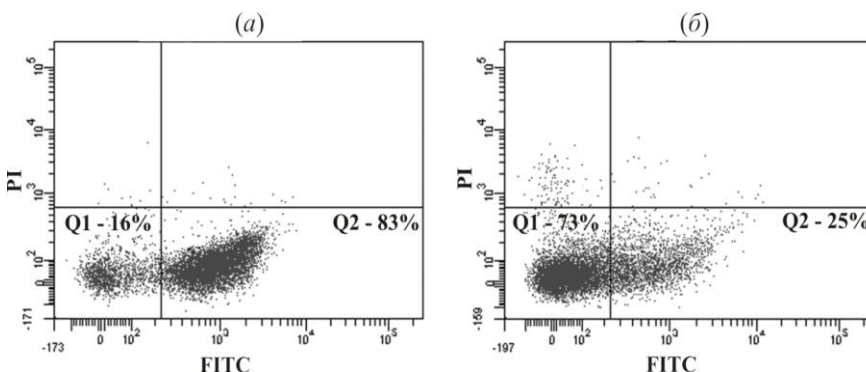


Рис. 21. Диаграммы распределения клеток MCF-7 по интенсивности окраски FITC-меченым аннексином V (FITC) и йодидом пропидия (PI); *a* – клетки MCF-7, инкубированные с RL2 (100 мкг/мл) в течение 24 ч, *б* – клетки MCF-7, не обработанные RL2; Q1 и Q2 – популяция жизнеспособных и апоптотических клеток, соответственно.

Из данных рисунка видно, что при инкубации клеток MCF-7 в присутствии RL2 количество апоптотических клеток составляет ~83%, а жизнеспособных ~16% от всех клеток в популяции. В то время как в культуре контрольных клеток MCF-7 популяция апоптотических клеток составила ~25%, а жизнеспособных ~73%. При этом снижение жизнеспособности клеток под действием RL2 сопровождалось морфологическими изменениями, характерными для апоптоза клеток в культуре: откреплением от пластиковой подложки, конденсацией цитоплазмы и ядер (данные не иллюстрированы).

Таким образом показано, что RL2 вызывает в раковых клетках MCF-7 изменения цитоплазматической мембраны, характерные для апоптоза.

6.2. Изменения трансмембранного потенциала митохондрий клеток MCF-7 под действием RL2

При окислительном фосфорилировании на внутренней митохондриальной мембране (ММ) создается разность потенциалов $\Delta\Psi$ ($\Delta\Psi_m$ – трансмембранный потенциал митохондрии), величина которого при физиологических условиях может принимать значения от 120 до 180 мВ. Внутренняя мембрана митохондрий диффузионно-непроницаема для гидрофильных низкомолекулярных соединений и ионов, что обеспечивает поддержание стабильного значения $\Delta\Psi_m$. При этом, гидрофобные молекулы способны диффундировать сквозь липидный бислой внутренней ММ и накапливаться в матриксе в концентрациях на 2-3 порядка выше их концентрации в цитоплазме клетки. Способность гидрофобных катионов накапливаться в матриксе активных митохондрий используют для качественного измерения $\Delta\Psi_m$.

Для оценки изменения $\Delta\Psi_m$ митохондрий клеток MCF-7, происходящие под действием RL2, были использованы флуорофоры DiOC₆ и JC-1. Данные флуорофоры проникают в жизнеспособные клетки и накапливаются в активных митохондриях. При этом, DiOC₆ флуоресцирует в зеленой области спектра и изменения $\Delta\Psi_m$ сопровождаются изменением интенсивности флуоресценции при $\lambda_{\max} = 552$ нм. JC-1 способен флуоресцировать в двух областях спектра, в зависимости от его локальной концентрации: при концентрациях JC-1, достигаемых в активных митохондриях, его молекулы агрегируют, образуя олигомерные структуры, флуоресцирующие в красной области спектра ($\lambda_{\max} = 590$ нм). При низкой локальной концентрации JC-1 происходит разрушение агрегатов красителя, что приводит к сдвигу максимума спектра флуоресценции в зеленую область ($\lambda_{\max} = 527$ нм).

Согласно данным рисунка 22 инкубация клеток MCF-7 с RL2 приводит к смещению максимума распределения клеток по интенсивности флуоресценции красителя DiOC₆ в сторону меньших интенсивностей (рисунок 22, а). При окраске MCF-7, обработанных RL2, JC-1, происходит накопление популяции клеток с пониженной флуоресценцией в красной области спектра (рисунок 22, б). Следовательно, оба флуорохромных индикатора дают возможность наблюдать уменьшение числа клеток с активными митохондриями в образцах, инкубированных с RL2

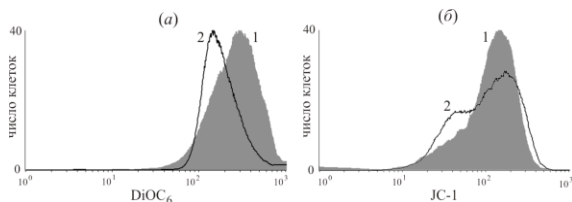


Рис. 22. Распределение клеток MCF-7, не обработанных RL2 (1), и после инкубации с RL2 (60 мкг/мл, 24 ч) (2) по интенсивности флуоресценции митохондриальных красителей DiOC6 (а) и JC-1 (б).

Эти данные позволяют сделать вывод, что апоптоз MCF-7, индуцируемый RL2, сопровождается диссипацией трансмембранного потенциала митохондрий.

В то же время по данным флуоресцентной микроскопии в нетрансформированных клетках MSC изменения спектра флуоресценции после обработки RL2 не происходит, что также указывает на то, что RL2 индуцирует апоптоз лишь в опухолевых клетках (рисунок 23).

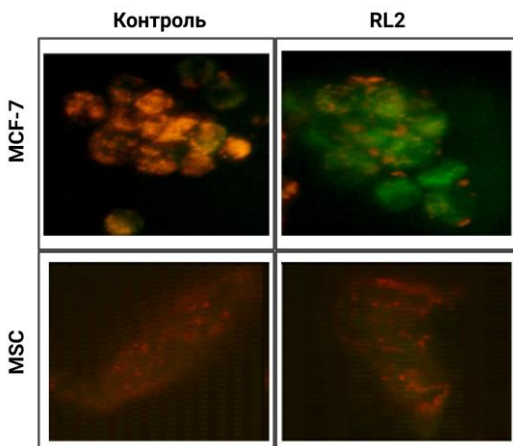


Рис. 23. Флуоресцентная микроскопия контрольных и инкубированных с RL2 (60 мкг/мл, 24 ч) клеток MCF-7 и MSC, окрашенных JC-1

Таким образом, представленные данные позволяют заключить, что действие RL2 на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 приводит к нарушению проницаемости внутренней ММ и активации апоптотического каскада по митохондриальному пути.

6.3. Активация инициаторных каспаз клеток MCF-7 под действием RL2

Известно, что при апоптозе происходит активация каскада субстрат-специфичных цистеиновых протеаз - каспаз. Выделяют 3 основных класса каспаз: инициаторные (каспазы-2,-8,-9,10), эффекторные (каспазы-3,-6,-7) и провоспалительные (каспазы-1,-4,-5,-13,-14). Основной функцией инициаторных каспаз является распространение апоптотического сигнала – активация эффекторных каспаз. Активация инициаторной каспазы-9 происходит при индукции апоптоза по митохондриальному пути, в то время как каспаза-8

активируется при апоптотической гибели клетки по рецептор-опосредованному пути.

Для оценки вклада инициаторных каспаз в процесс RL2-зависимой гибели клеток MCF-7 был проведен анализ накопления активных форм каспаз-8 и -9 в процессе инкубации с RL2 (12 - 72 ч) методом вестерн-блоттинга с антителами к соответствующим каспазам (рисунок 24).

