

Е.М. Трещалина, С.Ш. Каршиева, Н.Ю. Анисимова, С.М. Ситдикова, М.В. Киселевский

Анти-интегрин $\alpha v \beta 3$ SAV-RGD в сочетании с дакарбазином при беспигментной меланоме

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Введение. Интегрин $\alpha v \beta 3$ (молекула клеточной адгезии) выполняет роль рецептора, в т.ч., металлопротеазы матрикса 2, задействованной в метастазировании меланомы. Нами был охарактеризован как антимеланомный оригинальный анти-интегриновый агент SAV-RGD (лио-SAV-RGD), специфически связывающийся с клетками меланомы посредством трипептида Arg-Gly-Asp. Более значимый эффект был получен на беспигментной меланоме кожи человека MeWo. Соответственно, актуальна экспериментальная оценка эффективности лио-SAV-RGD в сочетании с «золотым» стандартом антимеланомной химиотерапии дакарбазином (DTIC). **Цель:** сравнительное изучение сочетания DTIC+лио-SAV-RGD на модели беспигментной меланомы кожи человека MeWo. **Материал и методы.** Использована модель меланомы кожи человека MeWo *in vitro/in vivo*: чувствительная к DTIC клеточная линия MeWo и полученная проспективно устойчивая сублиния MeWo/DTIC; п/к ксенографты MeWo у мышей Balb/c nude. В опытах *in vitro* определено время удвоения клеток обеих моделей и определен индивидуальный диапазон концентраций агентов. Мышам DTIC+SAV-RGD агенты вводили в/б одновременно последовательно, сначала DTIC в субтерапевтической дозе 150 мг/кг, затем лио-SAV-RGD 9-кратным курсом в суммарной дозе 900 мг/кг (первая доза удвоена). Для контроля взята группа с DTIC в высокой терапевтической дозе 250 мг/кг, близкой к максимально переносимой (МПД). Все эксперименты выполнены стандартными методами с применением значимых критериев оценки и адекватной статистической обработки результатов ($p < 0,05$). **Результаты.** Для клеток MeWo и MeWo/DTIC с определенным проспективно одинаковым временем удвоения на уровне $23,0 \pm 2,3$ ч и $23,1 \pm 1,8$ ч DTIC был практически нецитотоксичен, $IC_{50} = 410 \pm 4$ мкг/мл и $IC_{50} = 860 \pm 27$ мкг/мл (критерий $IC_{50} \leq 100$ мкг/мл). Однако абсолютная величина действующих концентраций

DTIC была существенно меньше известной для пигментированной меланомы мышей, 1200–1400 мкг/мл. Лео-SAV-RGD, напротив, был цитотоксичен для обеих линий меланомы на пограничном уровне, $IC_{50} = 100 \pm 3,1$ мкг/мл, а в диапазоне от 1 до 100 мкг/кг вызывал гибель клеток в прямой зависимости от величины концентрации. На п/к ксенографтах MeWo DTIC в дозе 250 мг/кг был эффективен на уровне $T/C \leq 30\%$ (критерий $T/C \leq 42\%$) при частичной гибели мышей от токсичности. Сочетание DTIC+лио-SAV-RGD показало идентичный эффект независимо от редукции дозы на 40%, $T/C = 38\%$ ($p = 0,001$). **Заключение.** Сравнительное изучение на модели беспигментной меланомы кожи человека MeWo выявило *in vitro* отсутствие значимой цитотоксичности DTIC и пограничную цитотоксичность анти-интегрин $\alpha v \beta 3$ лио-SAV-RGD для клеток MeWo и MeWo/DTIC. На п/к ксенографтах MeWo сочетанная терапия DTIC+лио-SAV-RGD при редукции дозы цитостатика на 40% дала возможность получить максимальный противоопухолевый эффект ($T/C = 38\%$ против 30%) при хорошей переносимости. Полученные данные позволяют предположить, что введение в схему с DTIC анти-интегрин $\alpha v \beta 3$ целесообразно для повышения избирательности цитотоксического действия цитостатика.

