

## Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2018  
УДК 618.19-006

Вопросы онкологии, 2018. Том 64, № 1

И.А. Замулаева<sup>1</sup>, О.Н. Матчук<sup>1</sup>, К.А. Чурюкина<sup>1</sup>, Н.В. Орлова<sup>1</sup>, Н.Г. Яббаров<sup>1</sup>,  
Е.Д. Никольская<sup>1</sup>, С.А. Макаренко<sup>1</sup>, А.В. Матвеев<sup>1</sup>, О.А. Жунина<sup>2</sup>, И.Г. Кондрашева<sup>2</sup>,  
Е.С. Северин<sup>2</sup>

**Противоопухолевая активность конъюгатов доксорубицина  
с дендритными полимерами второго поколения и векторным белком  
в модельных системах *in vitro* и *in vivo***

<sup>1</sup>Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск  
<sup>2</sup>АНО «Институт молекулярной диагностики», Москва

В рамках разработки системы избирательного транспорта противоопухолевых препаратов в клетки-мишени исследована противоопухолевая активность доксорубицина (Докс), его конъюгатов с дендритным полимером второго поколения (G2-Докс) и векторным белком (рекомбинантным третьим доменом альфа-фетопротейна — 3D-G2-Докс) в условиях *in vitro* и *in vivo*. Объектом исследования являлись клетки рака молочной железы двух линий MCF-7 и MCF-7/MDR1, различающиеся по химиочувствительности, а также мышьяная меланома линии B16. В работе продемонстрирована противоопухолевая активность G2-Докс и 3D-G2-Докс в условиях *in vivo* в отношении меланомы B16, а также в условиях *in vitro* в отношении химиорезистентных клеток MCF-7/MDR1, экспрессирующих Р-гликопротеин. При этом эффективность противоопухолевого действия G2-Докс и 3D-G2-Докс не отличалась от таковой при использовании свободного Докс. Однако для химиочувствительной линии MCF-7 более эффективным препаратом оказался свободный Докс. Важно, что в нормальных клетках, выделенных из костного мозга, селезенки и печени мышей, изучаемые конъюгаты, и особенно 3D-G2-Докс, накапливались значительно слабее, чем свободный Докс. Полученные данные позволяют полагать, что основная польза от возможного использования таких конъюгатов может быть связана со снижением токсического действия Докс на нормальные ткани и органы.

**Ключевые слова:** доксорубицин, дендримеры, альфа-фетопротейн, опухолевые клетки, рак молочной железы человека, меланома мыши, MCF-7, MCF-7/MDR1, B16

Направленная доставка противоопухолевых препаратов (ПП) в клетки-мишени является

одним из наиболее эффективных способов совершенствования химиотерапии онкологических больных. Несомненные успехи, достигнутые в этой области в последние годы, обосновывают необходимость дальнейшей разработки новых способов такой доставки, основанных на понимании молекулярных особенностей опухолевых клеток [7]. Среди разнообразных возможностей, которые открываются в связи со стремительным развитием молекулярной онкологии, перспективным является использование дендритных полимеров в качестве наноконтейнеров для ПП и онкофетального белка альфа-фетопротейна (АФП) в качестве векторной молекулы, обеспечивающей специфическое связывание с опухолевыми клетками. Как известно, рецепторы АФП обнаружены в клетках злокачественных новообразований различной локализации, но не в нормальных клетках [3]. В связи с этим лиганды АФП рецептора (полноразмерный белок АФП или его фрагмент) могут быть использованы в качестве вектора для адресной доставки ПП в опухолевые клетки с целью повышения селективности и эффективности их действия. В частности, рецепторы АФП экспрессируются на поверхности опухолевых клеток стабильных линий, использованных в данной работе (линий MCF-7 и MCF-7/MDR1 рака молочной железы человека, а также линии B16 меланомы мыши).