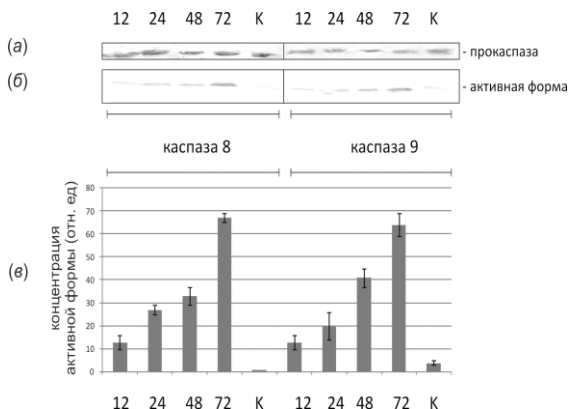


Рис. 24. Изменение уровня инициаторных каспаз в клетках MCF-7, инкубированных с RL2 (100 мкг/мл) 12, 24, 48 и 72 часа. Вестерн-блот; *а* – прокаспазы-8 и -9 в клетках, инкубированных с RL2, и в контрольных клетках (K); *б* – активные формы каспаз-8 и -9 в клетках, инкубированных с RL2, и в контрольных клетках (K); *в* – относительные интенсивности иммуноокраски белковых полос Вестерн-блота, соответствующих активным формам каспаз-8 и -9, определенные с помощью программы GelPro 5.0.

Из данных, представленных на рисунке 24, видно, что уже через 24 ч после добавления рекомбинантного аналога лактапина RL2 к клеткам MCF-7 детектируются активные формы как каспазы-8, так и каспазы-9. Накопление активных форм инициаторных каспаз-8 и -9 синхронно возрастает с увеличением времени инкубации клеток с RL2, что позволяет заключить, что инициаторные каспазы вовлечены в процесс гибели клеток MCF-7, индуцируемый аналогом лактапина. Поскольку активация инициаторных каспаз происходит синхронно, можно говорить об эквивалентности вкладов обеих каспаз в процесс индукции апоптоза MCF-7 под действием RL2.

Поскольку RL2 вызывает апоптотические изменения клеток, в которые в равной степени вовлечены каспаза-8 и каспаза-9, можно сделать вывод, что индукция апоптоза клеток MCF-7 под действием RL2 происходит как по митохондриальному, так и по рецептор-опосредованному пути.

6.4. Активация эффекторных каспаз, ДНКазы DFF40 и олигонуклеосомная фрагментация ДНК клеток MCF-7 под действием RL2

Известно, что клетки MCF-7 являются делеционным мутантом по гену *CASP3*, и в этих клетках отсутствует ключевой фермент апоптотического каскада – каспаза-3. Ранее было показано, что олигонуклеосомная фрагментация ДНК при апоптозе клеток MCF-7 осуществляется в результате активации эффекторной каспазы-7.

Анализ активации каспазы-7 проводили методом проточной цитофлуориметрии. Для этого использовали конъюгат необратимого

специфического ингибитора каспаз-3 и -7 Asp-Glu-Val-Asp-FMK с карбоксифлуоресцеином и окраску PI. Цистеин активного центра эффекторных каспаз ковалентно связывается с фторметилкетонной группой ингибитора (FMK), что приводит к накоплению флуоресцирующего конъюгата FAM-Asp-Glu-Val-Asp-FMK в клетках.

Анализ распределения по интенсивности флуоресценции красителей PI и FAM позволяет выделить три популяции клеток MCF-7 - P2, P3 и P4 (рисунок 25). Популяция P2 характеризуется низкой проницаемостью плазматической мембраны для PI и низким уровнем накопления FAM и представляет собой популяцию жизнеспособных клеток и апоптотических клеток с низким уровнем активации эффекторных каспаз. Популяция P3 характеризуется повышенным уровнем флуоресценции FAM, что является следствием активации эффекторных каспаз в апоптотических клетках. Популяция P4 характеризуется высокой проницаемостью цитоплазматической мембраны для PI и представлена нежизнеспособными клетками.

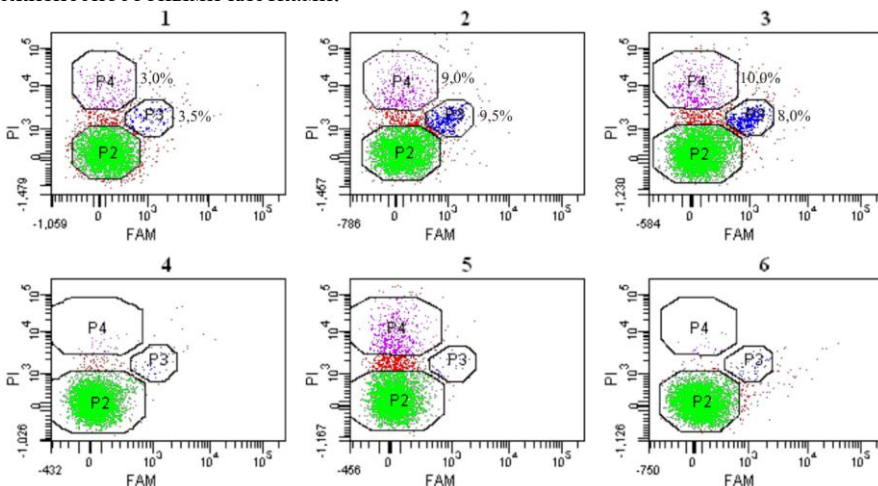


Рис. 25. Цитофлуориметрический анализ активности каспазы 7 в клетках MCF-7 под действием RL2 (100 мкг/мл, 48 ч); на диаграммах представлены распределения клеток по интенсивностям флуоресценции в красной (PI – пропидий йодид, $\lambda_{\max} = 619$ нм) и в зеленой (FAM – карбоксифлуоресцеин, $\lambda_{\max} = 530$ нм) областях; P2 – популяция PI-отрицательных клеток с неактивной каспазой-7, P3 – популяция клеток с активной каспазой-7, P4 – популяция некротических клеток; 1 – клетки MCF-7, окрашенные PI и FAM, 2 и 3 – клетки MCF-7, инкубированные с RL2 в течение 24 и 48 часов, соответственно, окрашенные PI и FAM; 4 – неокрашенные клетки MCF-7, 5 – клетки MCF-7, окрашенные PI, 6 – клетки MCF-7, окрашенные FAM.

Анализ субпопуляций (рисунок 23, диаграммы 1, 2 и 3) показал, что при инкубации клеток MCF-7 с RL2 в течение 24 ч происходит увеличение плотности популяции P3 с 3,5% до 9,5%. При инкубации MCF-7 с RL2 в течение

48 ч плотность субпопуляции P3 составила 8,0%. Плотность популяции P4 при инкубации клеток с RL2 в течение 0 ч, 24 ч, 48 ч изменялась от 3% до 9% и 10%, соответственно. Полученные данные позволяют предположить, что увеличение популяции нежизнеспособных клеток P4 при инкубации с RL2 связано с превращением апоптотических клеток популяции P3 в клетки популяции P4 с высокой проницаемостью цитоплазматической мембраны для PI.

Таким образом, действие RL2 на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 сопровождается активацией эффекторной каспазы-7. Следует отметить невысокий уровень активации каспазы-7 в проведенных экспериментах. Лишь в ~ 6% клеток можно достоверно детектировать повышения уровня фермента. Эти результаты подтверждают полученные ранее данные о том, что RL2-индуцируемый апоптоз клеток MCF-7 происходит при низком уровне активации каспазы-7. Кроме того, принимая во внимание тот факт, что на фоне низкой активации каспазы-7 происходит масштабная экспозиция фосфатитилсерина можно предположить, что эффекторные каспазы вносят незначительный вклад в апоптотические изменения клеток MCF-7 под действием RL2.

Далее мы определяли содержание активной формы каспазы-7 в клетках MCF-7, обработанных RL2, с использованием специфических моноклональных антител методом Вестерн-блот анализа. Известно, что активация эффекторной каспазы-7 осуществляется инициаторными каспазами-8 и -9 в две стадии. На первой стадии активации прокаспазы-7 расщепляется с образованием свободного продомена и неактивной каспазы-7 (p20-p11) с молекулярной массой 32 кДа. На втором этапе происходит специфический гидролиз p20-p11 с образованием большой и малой субъединиц каспазы-7 - 20 кДа (p20) и 11 кДа (p11), соответственно.

Из данных рисунка 26 видно, что после 48 ч инкубации клеток MCF-7 с RL2 происходит специфический гидролиз прокаспазы-7 с образованием неактивной формы p20-p11 и ее последующее расщепление, приводящее к появлению большой субъединицы p20 (Рис. 26.А).

Полученные результаты позволяют заключить, что действие RL2 на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 приводит к активации эффекторной каспазы-7.