Ключевые слова: лио-SAV-RGD, дакарбазин, меланома человека *in vitro/in vivo*, эффективность, толерантность

Введение

Диссеминированная меланома кожи человека отличается чрезвычайно низкой чувствительностью к терапии. «Золотым» стандартом лечения меланомы в мире является дакарбазин (DTIC), помимо которого в лекарственную терапию диссеминированной меланомы (ДМ) серьезный вклад внесен таргетными препаратами, направленными на ингибирование определенных сигнальных путей цитопротиферации [0, 2]. Ан-

ти-интегрины рассматриваются как потенциальные противоопухолевые агенты, способные ингибировать дифференцировку и пролиферацию различных злокачественных клеток, в т.ч., ДМ. Один из рецепторов интегринов витронектин $\alpha\upsilon\beta 3$ участвует во многих этапах опухолевой прогрессии, регулирует неоангиогенез, определяет миграцию и метастатический фенотип, а также выживаемость клеток меланомы [8, 17, 13]. Связывание с интегринными рецепторами осуществляют рекомбинантные самособирающиеся в тетрамерные структуры слитые белки SAV-RGD, содержащие меланома-узнающий трипептид Arg-Gly-Asp (RGD) и адапторную часть (SAV, стрептавидин) для присоединения цитотоксического агента. RGD-содержащие цитотоксические пептиды способны селективно связываться с конкретным рецептором интегрин и запускать внутриклеточные сигнальные каскады, блокируя пролиферацию. Описано множество различных RGD-мотивов нужной конформации [11]. Для реализации антиметастатического действия антагонистов рецептора как возможную мишень рассматривают экстрацеллюлярный витронектин $\alpha\upsilon\beta 3$, особенно значимый для агрессивной беспигментной меланомы [14, 16]. Различные антимеланомные анти-интегрины, в частности, CNT095, Vitaxin и др. МК-0429, обсуждаются как компоненты схем комбинированной терапии меланомы с цитостатиками [10, 15]. В нашей работе изучен оригинальный специфически узнающий клетки меланомы рекомбинантный лиофилизированный белок SAV-RGD из штамма-продуцента MG1655/pSAV-RGD E. Coli [3], прошедший предварительные исследования и показавший значимую антимеланомную активность на адекватных моделях [4]. В качестве моделей меланомы кожи человека выбрана наиболее агрессивная амеланотическая MeWo/mel⁺ (ATCC® HTB-65™) из криохранилища НМИЦ [5].

Материал и методы

Лию-SAV-RGD. Лيوфилизированный порошок лио-SAV-RGD сер. 030313Л ($m=5,0$ мг) получен от авторов [3]. Рабочие растворы готовили в растворе Хенкса до получения нужных концентраций: *in vitro* 1–100 мкг/мл с контролем результата через 24 и 72 ч, *in vivo* – при ранее найденной оптимальной схеме в/б ежедневно в суммарной дозе 900 мг/кг с удвоением первой дозы и 3-кратным контролем результата после моно- или сочетанной терапии.

Дакарбазин (DTIC). Использован аптечный лиофилизированный дакарбазин (DTIC) («Медак ГмбХ», Германия), содержащий 100 мг действующего вещества, растворенный в физ. растворе и добавленный в культуральную среду или введенный мышам в нужных концентрациях и объемах. При оценке цитотоксичности DTIC учитывали известную величину IC_{50} для пигментированной меланомы 1200–1400 мкг/мл [12]. В опыте *in vivo* использована определенная ранее единственная эффективная близкая к максимальной переносимой (МПД) доза 250 мг/кг.