Дендритные полимеры (дендримеры) характеризуются строго контролируемой структурой, определенным молекулярным весом, монодисперсностью, биосовместимостью, а также возможностью контроля их биоразложения [6]. Дендримеры обладают древовидно-ветвящейся структурой и состоят из ядра, которое является центром ветвления, отдельных ветвей и концевых химических групп. Ковалентное связывание лекарственных препаратов с поверхностными группами дендримера позволяет ввести в молекулу достаточно большие количества лекарственного

препарата. В то же время, используя специальные сшивающие агенты, можно контролировать высвобождение препарата из конъюгата. Гидролиз таких линкеров проходит под воздействием специфических условий (кислые значения pH или присутствие специфических протеаз), что приводит к быстрому внутриклеточному высвобождению лекарственного препарата, сохраняющего исходную структуру. В такие комплексы, помимо препарата, за счет большого количества терминальных химических групп можно вводить векторные молекулы, обеспечивающие доставку препарата в клетки-мишени.

В данной работе в качестве ПП выбран доксорубин (Докс), который входит в традиционные схемы лечения злокачественных опухолей различной локализации, включая рак молочной железы, и в последнее время часто используется для экспериментальной разработки новых средств лечения меланомы на основе различных наночастиц, конъюгированных с Докс. В качестве наноконтейнеров для доставки Докс в опухолевые клетки использованы полиамидаминовые дендримеры второго поколения (G2), конъюгированные с Докс (G2-Докс) и рекомбинантным третьим доменом (3D) АФП, который сохраняет способность полноразмерного природного АФП человека взаимодействовать с соответствующим рецептором и накапливаться в опухолях (3D-G2-Докс) [9]. Ранее мы продемонстрировали особенности накопления и выведения свободного Докс и указанных конъюгатов из клеток двух линий рака молочной железы человека, различающихся по чувствительности к ПП (MCF-7 и MCF-7/MDR1) [1]. Последняя линия характеризуется высокой экспрессией Р-гликопротеина (ABCB1) и связанной с этим резистентностью к Докс. Результаты экспериментов, проведенных в условиях *in vitro*, свидетельствовали о быстром накоплении G2-Докс и 3D-G2-Докс в клетках обеих линий (при этом свободный Докс накапливался менее эффективно). Однако динамика выведения из клеток этих препаратов различалась, в результате чего после 24-часовой инкубации в среде без препаратов содержание Докс в клетках чувствительной линии MCF-7 было максимальным в случае свободного Докс, а в клетках резистентной линии MCF-7/MDR1, наоборот, — в случае изученных конъюгатов и, особенно, 3D-G2-Докс. Поэтому можно было предположить, что цитотоксическое действие G2-Докс и 3D-G2-Докс будет выражено сильнее в химиорезистентных, чем химиочувствительных клетках (очевидно, для последних наилучшим цитотоксическим агентом, как предполагалось, будет свободный Докс). В данной работе проведена проверка этого предположения и, кроме того, в условиях *in vivo* изучена

противоопухолевая активность этих препаратов в отношении меланомы В16, рекомендуемой для доклинического исследования ПП [4].

Другим важным обязательным свойством разрабатываемых систем направленной доставки ПП в опухолевые клетки является их минимальное накопление в нормальных клетках/тканях. Ранее в условиях *in vitro* мы показали, что 3D-G2-Докс практически не накапливается в нормальных клетках (лимфоцитах периферической крови здоровых доноров) в отличие от свободного Докс [1]. В данной работе продолжалось исследование процессов накопления конъюгатов G2-Докс и 3D-G2-Докс (в сравнении со свободным Докс) в клетках нормальных тканей и органов, но уже в условиях *in vivo* (в организме экспериментальных животных).

Таким образом, целью данного исследования является выяснение противоопухолевой активности конъюгатов дендримеров G2 с Докс и векторным белком в различных экспериментальных условиях и завершение работы по оценке их накопления в нормальных клетках.

## Материал и методика

*Культивирование клеток рака молочной железы, оценка цитотоксического действия препаратов in vitro*

Материалом для исследования являлись клетки аденокарциномы молочной железы человека двух линий (MCF-7 и MCF-7/MDR1), культивируемые по стандартной методике в полной питательной среде DMEM (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, USA). В предварительных экспериментах с помощью метода иммуноцитохимии было продемонстрировано наличие рецепторов АФП на поверхности опухолевых клеток обеих использованных линий. Клеточные культуры в логарифмической стадии роста инкубировали с препаратами Докс (свободным Докс, G2-Докс и 3D-G2-Докс) в концентрации 2,5 мкМ по Докс в среде DMEM без сыворотки в течение 2 часов. Далее среду с препаратами удаляли, к клеткам приливали полную питательную среду с сывороткой и культивировали ещё 24 часа, после чего клетки снимали с подложки в 0,01M фосфатный буфер (PBS, pH 7,2) и определяли их количество во флаконах с помощью камеры Горяева. Опыты с каждой из клеточных линий были повторены трижды.