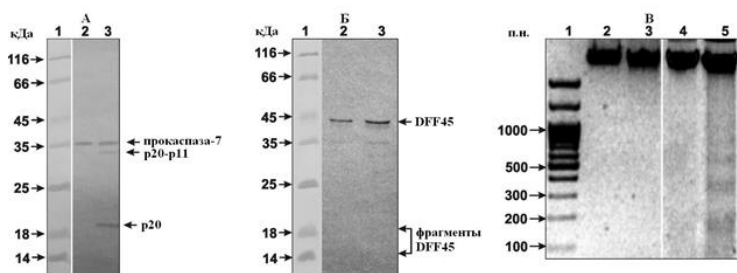


Рис. 26. **А** – Анализ активации прокаспазы-7 в клетках MCF-7, инкубированных с RL2 (100 мкг/мл, 48 ч), методом Вестерн-блоттинга. Дорожки: 1 – набор белков с известными молекулярными массами, 2 – клетки MCF-7, не обработанные RL2, 3 – клетки MCF-7, инкубированные с RL2; **Б** – Анализ протеолитического расщепления DFF45 в клетках MCF-7, инкубированных с RL2 (100 мкг/мл, 48 ч), методом Вестерн-блоттинга. Дорожки: 1 – набор белков с известными молекулярными массами, 2 – клетки MCF-7, не обработанные RL2, 3 – клетки MCF-7, инкубированные с RL2. **В** – Электрофоретический анализ продуктов олигонуклеосомной фрагментации ДНК клеток MCF-7 в 1,5% агарозном геле. Дорожки: 1 – набор фрагментов ДНК с известными молекулярными массами, 2 и 4 – геномная ДНК клеток MCF-7, не обработанных RL2, 3 и 5 – геномная ДНК клеток MCF-7, инкубированных с RL2(100 мкг/мл) 48 и 120 ч, соответственно

Известно, что одним из ключевых субстратов эффекторных каспаз является ингибитор ДНКазы DFF40 (DNA Fragmentation Factor 40) – DFF45. DFF40 представляет собой белок с молекулярной массой 40 кДа, состоящий из 338 аминокислотных остатков. В состав DFF40 входят 11 остатков цистеина, большая часть которых находится в тиольной форме. С-концевой участок DFF40 содержит большое число остатков аргинина и лизина, которые формируют центр узнавания нуклеинового субстрата. DFF40 обладает эндонуклеазной активностью и при апоптозе гидролизует двуцепочечную ДНК хромосом по межнуклеосомным участкам. В жизнеспособных клетках DFF40 экспрессируется в неактивной форме в комплексе с DFF45. При активации DFF40 происходит специфичный гидролиз DFF45 каспазой-3 или -7 по двум сайтам расщепления с образованием трех фрагментов с молекулярными массами 12, 12 и 11 кДа. Активированная DFF40 проникает в ядро клетки и гидролизует хромосомную ДНК с образованием олигонуклеосомных фрагментов.

Для определения уровня активации ДНКазы DFF40 был проведен Вестерн-блот анализ фрагментов протеолитической деградации ее ингибитора DFF45 с использованием специфических моноклональных антител. Из данных рисунка 26 видно, что инкубация клеток MCF-7 с RL2 в течение 48 ч не приводит к специфичному протеолизу DFF45, и, следовательно, к активации DFF40 (рис. 26, Б).

Возможно, нам не удалось детектировать протеолиз DFF45 в клетках MCF-7 при инкубации с RL2 в течение 48 ч как из-за отсутствия в клетках каспазы-3, так и из-за низкого уровня активации эффекторной каспазы-7, которая также может гидролизовать DFF45, в этой временной точке (рис. 25).

Для подтверждения/опровержения наличия олигонуклеосомной фрагментации ДНК в клетках под действием RL2 мы увеличили время инкубации MCF-7 с препаратом до 120 часов и провели анализ геномной ДНК клеток методом электрофореза в агарозном геле (рис. 26, В). Суммарную клеточную ДНК выделяли с помощью набора GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kits (Sigma-Aldrich). Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-RAD) на длине волны $\lambda=260$ нм.

Согласно полученным данным инкубация клеток MCF-7 с RL2 в течение 120 ч приводит к появлению гидролизованных фрагментов ДНК с молекулярной массой, соответствующей фрагментам 150 - 180 п.о., характерным для ДНК мононуклеосом (рис. 26, В). Такие фрагменты образуются при расщеплении хроматина по межнуклеосомным участкам ДНК., что подтверждает способность RL2 индуцировать апоптоз в онкотрансформированных клетках молочной железы.

Таким образом, установлено, что гибель клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, индуцируемая RL2, проходит с проявлением типичных признаков апоптоза: транслокацией фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны, диссипацией трансмембранного потенциала митохондрий клеток, активацией инициаторных каспаз-8 и -9 и эффекторной каспазы-7 и олигонуклеосомной фрагментацией ДНК.

7. Взаимодействие RL2 с клеточными структурами

В предыдущем разделе было показано, что RL2 индуцирует апоптоз по митохондриальному и рецептор-опосредованному пути. Важной задачей исследования являлся поиск клеточных структур, с которыми взаимодействует RL2 при индукции апоптоза. В первую очередь необходимо было выяснить, проникает ли RL2 внутрь клетки или связывается с молекулами-партнерами на клеточной поверхности.

7.1. Проникновение и локализация RL2 в клетках человека

Анализ локализации RL2 в клетках проводили методом флуоресцентной микроскопии на приборе In Cell (GE Healthcare) на культурах онкотрансформированных клеток MCF-7 и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека MSC. Клетки MSC использовали как контрольные, согласно ранее полученным данным эти клетки не чувствительны к онкотоксическому действию RL2. RL2 метили флуоресцентным красителем 5(6)-карбокситетраметилродамином. Ядра клеток окрашивали DAPI.

Из данных рисунка 27 видно, что конъюгат RL2 с карбокситетраметилродамином (RL2-Rho) проникает в цитоплазму как раковых клеток MCF-7, так и немалигнизированных клеток MSC. В качестве отрицательного контроля клетки MCF-7 и MSC обрабатывали раствором 5(6)-карбокситетраметилродамина, что не приводило к появлению флуоресценции, наблюдаемой при инкубации клеток с RL2-Rho (данные не представлены).

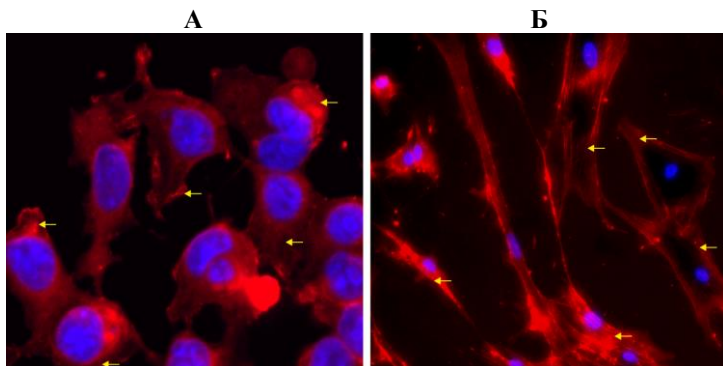


Рис. 27. Флуоресцентная микроскопия клеток, обработанных RL2-Rho, на приборе IN CELL (GE Healthcare). Ядра клеток окрашены DAPI. **А** – клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. **Б** – мезенхимальные стволовые клетки человека (MSC). Флуоресценция клеток в трех каналах: Cy3, FAM и DAPI. Стрелками отмечены области локализации RL2-Rho в клетках.

На рисунке видно, что распределение интенсивности флуоресценции RL2-Rho в цитоплазме неоднородно, конъюгат локализуется преимущественно вдоль цитоскелета клеток. Распределение интенсивности флуоресценции в клетках MSC, окрашенных RL2-Rho, сходно с распределением интенсивности флуоресценции стресс-фибрилярных структур. Похожее распределение наблюдают при анализе актинового цитоскелета, например, остеобластов.

Таким образом, RL2 проникает как в раковые клетки MCF-7, так и в немалигнизированные клетки MSC. Это доказывает, что цитотоксическая активность RL2 не связана со способностью избирательно проникать в онкотрансформированные клетки. Вопрос об избирательном действии RL2 на опухолевые клетки при индукции апоптоза до сих пор не решен. Кроме того, ранее было показано, что клетки различных опухолей, как мышиноного, так и человеческого происхождения, обладают разной чувствительностью к RL2.