Модели меланомы кожи человека. Использованы клеточная линия MeWo из хранилища ФГБУ «НМИЦ онкологии им.Н.Н.Блохина» Минздрава России и сублинии MeWo/DTIC, полученная в рамках данной работы. Клетки культивировали в соответствии с протоколом ATCC [19]. Для получения п/к ксенографтов клетки меланом инокулировали под кожу бока конвенциональным половозрелым иммунодефицитным 8-ми нед. Balb/c nude мышам разведения и содержания НМИЦ [6]. Мышей делили на группы ($n=10-12$), которые шифровали соответственно, DTIC, SAV-RGD, DTIC+SAV-RGD и КРО (контроль роста опухоли без воздействия). MeWo инокулировали по 1×10^7 кл. Для получения сублинии MeWo/DTIC использовали описанную методику [9].

Оценка цитотоксичности агентов. О цитотоксичности агентов судили по ингибирующей концентрации IC_{50} , определенной с помощью стандартного МТТ-колориметрического метода. Время удвоения популяции клеток рассчитывали по формуле $Td=t \times \ln(2)/\ln(N1/N0)$, где N – число клеток в начале (N0) и после (N1) культивирования в течение времени (t). Величину IC_{50} DTIC определяли с помощью регрессионного анализа зависимости между lg концентрации и цитотоксическим индексом в Excel 2013 («MS Office XP», США).

Оценка противоопухолевой активности. Об эффективности воздействий судили с помощью стандартной методики по соотношению средних объемов опухолей в леченой и контрольной группах мышей, выраженное в процентах, T/C%, критерий эффективности $T/C \leq 42\%$ [7, 8]. Терапевтический выигрыш сочетанной терапии оценивали по сравнению с группой DTIC.

Оценка переносимости терапии. Выполнена по возможной гибели мышей с признаками характерной для агента токсичности.

Статистический анализ. Результаты исследований *in vitro/in vivo* статистически обработаны с помощью компьютерной программы Exel 2013 и Exel для Windows 2007 с использованием критерия T-test Фишера, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Сравнительная цитотоксичность *in vitro* DTIC и лио-SAV-RGD

Исследование выполнено после определения времени удвоения популяции использованных моделей MeWo и MeWo/DTIC, а ингибирующая концентрация DTIC существенно увеличивалась на резистентной сублинии и составляла $IC_{50} = 860 \pm 27$ мкг/мл против $IC_{50} = 410 \pm 4$ мкг/мл для MeWo (табл. 1).

Таблица 1. Цитотоксичность DTIC на MeWo и MeWo/DTIC

| Линия клеток | IC_{50} DTIC, мкг/мл |
|--------------|------------------------|
| MeWo* | 410±40 |
| MeWo/DTIC** | 860±27 |

Примечание: Время удвоения клеток опухоли *23,1±1,8 ч; **23,0±2,3 ч

Лию-SAV-RGD, изученный в диапазоне концентраций 1-10-100 мкг/мл показал цитотоксичность в зависимости от величины примененной концентрации. Процент погибших клеток возрастает с увеличением концентрации лио-SAV-

RDG практически одинаково в обеих моделях. Максимальный процент 31-32% гибели клеток получен при концентрации 100 мкг/мл. Следовательно, лио-SAV-RGD сохраняет цитотоксическую активность в отношении клеток, резистентных к DTIC (табл. 2).

Таблица 2. Цитотоксичность лио-SAV-RGD на MeWo и MeWo/DTIC

| Концентрация лио-SAV-RGD, мкг/мл | % погибших клеток | |
|----------------------------------|-------------------|-----------|
| | MeWo | MeWo/DTIC |
| 1,0 | -1 | -2% |
| 10,0 | 11 | 14 |
| 100,0 | 32 | 31* |

Примечание: *все различия с группой MeWo недостоверны, $p > 0,05$. Сравнительная эффективность на MeWo DTIC и DTIC+лио-SAV-RGD

В группе мышей, получившей 250 мг/кг DTIC, наблюдали достоверное ингибирование роста опухолевых узлов MeWo вплоть до 21 сут опыта по сравнению с группой КРО: $V_{ср} = 108 \pm 22,8 \text{ мм}^3$ против $V_{ср} = 389 \pm 52,8 \text{ мм}^3$ на 3 сут, $V_{ср} = 201 \pm 95,1 \text{ мм}^3$ против $V_{ср} = 564 \pm 195 \text{ мм}^3$ на 7 сут и $V_{ср} = 253 \pm 101 \text{ мм}^3$ против $V_{ср} = 588 \pm 182 \text{ мм}^3$ ($p < 0,05$) на 10 сут после лечения (рис. 1). Соответственно, Т/С=54, 28 и 30% ($p < 0,05$).