Для оценки жизнеспособности клеток после инкубации с изучаемыми препаратами использовали МТТ-тест, основанный на способности дегидрогеназ митохондрий живых клеток превращать желтый водорастворимый тетразолиевый краситель (МТТ) в красный формазановый продукт, растворимый в диметилсульфоксиде (ДМСО). Оптическая плотность получаемого раствора пропорциональна биомассе клеток и их митохондриальной активности. Для МТТ-теста клетки рассевали в 96-луночные планшеты (Corning Costar, США). Через сутки после посева добавляли изучаемые препараты в концентрации 2,5 мкМ по Докс. Инкубировали с препаратами в течение 2 часов, после чего среду с препаратами удаляли, приливали полную питательную среду, в которой культивировали клетки в течение 72 ч. Затем выполняли МТТ-анализ по стандартной методике. Окраску регистрировали при длине волны более 545 нм на микропланшетном фотометре STAT FAX 2100 (Awareness Tech. Inc., США). Жизнеспособность клеток после инкубации с

препаратами измеряли в относительных единицах оптической плотности полученного раствора, затем рассчитывали в процентах от контроля, принятого за 100%.

*Культивирование клеток мышинной меланомы, анализ противоопухолевой активности препаратов in vivo*

Клетки меланомы линии В16 культивировали по стандартной методике в полной питательной среде DMEM (Пан-Эко, РФ) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США). Предварительно с помощью метода иммуноцитохимии было показано наличие рецепторов АФП на поверхности опухолевых клеток этой линии. Для трансплантации в организм мышей использовали опухолевые клетки в логарифмической стадии роста. Клетки снимали с подложки в среду DMEM, затем вводили внутримышечно в заднюю правую лапу мышей линии С57В1/6 (самки, возраст 1,5 мес.) по 200 тыс. клеток в объёме 0,1 мл.

В экспериментах использовали свободный Докс (Sigma, США) и конъюгаты G2-Докс, 3D-G2-Докс, полученные как описано ниже. Препараты вводили внутривенно, с интервалом в 7 суток в концентрации 7,5 мг/кг по Докс, начиная с 9 суток после трансплантации опухолевых клеток. Через каждые 2-3 суток после начала введения препаратов выполняли измерение линейных размеров опухолевого очага, по которым рассчитывали объём опухоли. В каждой из экспериментальных групп использовали по 6-8 животных, в контрольной группе — 10-13 животных. Опыты были повторены дважды.

*Определение содержания Докс в клетках нормальных тканей мышей-опухоленосителей*

Через 24 ч после последней инъекции препаратов мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации, и забирали образцы костного мозга, печени и селезенки. Образцы подвергали механической дезагрегации. Полученные суспензии клеток пропускали дважды через нейлоновый фильтр с диаметром пор 40 мкм. Далее в суспензии ( $1 \cdot 10^6$  клеток/мл) добавляли Хехст33258 в конечной концентрации 1,2 мкг/мл и инкубировали 5-10 мин при комнатной температуре, после чего образцы немедленно анализировали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, BDIS, США), оборудованного двумя лазерами с длинами волн 375 нм и 488 нм. Флуоресценцию Хехста33258 измеряли в диапазоне  $424 \pm 20$  нм при  $\lambda_{\text{возбуждения}} = 375$  нм, флуоресценцию Докс — в диапазоне  $585 \pm 20$  нм при  $\lambda_{\text{возбуждения}} = 488$  нм. Данные об интенсивности прямого, бокового светорассеяния и флуоресценции клеток в указанных спектральных диапазонах записывали в файл, который затем обрабатывали с помощью программы «CellQuestPro» (BDIS, США). По показателям светорассеяния и отсутствию связывания с Хехстом 33258 выделяли регион неповрежденных клеток, в котором определяли интенсивность флуоресценции Докс.