Далее были исследованы возможные пути проникновения RL2 в клетку. Для этого оценивали влияние различных ингибиторов эндоцитоза на эффективность проникновения RL2-Rho. Клетки аденокарциномы молочной железы человека инкубировали в присутствии ингибитора эндоцитоза (30 минут) или без него, после чего добавляли RL2-Rho и инкубировали ещё 60 минут. RL2-Rho удаляли с поверхности клеток трипсином, и анализировали образцы клеток методом проточной цитофлуориметрии.

В качестве ингибиторов эндоцитоза использовали диназор как ингибитор динаминзависимых путей, хлорпромазин - как ингибитор клатринзависимого пути, нистатин и метил- β -циклодекстрин (M β CD) - для ингибирования путей эндоцитоза, опосредованных липидными рафтами, в том числе кавеолинзависимого пути. Цитохалазин D и 5-(N-этил-N-изопропил)амилорид (EIPA) применяли для ингибирования макропиноцитоза, а вортманнин

(ингибитор клеточных фосфоинозитид-3-киназ) для блокирования макропиноцитоза и фагоцитоза.

Было установлено, что из всех исследованных ингибиторов только нистатин и МβCD существенно снижают эффективность проникновения RL2-Rho в клетки (рисунок 28).

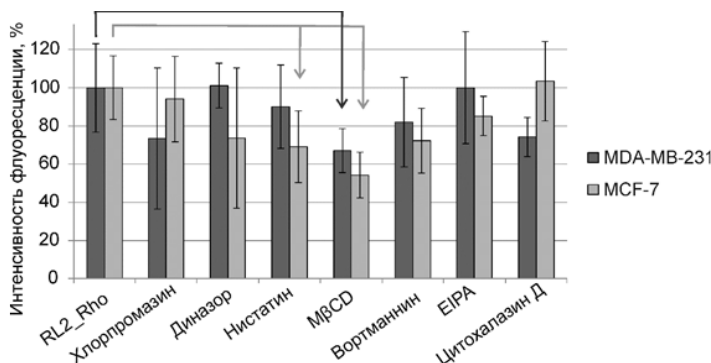


Рис.28. Влияние ингибиторов эндоцитоза на проникновение RL2-Rho (10 мкг/мл) в клетки MCF-7 и MDA-MB-231, инкубированные в среде RPMI, содержащей 5% FBS; стрелками отмечены достоверные изменения интенсивности флуоресценции, $p < 0.05$. Погрешность рассчитана, как стандартное отклонение от среднего.

Оба ингибитора подавляют пиноцитоз, опосредованный липидными рафтами, но механизмы действия этих препаратов отличаются. Нистатин образует крупные агрегаты с холестерином внутри плазматической мембраны, при накоплении которых происходит их экстракция из мембраны. МβCD – циклический гептасахарид с гидрофобной сердцевиной, которая имеет высокое сродство к холестерину. МβCD также образует комплексы с холестерином, однако эти комплексы имеют большую растворимость в липофильных условиях, что позволяет им оставаться в мембране.

Нистатин считают селективным ингибитором эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, тогда как для МβCD в высоких концентрациях показано влияние на другие процессы в клетке, например, на сборку цитоскелета и на активацию малых ГТФаз семейства Ras, участвующих в различных путях эндоцитоза.

Итак, ингибиторы эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, - МβCD и нистатин, частично ингибируют проникновение RL2-Rho в клетки.

При исследовании влияния азида натрия, который ингибирует синтез АТФ и блокирует все пути эндоцитоза, на эффективность проникновения RL2-Rho в опухолевые клетки было установлено, что азид натрия не способен полностью заблокировать проникновение конъюгата, что свидетельствует о существовании механизма проникновения RL2 в клетки, альтернативного эндоцитозу.

Анализ аминокислотной последовательности RL2 (рисунок 2) показывает, что в его состав входит 11 положительно заряженных аминокислотных остатков

(лизин, аргинин и гистидин) и 34 неполярных и гидрофобных аминокислотных остатка (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин и фенилаланин), что делают структуру этого пептида схожей со структурой некоторых пептидов CPP (Cell-penetrating Peptides). CPP отличаются способностью проникать внутрь эукариотической клетки без участия рецепторов, прямым проникновением через плазматическую мембрану.

Таким образом, полученные экспериментальные данные в совокупности с анализом первичной структуры RL2 позволяют заключить, что RL2 обладает свойствами CPP и проникает в клетку по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, и, вероятно, прямым проникновением через плазматическую мембрану.

7.2. Выделение и идентификация белков, взаимодействующих с RL2

Следующей важной задачей исследования было определение белковых молекул - мишеней рекомбинантного аналога лактапина RL2 в клетке. Для решения этой задачи клетки MCF-7 лизировали в буферном растворе с физиологической ионной силой и pH для сохранения нативной укладки белков. Лизат клеток подвергали аффинной хроматографии на колонке с сефарозой, на которую предварительно был иммобилизован RL2. Для исключения белков, неспецифически взаимодействующих с сорбентом, проводили хроматографию лизата клеток MCF-7 на сорбенте, не модифицированном RL2. Элюцию белков, связавшихся с сорбентом, проводили в изократическом режиме в буферных растворах с возрастающей ионной силой.

Белки хроматографических фракций разделяли электрофорезом в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Гель окрашивали раствором Кумасси R250 в стандартных условиях (рис. 29).

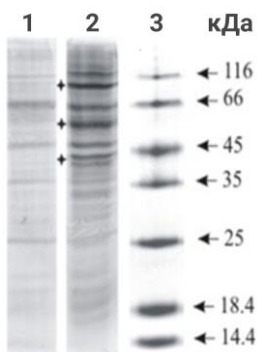


Рис. 29. Электрофореграмма белков фракций, полученных аффинной хроматографией лизата клеток MCF-7 на СН-сефарозе (дорожка 1) и на СН-сефарозе с иммобилизованным RL2 (дорожка 2). Дорожка 3 - набор белков с известными молекулярными массами. ПААГ, 12%. Белки, взятые для масс-спектропического анализа, помечены звездочкой

Белки, наиболее ярко прокрашенные в дорожке 2 геля и отсутствующие в контрольной фракции (дорожка 1), гидролизовали трипсином и анализировали. методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Анализ масс-спектров проводили с использованием программы FlexAnalysis 2.4., которая позволяет автоматически

регистрировать пики в масс-спектре с учетом максимумов изотопного распределения сигналов индивидуального иона.

Данные анализа сводили в таблицу, содержащую наблюдаемые характеристики максимумов моноизотопного распределения ионов: отношение массы иона к его заряду (m/z) (в условиях проведения MALDI-MS преимущественно образуются однозарядные ионы протонированных молекул) и величину ширины максимума на полувысоте, характеризующую разрешение прибора.

Продукты трипсинолиза белков с электрофоретической подвижностью в диапазоне 45 – 66 кДа были достоверно идентифицированы как фрагменты α и β цепей тубулина человека. Из них 8 пептидов являлись фрагментами α цепи тубулина α -1C (TBA1C_HUMAN) или тубулина α -1B (TBA1B_HUMAN); остальные пептиды являлись фрагментами β цепи тубулина β (TBB5_HUMAN) или тубулина β -4 (TBB4_HUMAN). Рассчитанные молекулярные массы α и β цепей тубулина составляют 50 кДа, что согласуется с наблюдаемой электрофоретической подвижностью исследуемого в образце белка. Тубулин – это белок, из которого построены микротрубочки. В микротрубочках, а также в цитоплазме клеток, тубулин находится в форме димера, состоящего из одной молекулы α - и одной молекулы β -тубулина.

При анализе масс-спектров пептидов, полученных при обработке трипсином белков с электрофоретической подвижностью в диапазоне 66 - 116 кДа, было установлено, что эти пептиды являются фрагментами белка α -актинина-1, который имеет молекулярную массу 102 кДа, является структурным белком актиновых филаментов и играет важную роль в формировании цитоскелета клетки.

Достоверно идентифицировать белки с электрофоретической подвижностью в диапазоне 35 - 45 кДа не удалось. Анализ масс-спектров этих образцов не привел к получению интерпретируемого результата. По-видимому, эти образцы представляют собой смесь белков с близкими молекулярными массами.

Таким образом, было показано, что RL2, иммобилизованный на колонке с СН-сефарозой, связывает α и/или β тубулин и α -актинин-1 лизата клеток MCF-7, что позволяет предположить, что при проникновении в клетку RL2 связывается с белками цитоскелета α и/или β тубулином и α -актинином-1. Полученные результаты подтверждают представленные выше данные флуоресцентной микроскопии о локализации конъюгата RL2 с карбокситетраметилпроламином (RL2-Rho) в клетках MCF-7 и MSC (рисунок 27). Связываясь с белками цитоскелета, RL2 может препятствовать формированию микротрубочек, индуцируя тем самым апоптоз в опухолевых клетках.