Переносимость лечения DTIC была неудовлетворительной, т.к. 2 мыши погибли от токсичности при резком уменьшении массы селезенки (косвенный признак характерной гематологической токсичности) на 10-й, 11-й дни после лечения. Полученные данные свидетельствуют о том, что эффективная доза 250 мг/кг близка к максимально переносимой (МПД).

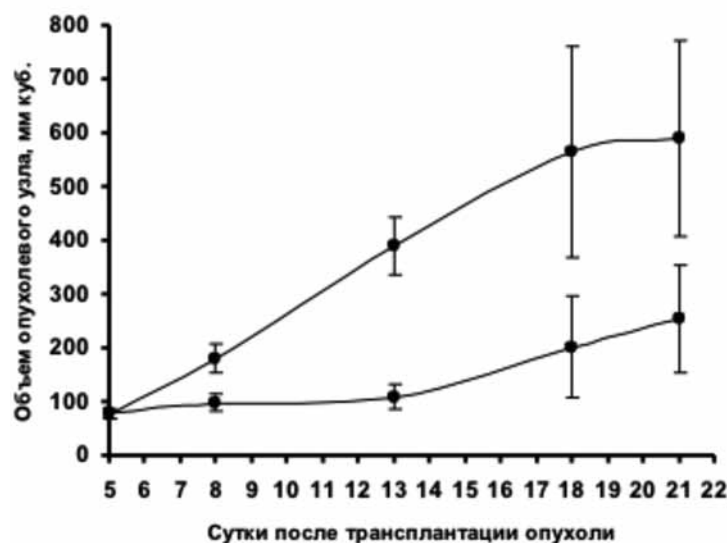


Рис. 1. Динамика роста подкожно трансплантированной меланомы человека MeWo после однократного внутрибрюшинного введения DTIC в дозе 250 мг/кг; верхняя кривая – КРО, нижняя кривая – DTIC 250 мг/кг



Рис. 2. Сравнительная динамика роста меланомы человека MeWo на фоне сочетанного лечения по схеме DTIC 150 мг/кг и лио-SAV-RGD 900 мг/кг против DTIC 250 мг/кг

Сочетанная терапия MeWo по схеме DTIC 150 мг/кг + SAV-RGD 900 мг/кг сразу после окончания показала достоверное ингибирование роста опухолевых узлов с нарастанием эффекта в течение следующей недели, T/C%=44–38–36% (p<0,05). В группе сравнения, получившей один DTIC в полной дозе 250 мг/кг, эффективность была практически идентичной первому опыту, T/C=44-42-36% (p<0,05). Кривые роста опухолей (рис. 2) иллюстрируют динамику развития описанных эффектов. Переносимость сочетанной терапии в отличие от одного DTIC в полной дозе была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не наблюдали.