*Синтез конъюгата G2 дендримера с Докс (G2-Докс)*

В работе использованы немодифицированные полиамидоаминовые дендримеры 2-го поколения с терминальными  $\text{NH}_2$ -группами и ядром на основе этилендиамина (Dendritech, США). Ковалентные конъюгаты G2 с Докс (Sigma, США) синтезировали с использованием кислотлабильного линкера цис-аконитового ангидрида в соответствии с ранее описанной методикой [10]. Чистоту полученного продукта анализировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Содержание Докс в конъюгате определяли путем фотоколориметрического измерения поглощения Докс при 481 нм.

*Получение рекомбинантного 3D АФП и его конъюгата с G2 и Докс (3D-G2-Докс)*

Получение рекомбинантного 3D АФП осуществляли посредством бактериальной системы экспрессии, а именно с помощью штамма *E. coli* BL21DE3, трансформированного конструктом на основе плазмиды рЕТ28a+, содержащей

последовательность, кодирующую целевой белок. После разрушения клеток 3D АФП, содержащий his-tag, выделяли с помощью металл-хелатной хроматографии.

Получение конъюгата 3D-G2-Докс осуществляли с помощью  $\text{Cu}^{2+}$ -катализируемой реакции циклоконденсации. Количество доксорубина в конъюгате определяли путем фотоколориметрического измерения поглощения Докс при 481 нм. Гомогенность конъюгата, чистоту и молекулярную массу конечного конъюгата определяли с помощью аналитической гель-эксклюзионной хроматографии на колонке TSK gel G2000SWxl на хроматографической системе Shimadzu LC-20 Promience.

*Статистическая обработка*

Для описательной статистики использовали среднее значение и стандартную ошибку (SE), вычисленные с помощью программы «Statistica 6.0» (StatSoft, Inc.). Групповое сравнение полученных данных проводили по критерию Манн-Уитни в той же программе. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

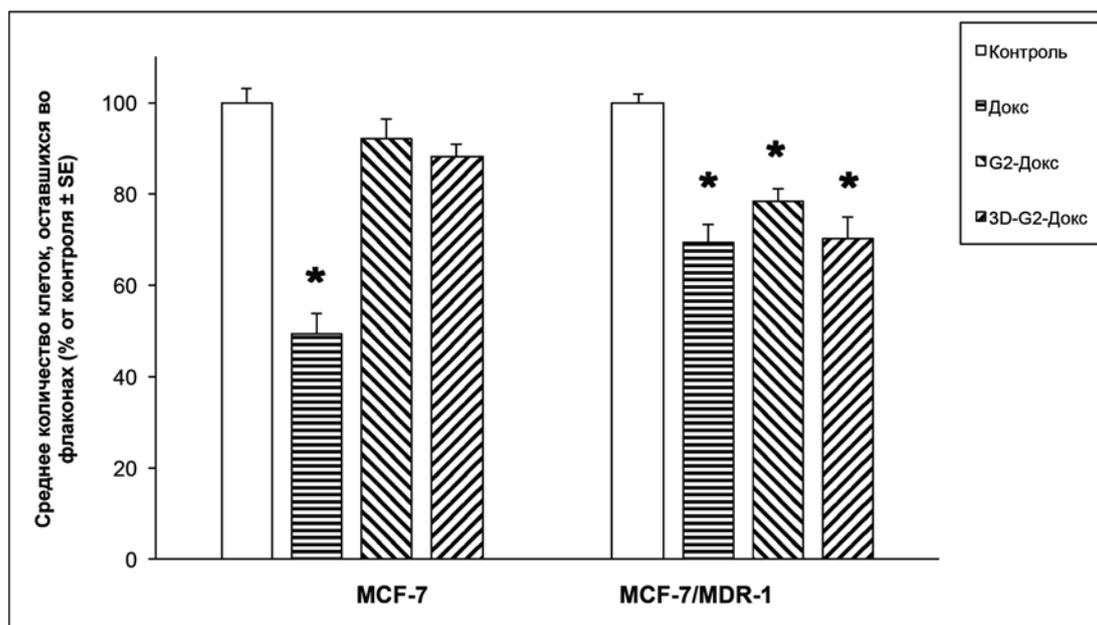
## Результаты и обсуждение

Как показано на рис. 1, наиболее выраженное подавление роста клеточной культуры линии MCF-7 наблюдалось после инкубации со свободным Докс ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем). Оба препарата, созданные на основе дендритных полимеров (G2-Докс и 3D-G2-Докс), практически не уменьшали количество опухолевых клеток этой линии по сравнению с контролем. Данные МТТ-теста подтвердили, что жизнеспособность клеток MCF-7 статистически значимо снижается только под влиянием свободного Докс (рис. 2).