8. Модель механизма апоптотической гибели клеток MCF-7, индуцируемой RL2

В предыдущих разделах работы были установлены следующие факты:

1. RL2 эффективно проникает как в онкотрансформированные, так и в нормальные эукариотические клетки;

2. Внутри клетки RL2 взаимодействует с белками цитоскелета - α и/или β тубулином и α -актанином-1;

3. Проникновение RL2 в опухолевые клетки сопровождается транслокацией фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны;

4. RL2 вызывает диссипацию трансмембранного потенциала митохондрий клеток MCF-7 и активирует инициаторные каспазы-8 и -9, что приводит к активации эффекторной каспазы-7 и нуклеосомной фрагментации ядерной ДНК.

Все вышеперечисленные признаки убедительно указывают на то, что основным механизмом гибели клеток под действием RL2 является апоптоз.

Известно, что α -актинин-1 является структурным элементом актина, который, в свою очередь, тесно связан внутри клетки с интегриновыми рецепторами. При этом, утрата или избыток некоторых интегринов в опухолевых клетках сопряжены с высокой степенью злокачественности опухоли. Интегрины являются одной из потенциальных мишеней при разработке противоопухолевых препаратов. Можно предположить, что RL2, взаимодействуя с α -актанином-1, нарушает нормальное функционирование интегриновых рецепторов, что, в свою очередь, приводит к активации каспазы-8 и развитию апоптоза по рецептор-опосредованному пути.

Тубулин формирует элементы клеточного цитоскелета - микротрубочки. Известно, что тубулин является мишенью для ряда уже существующих противоопухолевых препаратов, например, таких как доцетаксел и паклитаксел. Препараты, связывающиеся с тубулинами, препятствуют формированию микротрубочек, нарушают их динамику, инициируют задержку клеточного цикла и апоптоз. Можно предположить, что взаимодействие RL2 с молекулами α и/или β -тубулина в составе микротрубочек приводит к высвобождению митохондриального проапоптотического фактора Bim в цитоплазму клетки. Накопление данного фактора в цитоплазме приводит к формированию митохондриальных пор. При этом из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль высвобождаются белки – индукторы апоптоза (цитохром c, белок AIF (apoptosis inducing factor — «фактор индуцирующий апоптоз»), флавопротеин). Вследствие этого происходит активация каспазы-9 и развитие апоптоза по митохондриальному пути. Происходящие процессы схематично изображены на рисунке 30.

На основании анализа полученных экспериментальных данных и анализа литературы предложен механизм индукции и развития апоптоза клеток MCF-7 под действием RL2 (рисунок 30).

Кратко процесс можно описать как следующую последовательность событий: RL2 проникает в цитоплазму клетки и взаимодействует с белками цитоскелета α , β - тубулином и α -актанином-1. Взаимодействие RL2 с α -актанином-1 приводит к дестабилизации и диссоциации адгезивных комплексов, в результате чего происходит активация инициаторной каспазы-8.

Независимо от этого процесса RL2 связывается с α , β -тубулином в составе микротрубочек, что ведет к высвобождению митохондриального

проапоптотического фактора Bim в цитоплазму клетки. Накопление данного фактора в цитоплазме приводит к формированию митохондриальных пор и активации инициаторной каспазы-9.

Далее инициаторные каспазы-8 и 9 активируют эффекторную каспазу-7, опосредующую апоптотическую гибель клетки. Таким образом, развитие апоптоза происходит как по рецептор-опосредованному, так и по митохондриальному пути.

При дальнейших исследованиях, которые не входят в данную работу, был выявлен ряд дополнительных факторов, приводящих к развитию апоптоза опухолевых клеток под действием RL2. На основании этих данных предложенная в настоящей работе схема была дополнена и уточнена [O.A. Koval et al. PLOS ONE, 2014], что принципиально не изменило предложенную модель.

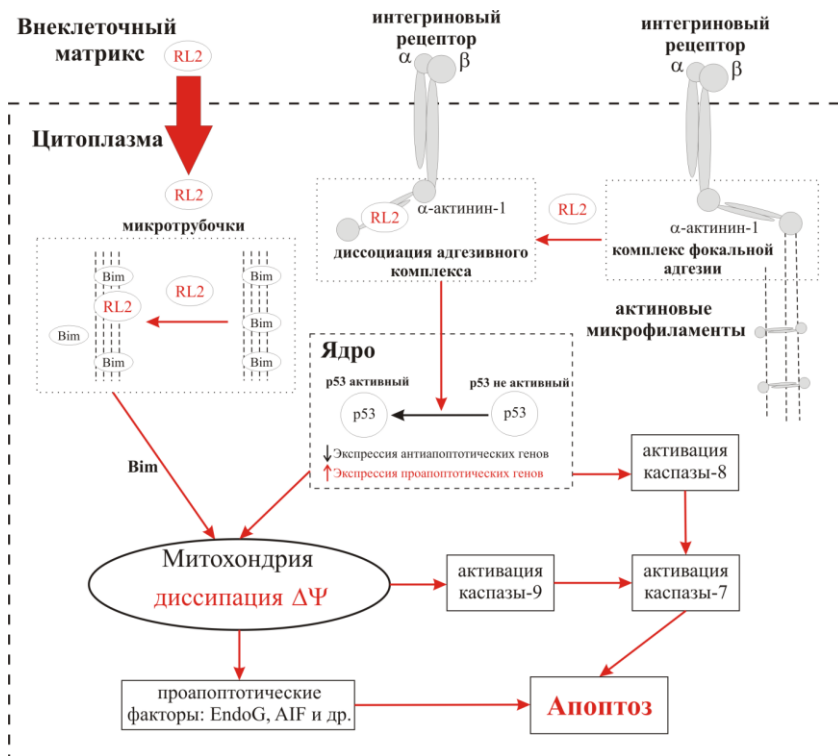


Рис. 30. Модель предполагаемого механизма апоптотической гибели клеток MCF-7, индуцируемой RL2.

Полученные данные по оценке цитотоксических свойств и противоопухолевой эффективности RL2, а также механизма действия пептида позволили сделать заключение о том, что RL2 являлся достойным кандидатом для разработки на его основе противоопухолевого препарата.

Следующий этап работы был посвящен разработке на основе RL2 противоопухолевого лекарственного препарата и проведению его доклинических исследований.

9. Доклинические исследования противоопухолевого препарата на основе RL2

На основе RL2 был разработан противоопухолевый препарат «Лактаптин», представляющий собой раствор RL2 с концентрацией 3 мг/мл в 0,9% NaCl.

Целью доклинического исследования было создание лекарственной формы и проведение исследований специфической активности, фармакокинетики и безопасности (общей токсичности и пирогенности) противоопухолевого препарата «Лактаптин».

В ходе доклинического исследования необходимо было решить следующие задачи:

- отработать технологию получения и разработать методы контроля качества фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы лекарственного средства «Лактаптин»;
- исследовать цитотоксическую активность фармацевтической субстанции на культурах онкотрансформированных клеток мыши (*in vitro*);
- изучить противоопухолевую эффективность «Лактаптина» на мышах с перевиваемыми опухолями (*in vivo*);
- исследовать антиметастатическую активность «Лактаптина» на мышах с перевиваемыми опухолями (*in vivo*);
- исследовать фармакокинетику «Лактаптина»;
- изучить цитотоксическую активность и механизм действия «Лактаптина» на культурах опухолевых клеток человека различного тканевого происхождения (*in vitro*);
- изучить противоопухолевую эффективность лекарственного средства на иммунодефицитных мышах с трансплантированными опухолями человека (*in vivo*);
- исследовать общетоксическое действие «Лактаптина» (общую токсичность, местнотканевые реакции, пирогенность);
- разработать систему биологической стандартизации и контроля качества фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы лекарственного средства по токсичности и пирогенности;
- разработать схему терапии онкологических заболеваний противоопухолевым лекарственным препаратом (дозы препарата, курс терапии, интервалы между курсами).

Результаты исследования противоопухолевой и антиметастатической активности «Лактаптина» описаны в предыдущих разделах настоящей работы.