Заключение

Сравнительное изучение анти-интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ лио-SAV-RGD на модели беспигментной меланомы кожи человека MeWo выявило *in vitro* отсутствие значимой цитотоксичности DTIC и пограничную цитотоксичность анти-интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ лио-SAV-RGD для клеток MeWo и MeWo/DTIC. На п/к ксенографтах MeWo сочетанная терапия DTIC+лио-SAV-RGD при редукации дозы цитостатика на 40% дала возможность получить максимальный противоопухолевый эффект (T/C=38% против 30%) с улучшением переносимости. Полученные данные позволяют предположить, что введение в схему антимеланомной химиотерапии с DTIC анти-интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ целесообразно для повышения избирательности цитотоксического действия цитостатика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю. Адьювантное лечение больных меланомой кожи // Практическая онкология. – 2001. – № 4 (8)(декабрь). – С. 42-49.
2. Демидов Л.В., Орлова К.В. Индивидуализация лекарственного лечения меланомы кожи // Практическая онкология. – 2013. – Т. 14. – № 4. – С. 239-246.
3. Рубцов М.А., Сыркина М.С., Вейко В.П. и др. Способ получения рекомбинантного белка SAV-RGD. – Патент №2577138, 2016.
4. Рубцов М.А., Маслакова А.А., Поташникова Д.М., Вейко В.П., Сыркина М.С. Тетрамерный RGD вызывает кластеризацию рецепторов интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ на поверхности клеток меланомы человека и снижает их выживаемость // Вестник Московского Университета. Химия. – 2016. – Т. 57. – № 4. – С. 235-244.
5. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека / под ред. М.И. Давыдова. – М., Практическая медицина, 2009. – С. 176.
6. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований // РБЖ. – 2017. – Т. 16. – № 3. – С. 6-13. – DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13.
7. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: изд. Гриф и К. – 2012. – гл. 39. – С. 642-657.
8. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. Second ed./edt. by B.A.Teicher and P.A.Andrews. 2004.
9. Berger W., Hauptmann E., Elbling L. et al. Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemoresistance of human melanoma cells // Int. J. of Cancer. – 1997. – Vol. 71(1). – P. 108-115.
10. Chen Q., Manning C.D., Millar H. et al. CNTO 95, a fully human anti αv integrin antibody, inhibits cell signaling, migration, invasion, and spontaneous metastasis of human breast cancer cells // Clin. Exp. Metastasis. – 2008. – Vol. 25. – P. 139. – <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9132-4>.
11. Hölig P., Bach M., Völkel T., Nahde T. et al. Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells // Protein Eng. Des. Sel. – 2004. – Vol. 17. – P. 433-441. – DOI:10.1093/protein/gzh055.
12. Javad B., Elaheh A., Najme N., Farzaneh S.-A. The Cytotoxicity of Dacarbazine Potentiated by Sea Cucumber Saponin in Resistant B16F10 Melanoma Cells through Apoptosis Induction // Avicenna Journal of Medical Biotechnology. – 2016. – Vol. 8. – № 3. – P. 112-116.
13. Khan Z., Marshall J.F. The role of integrins in TGF-activation in the tumour stroma // Cell Tissue Res. – 2016. – Vol. 365. – P. 657-673.
14. Lavergne M., Janus-Bell E., Schaff M. et al. Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target? // Cancers. – 2017. – Vol. 9. – № 10. – P. 1-17. –doi:10.3390/cancers9100133.
15. Pickarski M., Gleason A., Bednar B., Duong L.T. Orally active $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin inhibitor MK-0429 reduces melanoma metastasis // Oncol Rep. – 2015. – Vol. 33. – № 6. – P. 2737-2745. – doi: 10.3892/or.2015.3910.
16. Syrkina M.S., Rubtsov M.A., Shirokov D.A., Veiko V.P. Fusion proteins capable of selective binding to melanoma cells for investigation of the mechanisms of cell malignization //FEBS Journal, Blackwell Publishing Inc. (United Kingdom). – 2013. – Т. 280. – С. 324-324.
17. Syrkina M.S., Shirokov D.A., Rubtsov M.A. et al. Preparation and functional evaluation of RGD-modified streptavidin targeting to integrin-expressing melanoma cells//Protein Engineering, Design and Selection, Oxford University Press(United Kingdom). – 2013. – Vol. 26. – № 2. – С. 143-150.
18. Rubina K.A., Surkova E.I., Semina E.V. et al. T-Cadherin Expression in Melanoma Cells Stimulates Stromal Cell Recruitment and Invasion by Regulating the Expression of Chemokines, Integrins and Adhesion Molecules // Cancers. – 2015. – Vol. 7. – P. 1349-1370. – doi: 10.3390/cancers7030840.
19. Wright W.C., Daniels W.P., Fogh J. Distinction of seventy-one cultured human tumor cell lines by polymorphic enzyme analysis // J. Natl. Cancer Inst. – 1981. – Vol. 66. – P. 239-247.