В отношении химиорезистентной культуры MCF-7/MDR1 показаны другие эффекты. Все препараты оказывали примерно одинаковое влияние на количество опухолевых клеток, снижая этот показатель на 25-30% по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (рис. 1). Жизнеспособность клеток, определенная с помощью МТТ-теста, также снижалась в одинаковой степени после инкубации со свободным Докс, G2-Докс или 3D-G2-Докс (во всех случаях  $p < 0,05$  по сравнению с контролем) (рис. 2). При этом эффекты, оцениваемые по снижению количества клеток, были выражены слабее для линии MCF-7/MDR1, чем для линии MCF-7 при действии свободного Докс.

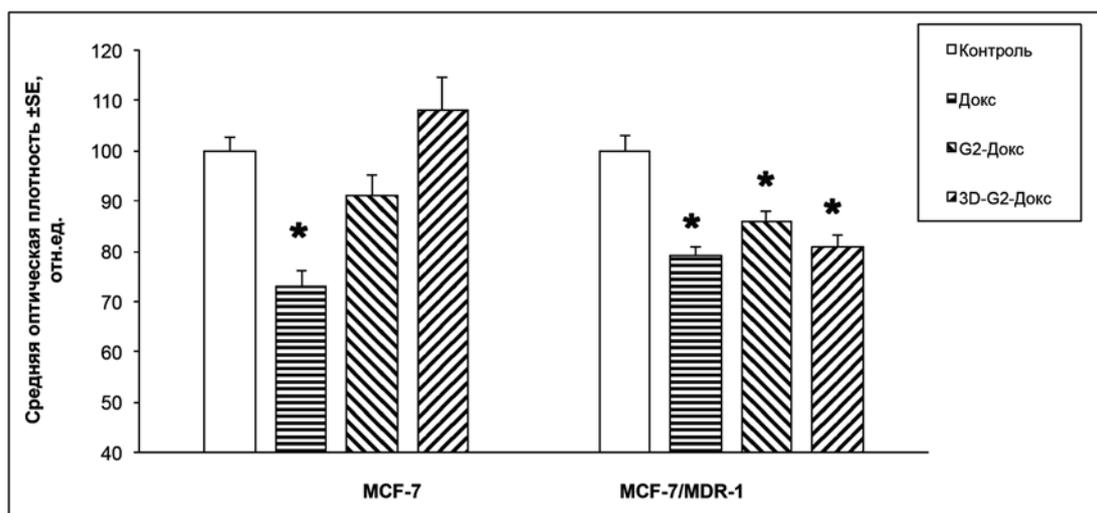
В целом, полученные результаты объясняются описанными ранее особенностями накопления и выведения Докс, поступившего в составе изучаемых препаратов в клетки разных линий [1]. Кроме того, результаты данной работы подтверждают предположение о том, что цитотоксическое действие G2-Докс и 3D-G2-Докс выражено сильнее в химиорезистентной, чем химиочувствительной линии опухолевых клеток.

Результаты экспериментов *in vivo* с меланомой линии В16 свидетельствуют о наличии противоопухолевой активности G2-Докс и 3D-G2-Докс, которая выражена в той же степени, что