Для фармакокинетических исследований RL2 были получены моноклональные антитела к этому пептиду и разработан метод двухцентрового ИФА для количественного определения RL2. Согласно разработанному методу предел обнаружения RL2 составил 7.0 нг/мл; линейный диапазон определяемых

концентраций RL2 при максимальной чувствительности - 7.0 – 40.0 нг/мл. Воспроизводимость метода, характеризуемая стандартным отклонением аналитического сигнала, находится в пределах 10.9 – 22.1%.

Исследования фармакокинетики RL2 на самцах белых беспородных мышей ICR показали, что препарат и/или его метаболиты в значительных количествах циркулируют в плазме крови животных. Период полувыведения ($T_{1/2}$) препарата составил 15,75 минут. Такой короткий период полувыведения характерен для многих пептидных и белковых препаратов, например, для ФНО α и ГМКСФ.

Исследование биораспределения S^{35} -меченого RL2 показало, что препарат равномерно распределяется по органам и тканям. Ожидаемым оказалось повышенное содержание препарата в почках (рис. 31).

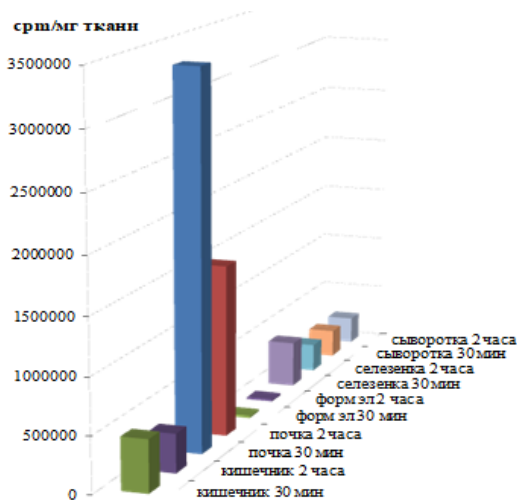


Рис. 31. Распределение S^{35} -меченого RL2 в органах и тканях мыши после однократного внутривенного введения

Исследование общетоксического действия «лактаптина» показало, что он является безопасным при однократном и многократном внутривенном введении животным. Все работы по изучению токсичности препарата были проведены в Лаборатории биологических испытаний Филиала ИБХ РАН, г. Пущино, имеющей международную лицензию на проведение доклинических исследований по стандарту GLP.

По результатам исследований фармакокинетики и общей токсичности препарата установлено, что при внутривенном курсовом введении RL2 особое внимание необходимо обратить на мониторинг показателей кроветворения и функции почек.

На основании результатов исследований на животных была определена доза препарата, близкая к максимально переносимой (МПД), и предложена возможная Схема терапии препаратом Лактаптин (рис. 32).

Следует отметить, что при проведении клинических исследований 1ой фазы – безопасность и переносимость лекарственного препарата, в первую очередь

необходимо определить максимально переносимую дозу лекарства для введения человеку. При этом стартовой дозой, с учетом коэффициента безопасности равного 10, будет являться доза, соответствующая 1/10 максимально переносимой дозы, определенной в доклинических исследованиях. В случае предполагаемого курсового применения лекарства необходимо определение МПД как при однократном, так и при курсовом введении.

Поскольку в экспериментах на животных показано, что увеличение дозы ведет к увеличению терапевтического эффекта, модификация представленной схемы должна происходить в направлении увеличения дозы однократного введения: от МПД/10 до МПД/2 и более в случае, если такое увеличение повышает клиническую эффективность



Рис. 32. Предварительная схема терапии препаратом «Лактаптин». Повтор цикла до трех раз.

Окончательную схему терапии можно разработать после проведения 1-ой фазы клинических исследований.

По результатам доклинических исследований нового противоопухолевого лекарственного средства «Лактаптин - концентрат для приготовления раствора для инфузий», получаемого из субстанции «Лактаптин – рекомбинантный аналог пептидов молока человека, субстанция (жидкость)» было сделано заключение о том, что препарат «Лактаптин» обладает специфической противоопухолевой и антиметастатической активностью, не оказывает выраженного токсического эффекта, является безопасным и может быть рекомендован для проведения клинических испытаний.

Результаты доклинического исследования противоопухолевого лекарственного средства «Лактаптин» и отчет о проведенных исследованиях хранится у разработчика лекарственного средства - ИХБФМ СО РАН, пр. Лаврентьева, 8, 630090, г. Новосибирск, Россия, тел. +7(383)3635152.

В доклинических исследованиях было показано, что несмотря на достаточно высокую противоопухолевую и антиметастатическую эффективность, RL2, как и большинство пептидных препаратов, имеет два существенных недостатка – короткий период полужизни в организме и равномерное распределение по органам и тканям. Для того, чтобы лактаптин мог эффективно реализовать свой

противоопухолевый потенциал необходимо использовать высокие концентрации препарата или увеличить таргетность лекарственного средства в отношении онкотрансформированных клеток.

10. Повышение противоопухолевой эффективности RL2 за счет увеличения его тропности к клеткам опухоли

Для повышения таргетности RL2 и его противоопухолевой эффективности были созданы рекомбинантные белки, представляющие собой фьюжн RL2 с опухоль-адресующими пептидами (слитые белки), обеспечивающими тропность полученных слитых белков к клеткам опухоли. Отбор опухоль-адресующих пептидов проводили методом фагового дисплея в системе *in vitro* на культурах раковых клеток мыши и человека и на опухолевых моделях алло- и ксенографтов *in vivo*. ДНК бактериофагов, связавшихся с опухолевыми клетками, выделяли и секвенировали. Затем методами генной инженерии создавали и клонировали последовательности, кодирующие слитые белки. На рисунке 33 представлена схема таких конструкций.

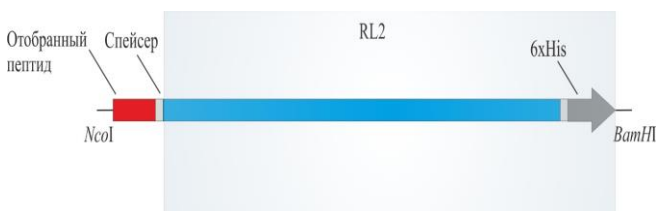


Рис. 33. Схема строения последовательности ДНК, кодирующей слитый белок, состоящий из опухоль-адресующего пептида и RL2.

Синтезированные таким образом белки имели на N-конце отобранный опухоль-адресующий пептид (первая аминокислота – метионин), и RL2 - на С-конце. В экспериментах *in vivo* было показано, что тропность к опухоли рекомбинантных слитых белков превосходила тропность RL2 в 2 - 5 раз. При этом присоединение адресующего пептида не снижало цитотоксическую активность RL2. Наибольшую противоопухолевую эффективность в отношении опухоли аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 продемонстрировал слитый пептид T3-RL2. Индекс торможения роста опухоли для T3-RL2 составил 80% против 37% для RL2 (рис. 34).

Мышам SCID с подкожно трансплантированными опухолями MDA-MB-231 проводили лечение белковыми препаратами RL2 и T3-RL2.

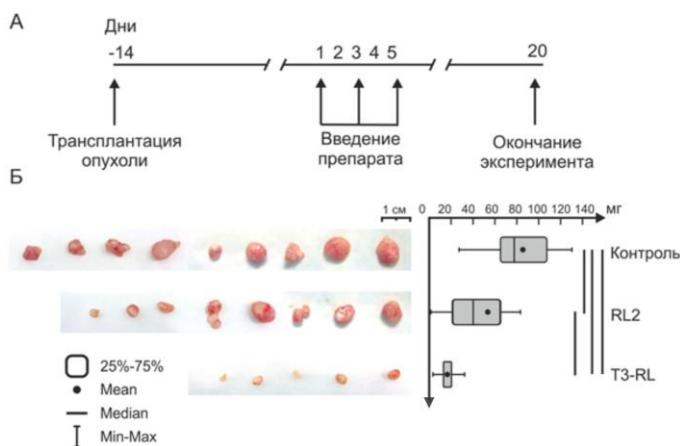


Рис. 34. Торможение роста опухоли MDA-MB-231 под действием слитых белков RL2-опухоль-адресующий пептид. А – Схема эксперимента; Б - Противоопухолевая эффективность RL2 и рекомбинантного слитого белка T3-RL2. Результаты измерения веса опухолей после окончания эксперимента представлены в виде диаграммы типа «ящик с усами». Ящик отражает 25-й, 50-й и 75-й процентиля. Планки отражают максимум/минимум. Черная точка означает среднее значение. Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера (Fisher LSD). Значение $p < 0.05$ рассматривали как статистически значимое.