Поступила в редакцию 30.10.2018 г.

*H.M. Treshalina, S.Sh. Karshieva, N.Yu. Anisimova,
S.M. Sidikova, M.V. Kiselevsky*

Anti-integrin $\alpha v\beta 3$ SAV-RGD as combinant for dtic with human amelanotic skin melanoma

N.N. Blokhin National Medical Research Center of
Oncology, Moscow

Introduction. The $\alpha v\beta 3$ integrin (cell adhesion molecule) plays the role of the receptor, including, metalloproteinase matrix 2, involved in melanoma metastasis. We have been characterized as an anti-melanoma original anti-integrin agent SAV-RGD (lyo-SAV-RGD), specifically binding to melanoma cells by means of the Arg-Gly-Asp tripeptide. More significant inhibited effect was obtained on amelanotic human skin melanoma MeWo. Accordingly, the experimental evaluation of the effectiveness of lyo-SAV-RGD in combination with the «gold» standard of anti-melanoma chemotherapy dacarbazine (DTIC) is relevant. **Objective:** a comparative study of the combination of DTIC+lyo-SAV-RGD on the model of pigmented melanoma of human skin MeWo. **Material and methods.** The model of human skin melanoma MeWo in vivo/in vitro: s.c. xenografts in Balb/c nude mice, sensitive to DTIC cell line MeWo and obtained prospectively stable subline MeWo/DTIC was used. In vitro experiments the time of cell doubling in both models was determined and the individual range of agent concentrations was studied. Therapy with DTIC+lyo-SAV-RGD were administered in simultaneously sequentially, first the single 150 mg/kg DTIC, then lyo-SAV-RGD 9-fold course in the total dose of 900 mg/kg (the first dose is doubled). To control of the group with single dose 250 mg/kg of DTIC close to the maximum tolerated dose (MTD). All experiments were performed by standard methods using significant evaluation criteria and adequate statistical processing of the results ($p < 0.05$). **Results.** For MeWo and MeWo/DTIC cells with a certain prospectively identical doubling time of the doubling time of tumor cells (Tpot) at the level of 23.0 ± 2.3 h and 23.1 ± 1.8 h, DTIC was practically non-cytotoxic, $IC_{50} = 410 \pm 4$ μ g/ml and $IC_{50} = 860 \pm 27$ μ g/ml ($IC_{50} < 100$ μ g/ml). However, the absolute value of the active concentrations of DTIC was significantly less known for murine pigmented melanoma, 1200–1400 μ g/ml. Lyo-SAV-RGD, on the contrary, was cytotoxic for both melanoma variants at the same level, $IC_{50} = 100 \pm 3.1$ μ g/ml, and in the range from 1,0 to 100 μ g/kg caused cell death in direct dependence on the concentration. On s.c. MeWo xenografts DTIC at the dose of 250 mg/kg was effective at T/C < 30% (criterion $T/C \leq 42\%$) with partial death of mice from toxicity. The combination of DTIC+lyo-SAV-RGD showed an identical effect regardless of dose reduction by 40%, T/C = 38% ($p = 0.001$). **Conclusion.** A comparative study on the model of human skin melanoma MeWo revealed in vitro the absence of significant cytotoxicity of DTIC and at the same time cytotoxicity of anti-integrin $\alpha v\beta 3$ lyo-SAV-RGD for MeWo and MeWo/DTIC cells. On xenografts MeWo combined therapy DTIC+lyo-SAV-RGD with dose reduction cytostatic 40% made it possible to obtain the maximum antitumor effect (T/C = 38% vs 30%) with improved tolerability. The obtained data suggest that the introduction of anti-integrin $\alpha v\beta 3$ into the scheme with DTIC is advisable to increase the selectivity of cytotoxic action of cytostatics.

Key words: lyo-SAV-RGD, dacarbazine, human melanoma in vitro/in vivo, efficacy, tolerance