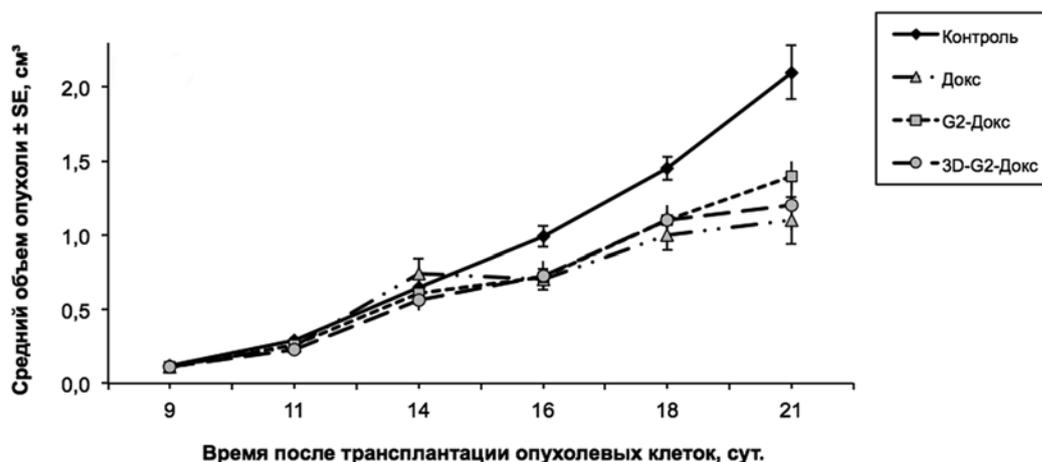
	контроль	se контроль	докс	se докс	g2-докс	se g2-докс	3D-g2-докс	se 3D-g2-докс
MCF-7	100	3	49,5	4,2	92	4,2	88	2,9
MCF-7/ MDR-1	100	1,8	69,3	4	78,2	2,7	69,9	4,8

Рис.1. Количество опухолевых клеток, оставшихся во флаконах после инкубации с препаратами. Представлены данные в процентах от количества клеток в контроле, принятого за 100%  
\* p < 0,01 по сравнению с контролем



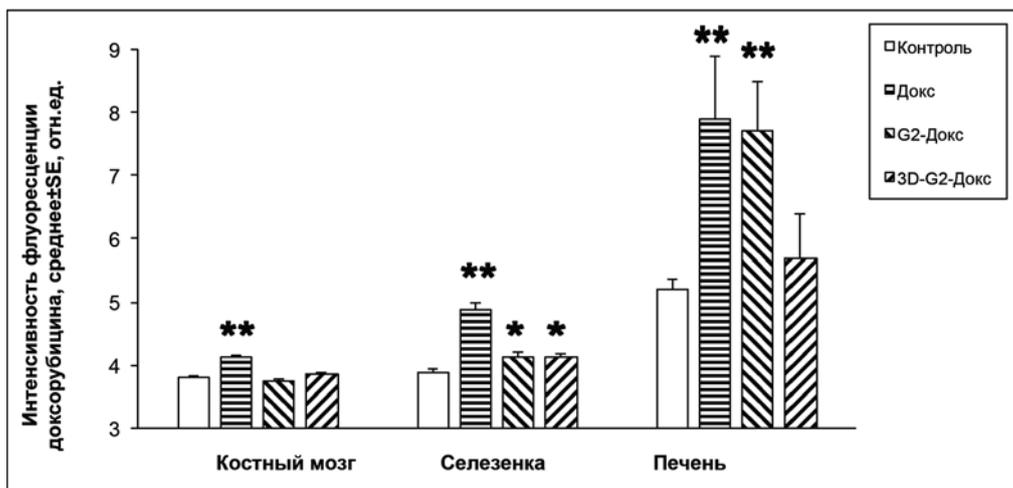
	контроль	se контроль	докс	se докс	g2-докс	se g2-докс	3D-g2-докс	se 3D-g2-докс
MCF-7	100	2,6	73	3,1	91	4,2	108	6,6
MCF-7/ MDR-1	100	3,1	79	1,9	86	1,9	81	2,4

Рис. 2. Жизнеспособность клеток двух линий (MCF-7 и MCF-7/MDR1) после инкубации с препаратами по данным МТТ-теста.  
\* p < 0,01 по сравнению с контролем



Время, сут	Объем опухоли, контроль	se контроль	Объем опухоли, докс	se докс	Объем опухоли, g2-докс	se g2-докс	Объем опухоли, 3D-g2-докс	se 3D-g2-докс
9	0,12	0,02	0,11	0,02	0,11	0,02	0,11	0,02
11	0,29	0,02	0,25	0,03	0,26	0,03	0,23	0,03
14	0,65	0,06	0,74	0,1	0,61	0,06	0,56	0,07
16	0,99	0,07	0,7	0,07	0,72	0,06	0,73	0,1
18	1,45	0,08	1	0,1	1,1	0,06	1,1	0,1
21	2,1	0,18	1,1	0,16	1,4	0,1	1,2	0,17