Разработанный подход – создание слитых белков, состоящих из опухолю-адресующего и цитотоксического пептидов, показал свою жизнеспособность и может быть использован для повышения противоопухолевой эффективности других разрабатываемых белковых препаратов.

Заключение

Терапевтические препараты белковой и пептидной природы в настоящее время крайне редко применяются при лечении онкологических заболеваний человека. Исключение составляют противоопухолевые моноклональные антитела, которые с высокой избирательностью уничтожают опухолевые клетки, оказывая минимальное токсическое воздействие на нормальные клетки органов и тканей. Тем не менее, применение этих препаратов недостаточно эффективно решает вопросы увеличения общей выживаемости и повышения качества жизни онкологических пациентов.

В настоящей работе описан принципиально новый, ранее неизвестный, онкотоксический пептид – лактаптин, и представлены все этапы его разработки: выделение из молока человека, очистка, характеристика, создание генно-инженерных аналогов, исследование структуры и функций наиболее перспективного рекомбинантного аналога RL2, создание на основе RL2

противоопухолевого препарата «Лактаптин» и проведения доклинических исследований разработанного препарата.

Обнаруженный в женском молоке цитотоксический пептид был очищен до гомогенного состояния, и было установлено, что молекулярная масса пептида составляет 8606.5 ± 0.5 Да, и он является фрагментом каппа-казеина. Показано, что пептид индуцирует апоптоз онкотрансформированных клеток человека и млекопитающих. Учитывая происхождение пептида и его способность индуцировать апоптоз, пептид был назван **лактаптином**.

Было сконструировано 7 генно-инженерных аналогов лактаптина. Один из аналогов - RL2 по своим цитотоксическим свойствам был наиболее близок к природному лактаптину. Этот пептид был выбран для дальнейших исследований и разработки на его основе противоопухолевого лекарственного препарата.

Исследование структуры RL2 показало, что он является нестрого упорядоченным пептидом, способным в мембраноподобных средах и при нагревании в физиологическом растворе образовывать α -спираль в районах с 9 по 12 и/или с 35 по 42 а.о. Полученные экспериментальные данные в совокупности с анализом первичной структуры RL2 позволяют заключить, что RL2 обладает свойствами CPP и проникает в клетку по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, и, вероятно, прямым проникновением через плазматическую мембрану.

Установлено, что RL2 проникает как в нормальные, так и в онкотрансформированные клетки, но индуцирует апоптоз лишь опухолевых клеток. Полученные данные позволяют заключить, что при проникновении в клетку RL2 связывается с белками цитоскелета α и/или β тубулином и α -актинином-1. Цитотоксическое действие RL2 показано для опухолевых клеток человека различного гистогенеза. Предложена модель индукции апоптотической гибели клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 под действием RL2.

В экспериментах *in vivo* показано, что RL2 эффективно тормозит развитие опухолей животных и человека различного тканевого происхождения и ингибирует образование и развитие метастазов.

На основе RL2 разработан лекарственный препарат «Лактаптин» и проведены его доклинические исследования. Доказана противоопухолевая эффективность препарата и его безопасность при однократном и многократном внутривенном введении животным.

Продемонстрирована возможность повышения противоопухолевой эффективности «Лактаптина» путем присоединения к активной терапевтической молекуле опухоль-адресующего пептида, обеспечивающего специфическое взаимодействие препарата с опухолевыми клетками.

Разработанный препарат может рассматриваться в качестве одного из перспективных противоопухолевых лекарственных средств, которое может быть использовано как в режиме монотерапии, так и в комбинации с другими противоопухолевыми агентами.

ВЫВОДЫ

1. Из молока человека выделен пептид с молекулярной массой 8606.5 ± 0.5 Да, индуцирующий апоптоз онкотрансформированных клеток. Установлено, что пептид является фрагментом каппа-казеина. Пептид был назван **лактаптином**.
2. Сконструировано 7 генно-инженерных аналогов лактаптина. Установлено, что аналог RL2 по своим цитотоксическим свойствам наиболее близок к природному лактаптину. По результатам исследований RL2 был выбран для разработки на его основе противоопухолевого лекарственного препарата.
3. Установлено, что RL2 является нестрогим упорядоченным пептидом, способным в мембраноподобных средах и при нагревании в физиологическом растворе образовывать α -спираль в районах с 9 по 12 и/или с 35 по 42 а.о.
4. Показано, что RL2 обладает свойствами CPP и проникает в клетку как по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, так и прямым проникновением через плазматическую мембрану. При проникновении в клетку RL2 связывается с белками цитоскелета α и/или β тубулином и α -актинином-1.
5. RL2 проникает как в нормальные, так и онкотрансформированные клетки, но индуцирует апоптоз лишь опухолевых клеток. При этом регистрируются следующие признаки апоптотического процесса: транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны, диссипация трансмембранного потенциала митохондрий, активация инициаторных каспаз-8 и -9 и эффекторной каспазы-7 и олигонуклеосомная фрагментация ДНК. Таким образом, RL2 индуцирует апоптоз опухолевых клеток как по рецептор-опосредованному, так и по митохондриальному пути.
6. Предложена модель индукции апоптотической гибели клеток MCF-7 под действием RL2.
7. В экспериментах *in vivo* установлено, что RL2 эффективно (более чем в 2 раза) тормозит развитие опухолей животных и человека различного гистогенеза, а также эффективно (примерно в 3 раза) ингибирует образование метастазов на модели гепатокарциномы HA-1 мыши.
8. На основе RL2 разработан лекарственный препарат «Лактаптин» и проведены его доклинические исследования. Доказана противоопухолевая

эффективность препарата и его безопасность при однократном и многократном внутривенном введении животным.

9. Присоединения к RL2 опухоль-адресующего пептида T3 позволяет увеличить противоопухолевую эффективность препарата более чем в два раза - индекс торможения роста опухоли для слитого белка T3-RL2 составил 80% против 37% для RL2.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

Патенты:

1. Власов В.В., **Рихтер В.А.**, Семенов Д.В., Некипелая В.В., Кулигина Е.В., Потапенко М.О. Пептид, обладающий апоптотической активностью по отношению к раковым клеткам человека. Патент РФ № 2317304 от 20.02.2008.

2. Тикунова Н.В., Семенов Д.В., Бабкина И.Н., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Фомин А.С., Матвеева В.А., Матвеев А.Л., Матвеев Л.Э., **Рихтер В.А.** Рекombинантная плазмидная ДНК рFK2, обеспечивающая синтез рекомбинантного пептида, являющегося аналогом каппа-казеина человека, и рекомбинантный пептид, аналог фрагмента каппа-казеина человека, обладающий апоптотической активностью по отношению к раковым клеткам. Патент РФ № 2401307 от 10.10.2010.

3. Матвеев Л.Э., Матвеев А.Л., Семенов Д.В., Фомин А.С., Кулигина Е.В., Матвеева В.А., Тикунова Н.В., Бабкина И.Н., **Рихтер В.А.** Штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus. Musculus*, продуцирующий моноклональные антитела, специфичные к пептиду, обладающему апоптотической активностью по отношению к раковым клеткам человека. Патент РФ № 2402605. 27.10.2010.

4. Коваль О.А., Каледин В.И., Кулигина Е.В., Семенов Д.В., Фомин А.С., Потапенко М.О., **Рихтер В.А.** Способ лечения опухолей у млекопитающих. Патент RU 2461566 от 20.09.2012.

5. Потапенко М.О., Савельева А.В., Фомин А.С., Трошкова Г.П., Коваль О.А., Кулигина Е.В., Семенов Д.В., **Рихтер В.А.** Рекombинантная плазмидная ДНК рFK3, обеспечивающая синтез рекомбинантного пептида RL3, являющегося аналогом фрагмента каппа-казеина человека, рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue/pFK3 и рекомбинантный пептид RL3 - аналог фрагмента каппа-казеина человека, обладающий апоптотической активностью по отношению к раковым клеткам. Евразийский патент №023387 от 08.10.2012.

6. Потапенко М.О., Савельева А.В., Фомин А.С., Трошкова Г.П., Коваль О.А., Кулигина Е.В., Семенов Д.В., **Рихтер В.А.** Рекombинантная плазмидная ДНК рFK4, обеспечивающая синтез рекомбинантного пептида, являющегося аналогом фрагмента каппа-казеина человека, рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue/pFK4 и рекомбинантный пептид - аналог фрагмента

каппа-казеина человека, обладающий апоптотической активностью по отношению к раковым клеткам. Евразийский патент №023475 от 08.10.2012.