Рис. 3. Динамика роста меланомы линии В16 в контроле и после введения препаратов (на 9, 16 сутки после трансплантации опухолевых клеток)



	контроль	se контроль	докс	se докс	g2-докс	se g2-докс	3D-g2-докс	se 3D-g2-докс
КОСТНЫЙ МОЗГ	3,8	0,03	4,13	0,04	3,76	0,02	3,86	0,04
селезенка	3,9	0,04	4,88	0,1	4,13	0,07	4,12	0,07
печень	5,2	0,18	7,9	1	7,7	0,8	5,7	0,7

Рис. 4. Интенсивность флуоресценции Докс в клетках, выделенных из костного мозга, селезенки и печени мышей в контроле и через 24 часа после введения препаратов  
 \*\* p < 0,01 по сравнению с контролем  
 \* p < 0,05 по сравнению с контролем

и в случае свободного Докс (рис. 3). Так, начиная с 7 суток после первого введения препаратов, наблюдалось снижение среднего объема опухолевого узла по сравнению с контролем на 25-30% в разные сроки ( $p < 0,05$  для всех препаратов). При этом важно отметить, что в нормальных клетках мышей G2-Докс и 3D-G2-Докс накапливались значительно слабее по сравнению со свободным Докс, как показано на примере селезенки, либо вовсе не накапливались, как показано на примере костного мозга (рис. 4). Следует отметить, что флуоресценция клеток печени после введения мышам 3D-G2-Докс не отличалась значимо от контрольной аутофлуоресценции, в то время как после введения G2-Докс была выше, чем в контроле.

Таким образом, в работе продемонстрирована противоопухолевая активность G2-Докс и 3D-G2-Докс в условиях *in vivo* в отношении мышиной меланомы линии В16, а также в условиях *in vitro* в отношении химиорезистентной культуры рака молочной железы линии MCF-7/MDR1. При этом эффективность действия этих препаратов не отличалась от таковой при использовании свободного Докс. Однако для химочувствительной линии MCF-7, клетки которой не способны быстро откачивать Докс, более эффективным препаратом оказался свободный Докс.

При объяснении наблюдаемых различий в эффективности действия препаратов на разные линии опухолевых клеток следует учитывать не только их способность откачивать Докс, но также и субклеточную локализацию Докс, поступившего в клетки в составе конъюгатов с дендримерами или свободной форме. Как показано нами ранее, накопление Докс в клеточных ядрах происходило только при использовании свободного Докс в культуре MCF-7 [2], что вызывало максимальный цитотоксический эффект, связанный с основным механизмом действия Докс — интеркаляцией в ядерную ДНК и ингибированием топоизомеразы II. Во всех остальных случаях Докс был локализован, главным образом, в цитоплазме. По-видимому, цитотоксическое действие препаратов реализуется в таких случаях через окислительный стресс, индуцируемый Докс благодаря его способности продуцировать свободные радикалы при взаимодействии с рядом митохондриальных белков, как было показано в ранних работах [5, 8]. Поэтому неудивительно, что эффективность действия свободного Докс, G2-Докс или 3D-G2-Докс была примерно одинаковой в химиорезистентных клетках MCF-7/MDR1 и ниже, чем таковой для свободного Докс в клетках MCF-7.

В целом, полученные данные о противоопухолевой активности конъюгатов Докс с

дендримерами свидетельствуют, что их использование может иметь смысл в случае химиорезистентных опухолей. Хотя при использовании G2-Докс или 3D-G2-Докс не удалось добиться более высокой эффективности их противоопухолевого действия по сравнению со свободным Докс, накопление в нормальных клетках этих конъюгатов, и особенно 3D-G2-Докс, было ниже, чем свободного Докс. Поэтому полученные данные позволяют полагать, что основная польза от возможного использования таких конъюгатов может быть связана со снижением токсического действия Докс на нормальные ткани и органы.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №15-15-10013).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Замулаева И.А., Матчук О.Н., Пронюшкина К.А. и др. Накопление конъюгатов доксорубицина с дендритным полимером и векторным белком в нормальных и опухолевых клетках *in vitro* // Вопросы онкологии. — 2016. — Т. 62. — № 5. — С. 660-665.
2. Замулаева И.А., Чурюкина К.А., Матчук О.Н. и др. Цитотоксические эффекты комбинированного действия ионизирующего излучения и конъюгатов доксорубицина с дендритным полимером и векторным белком на опухолевые клетки *in vitro* // Радиация и риск. — 2016. — Т. 25. — № 3. — С. 46-56.
3. Ницетов М.Б., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А. и др. Изучение экспрессии рецептора АФП в опухолевых и нормальных тканях человека с помощью иммуногистохимического метода // Иммунология. — 2005. — Т. 26. — № 2. — С. 122-125.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — С. 644-645.
5. Doroshow J.H. Anthracycline Antibiotic-stimulated Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radical Production by NADH Dehydrogenase // Cancer Research. — 1983. — Vol. 43. — P. 4543-4551.
6. Gillies E.R., Frchet J.M. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery // Drug. Discovery Today. — 2005. — Vol. 10. — № 1. — P. 35-43.
7. Mitra A.K., Agrahari V., Mandal A. et al. Novel delivery approaches for cancer therapeutics // J. Control. Release. — 2015. — Vol. 219. — P. 248-268.
8. Myers C.E., McGuire W.P., Liss R.H. et al. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response // Science. — 1977. — Vol. 197. — № 4299. — P. 165-167.
9. Posypanova G.A., Gorokhovets N.V., Makarov V.A. et al. Recombinant alpha-fetoprotein C-terminal fragment: The new recombinant vector for targeted delivery // J. Drug Target. — 2008. — Vol. 16. — № 4. — P. 321 — 328.
10. Yabbarov N.G., Posypanova G.A., Vorontsov E.A. et al. Targeted delivery of doxorubicin: Drug delivery system based on PAMAM dendrimers // Biochemistry (Moscow). — 2013. — Vol. 78. — № 8. — P. 1128-1140.

Поступила в редакцию 20.03.2017 г.

*I.A. Zamulaeva<sup>1</sup>, O.N. Matchuk<sup>1</sup>, K.A.Churyukina<sup>1</sup>,  
N.V. Orlova, N.G., Yabbarov<sup>1</sup>, E.D. Nikolskaya<sup>1</sup>,  
S.A. Makarenko<sup>1</sup>, A.V. Matveev<sup>1</sup>, O.A. Zhunina<sup>2</sup>,  
I.G. Kondrasheva<sup>2</sup>, E.S. Severin<sup>2</sup>*

**Anticancer activity of doxorubicin conjugates  
with dendritic polymers of second generation  
and vector protein in model systems in vitro  
and in vivo**

<sup>1</sup>A. Tsyb Medical Radiological Research Centre —  
branch of the National Medical Research Radiological  
Centre, Obninsk

<sup>2</sup>Institute of Molecular Diagnostics, Moscow

Anticancer activity of doxorubicin (Dox), its conjugates with the second generation dendritic polymer (G2-Dox) and vector protein (recombinant third domain of alpha-fetoprotein — 3D-G2-Dox) were studied in vitro and in vivo within the framework of the development of selective transport system of anticancer drugs to the target cells. The objects of the study were MCF-7 and MCF-7/MDR1 breast cancer cells, differing in chemosensitivity as well as mouse melanoma line B16. Anticancer activity of G2-Dox and 3D-G2-Dox was demonstrated in vivo (for B16 melanoma) and in vitro (for chemoresistant MCF-7/MDR1 cells, expressing P-glycoprotein). The effectiveness of anticancer action of G2-Dox and 3D-G2-Dox did not differ from that for free Dox. However for chemosensitive line MCF-7 free Dox proved to be more effective drug. It is important that the conjugates, and particularly 3D-G2-Dox, accumulated much weaker than the free Dox in normal cells isolated from bone marrow, spleen and liver of mice. The findings suggest that the main benefit from the possible use of such conjugates can be associated with reduced toxic effect of Dox on normal tissues and organs.

Key words: doxorubicin, dendrimers, alpha-fetoprotein, tumor cells, human breast cancer, mouse melanoma, MCF-7, MCF-7/MDR1, B16