7. Васькова А.А., Кулигина Е.В., Макарьцова А.А., Коваль О.А., **Рихтер В.А.** Опухоль-специфический пептид для адресной химиотерапии опухолей молочной железы человека. Патент РФ № 2595404 от 03.08.2016.

8. Немудрая А.А., Кулигина Е.В., Коваль О.А., **Рихтер В.А.**, Степанов Г.А. Рекombинантная плазмидная ДНК рЕТ-15b_T1_RL, обеспечивающая синтез рекомбинантного слитого белка, состоящего из опухоль-специфического пептида и противоопухолевого пептида RL2, и рекомбинантный слитый белок, обладающий цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам и таргетными свойствами к опухолевой ткани Патент RU 2619050 от 16.03.2016.

9. Немудрая А.А., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Савельева А.В., Макарьцова А.А., **Рихтер В.А.** Рекombинантная плазмидная ДНК рЕТ-15b_T3_RL, обеспечивающая синтез рекомбинантного слитого белка, состоящего из опухоль-специфического пептида и противоопухолевого пептида RL2, и рекомбинантный слитый белок, обладающий противоопухолевой активностью по отношению к раку молочной железы человека. Патент RU 2619053 от 25.05.2016.

Публикации в рецензируемых журналах

1. Manko N., Starykovych M., Bobak Y., Stoika R., **Richter V.**, Koval O., Lavrik I., Horák D., Souchelnyskiy S., Kit Y. The purification and identification of human blood serum proteins with affinity to the antitumor active RL2 lactaptin using magnetic microparticles. // Biomedical Chromatography. – 2019. – V. 33. - Issue 11, e4647. doi: 10.1002/biof.1473

2. Chinak O.A., Patrakova E.A., Pyshnaya I.A., Stepanov G.A., Zhuravlev E.S., **Richter V.A.**, Koval O.A. Nucleic Acids Delivery Into the Cells Using Pro-Apoptotic Protein Lactaptin // Front. Pharmacol. – 2019. – V. 10. – P. e1043. doi: 10.3389/fphar.2019.01043.

3. Chinak O.A., Shernyukov A.V., Ovcherenko S.S., Sviridov E.A., Golyshev V.M., Fomin A.S., Pyshnaya I.A., Kuligina E.V., **Richter V.A.**, Bagryanskaya E.G. Structural and Aggregation Features of a Human κ -Casein Fragment with Antitumor and Cell-Penetrating Properties // Molecules. – 2019. – V. 24. – N. 16. – P. e2919. doi: 10.3390/molecules24162919.

4. Savelyeva A.V., Nemudraya A.A., Podgornyi V.F., Laburkina N.V., Ramazanov Y.A., Repkov A.P., Kuligina E.V., **Richter V.A.** Analysis of the efficiency of recombinant E. coli strain cultivation in a gas-vortex bioreactor. Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2016. doi: 10.1002/bab.1527

5. Чинак О.А., Фомин А.С., Нуштаева А.А., Коваль О.А., Савельева А.В., Кулигина Е.В., **Рихтер В.А.** Проникновение пептида лактаптина в раковые клетки человека // Биоорганическая химия. – 2016. – Т. 42. – № 4. – С. 401–410. doi: 10.7868/S0132342316040060.

6. Nemudraya, A.A., Kuligina, E.V., Ilyichev, A.A., Koval, O.A., **Richter, V.A.**

Selection of antitumor displayed peptides for the specific delivery of the anticancer drug lactaptin. // *Oncology Letters*. – 2016. V. 12. - № 6. P. 4547–4555. doi: 10.3892/ol.2016.5266.

7. Nemudraya, A.A., Makartsova, A.A., Fomin, A.S., **Richter, V.A.**, Kuligina, E.V. Tumor-specific peptide, selected from a phage peptide library, enhances antitumor activity of lactaptin. // *PLoS ONE*. – 2016. - 11(8): e0160980. doi: 10.1371/journal.pone.0160980.

8. Nemudraya, A.A., **Richter, V.A.**, Kuligina, E.V. Phage peptide libraries as a source of targeted ligands. // *Acta Naturae*. – 2016. - V. 8. № 1. - P. 48 – 57.

9. **Richter V.A.**, Vaskova A.A., Koval O.A., Kuligina E.V. Antitumor Potential of Lactaptin. // *Biology and medicine*. – 2015. - V. 7. - № S6. - P. S6. doi: 10.4172/0974-8369.S2-004.

10. Бондаренко Д.А., **Рихтер В.А.**, Кулигина Е.В., Коваль О.А., Фомин А.С., Скоблов Ю.С., Дьяченко И.А., Кравченко И.Н., Садовникова Е.А., Семушина С.Г., Новикова Н.И., Туробов В.И., Мурашев А.Н. Исследование токсичности и фармакокинетики препарата "Лактаптин". *Биофармацевтический журнал* 2015. - Т. 7. - № 2. - С. 40 – 47.

11. Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S., Semenov D.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Zavjalov E.L., **Richter V.A.** Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts. // *PLoS One*. – 2014 - Apr 7; 9(4):e93921. doi: 10.1371/journal.pone.0093921.

12. Фомин А.С., Матвеев Л.Э., Матвеева В.А., **Рихтер В.А.** Получение моноклональных антител к противоопухолевому пептиду лактаптину. // *Биофармацевтический журнал*. – 2013. - Т. 5. - № 5. - С. 38 – 43.

13. Koval O.A., Fomin A.S., Kaledin V.I., Semenov D.V., Potapenko M.O., Kuligina E.V., Nikolin V.P., Nikitenko E.V., **Richter V.A.** A novel pro-apoptotic effector lactaptin inhibits tumor growth in mice models. // *Biochimie*. - 2012 Dec; 94(12). – P. 2467 - 2474. doi:10.1016/j.biochi.2012.08.017.

14. Фомин А.С., Коваль О.А., Семенов Д.В., Потапенко М.О., Кулигина Е.В., Кит Ю.Я., **Рихтер В.А.** Анализ биохимических маркеров апоптоза клеток MCF-7, индуцируемого рекомбинантным аналогом лактапина. // *Биоорганическая химия*. – 2012. – Т. 38. - № 1, С. 1–7.

15. Фомин А.С., Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Коваль О.А., Бабкина И.Н., Тикунова Н.В., Матвеева В.А., Матвеев Л.Э., **Рихтер В.А.** Генно-инженерные аналоги потенциального противоопухолевого пептида лактапина. // *Вестник НГУ*, - 2010, - Т. 8. - В. 1, С. - 17 – 25.

16. Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V., Koval O.A., Matveeva V.A., Babkina I.N., Tikunova N.V., **Richter V.A.** Recombinant analogs of a novel milk pro-apoptotic peptide, lactaptin, and their effect on cultured human cells. // *Protein J*. - 2010 Apr;29(3) – P. 174 - 180. doi: 10.1007/s10930-010-9237-5.

17. Некипелая В.В., Семенов Д.В., Потапенко М.О., Кулигина Е.В., Кит Ю.Я., Романова И.В., **Рихтер В.А.** Лактаптин – белок человеческого молока,

индуцирующий апоптоз клеток аденокарциномы MCF-7. Доклады РАН. - 2008. - Т. 419.- № 5. - С. 268-271.

18. Semenov D.V., Aronov P.A., Kuligina E.V., Potapenko M.O., **Richter V.A.** Oligonucleosome DNA fragmentation of caspase 3 deficient MCF-7 cells in palmitate-induced apoptosis. // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. – 2004 - Oct; 23(6-7) – P. 831 - 836. doi: 10.1081/NCN-200026024.

19. Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Аронов П.А., Потапенко М.О., **Рихтер В.А.** Олигонуклеосомная фрагментация ДНК клеток MCF-7 при апоптозе, индуцированном пальмитатом Na. // Биохимия. - 2003. - Т. 68.- № 12. - С. 1657-1665.

20. Кит Ю.Я., Кулигина Е.В., Романникова И.В., Семенов Д.В., **Рихтер В.А.**, Власов В.В. В препаратах человеческого α -лактальбумина, индуцирующих апоптоз трансформированных клеток, присутствуют рибоолигонуклеотиды // Доклады РАН. – 1998. - Т. 360. - № 3. - С. 406 - 408.