

*Е.М. Трещалина, Н.В. Андропова, Г.Б. Смирнова,
Е.Н. Шолохова, Н.Н. Тупицын, Ю.А. Борисова, И.Н. Михайлова, С.М. Ситдикова,
М.В. Киселевский*

Противоопухолевая активность анти-интегринового белка SAV-RGD на ксенографтах меланомы кожи человека с экспрессией интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$

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

Анти-интегрины рассматриваются как потенциальные противоопухолевые агенты, способные ингибировать дифференцировку и пролиферацию различных злокачественных клеток, в т.ч., диссеминированной меланомы. Обсуждается возможность включения анти-интегринов с различными RGD-мотивами в схемы комбинированной терапии. Нами изучен оригинальный рекомбинантный лиофилизированный белок SAV-RGD (лио-SAV-RGD), специфически связывающийся с клетками меланомы посредством трипептида Arg-Gly-Asp. В качестве моделей меланомы кожи человека выбраны амеланотическая MeWo/mel⁻ и пигментированная mel Cher/mel⁺ с проспективно определенной экспрессией маркера, дающие п/к ксенографты у мышей Balb/c nude. Цель: оценка противоопухолевой активности лио-SAV-RGD *in vivo* на моделях меланомы кожи человека melCher и MeWo с различной способностью к меланиногенезу и экспрессией интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$. Показано, что обе меланомы *in vitro* экспрессируют интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$, выявленный на клетках melCher/mel⁺ с флуоресцентно-мечеными крысиними антителами Luc.H11 по экспрессии компонента интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$, $\beta 3$ -цепей (CD61), а на клетках MeWo/mel⁻ с антителами 23C6. В высокой терапевтической суммарной дозе 900 мг/кг лио-SAV-RGD при удовлетворительной переносимости ингибировал рост обеих меланом *in vivo*. В сравнении с melCher/mel⁺ более чувствительной к лечению оказалась MeWo/mel⁻: T/C_{min}=30% (p<0,05) против T/C_{min}=50% (p=0,001). Эффект на melCher/mel⁺ получен только в экспоненциальной фазе роста опухоли. Полученные результаты позволяют считать целесообразным углубленное доклиническое изучение анти-интегри-

на SAV-RGD, ориентированное на наиболее агрессивную диссеминированную амеланотическую меланому кожи, независимо от характера блокирования экспрессии рецептора.

Ключевые слова: SAV-RGD, ксенографты, меланома человека, экспрессия $\alpha\upsilon\beta 3$, противоопухолевый эффект

Введение

Интегрины $\alpha\upsilon$ играют важную роль в неоангиогенезе при новообразовании капиллярной сети (неоангиогенез), основную часть архитектоники кровоснабжения солидных опухолей. Поэтому анти-интегрины рассматриваются как потенциальные противоопухолевые агенты, способные ингибировать дифференцировку и пролиферацию различных злокачественных клеток, в т.ч., диссеминированной меланомы. Например, один из рецепторов интегрин витронектин $\alpha\upsilon\beta 3$ участвует во многих этапах опухолевой прогрессии, регулирует неоангиогенез, определяет миграцию и метастатический фенотип, а также выживаемость злокачественных клеток различного гистогенеза, в т.ч. меланомы [7, 11, 12].

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 пептиды способны оказывать цитотоксический эффект и запускать внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к блокированию пролиферации и гибели. Для селективного связывания с конкретным рецептором интегрин на поверхности клеток меланомы и эндотелия опухолевых сосудов человека и мыши предложено множе-

ство различных RGD-мотивов нужной конформации [6]. Экстрацеллюлярный витронектин $\alpha\upsilon\beta 3$ рассматривают как возможную мишень для реализации антиметастатического действия при действии антагонистов рецептора [8, 13]. Для лечения меланомы кожи или ее метастазов получены различные агенты, направленные на альфа-интегрины, в частности, CNT095, Vitaxin и др. МК-0429. Обсуждается возможность включения таких агентов в схемы комбинированной терапии меланомы с цитостатиками [5, 10]. Для нейроонкологии разработан высокоселективный ингибитор интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ и $\alpha\upsilon\beta 5$ циклический пептид Циленгитид (Cilengitide, «Merck KGaA», Германия), специфичность связывания с мишенью которого определялась фрагментом RGDfv (Arg-Gly-Asp-(D-Phe)-Val [6, 9].

В настоящем исследовании использован отечественный лиофилизированный специфически узнающий клетки меланомы рекомбинантный белок SAV-RGD из штамма-продуцента MG1655/pSAV-RGD E. Coli [1]. Для определения экспрессии маркера использованы 2 линии клеток перевиваемой меланомы кожи человека MeWo (ATCC ® HTB-65™) и mel Cher с различной способностью к меланиногенезу и проспективно определенной экспрессией маркера. Оценка эффективности лио-SAV-RGD выполнена на полученных из этих клеток п/к ксенографтах у мышей Balb/c nude [2].

Цель и задачи: оценка антипролиферативных свойств лио-SAV-RGD *in vivo* на моделях меланомы кожи человека mel Cher и MeWo с различной способностью к меланиногенезу и экспрессией интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$.

Материал и методы

Имунофенотипирование. Имунофенотипирование перевиваемых меланом выполнено в культуре клеток стандартным методом непрямой иммунофлуоресценции (пМФА) с коммерческими моноклональными антителами (МКА) CD61, SantaCruz и 23C6 [4]. Сущность метода флуоресцирующих антител заключается в визуализации реакции антиген-антитело люминесцентными маркерами. Учет реакции проводили на проточном цитометре.

Лабораторные животные. В опытах использовали 80 особей половозрелых мышей-самцов Balb/c nude 8-недельных массой тела 19-22 г из разведения НИИЦ, которых содержали в конвенциональных условиях специализированного кондиционированного отсека [3]. Для введения в эксперимент мышей делили на группы по 6-8 особей в каждой. После завершения опытов мышей умерщвляли передозировкой эфирного наркоза в соответствии с методами гуманного обращения в лабораторными животными, принятыми в РФ и за рубежом.

Опухолевые модели. Для определения экспрессии интегрин использованы клеточные линии и п/к ксенографты перевиваемых меланомы кожи человека амеланотическая Me Wo/mel- и пигментированная mel Cher/mel+ из Коллекции ФГБУ «НИИЦ онкологии им.Н.Н.Блохина»

Минздрава России (НИИЦ) [2]. Трансплантацию каждой меланомы выполняли по 1×10^7 клеток мышам Balb/c nude п/к билатерально, соответственно, в каждой группе число опухолевых узлов составляло 12-16. Все эксперименты с опухолевым материалом *in vitro/in vivo* проведены и анализированы в соответствии с действующими в РФ.

Исследуемый агент. Отечественный лиофилизированный специфически узнающий клетки меланомы рекомбинантный белок SAV-RGD из штамма-продуцента MG1655/pSAV-RGD E. Coli в форме порошка получен от авторов. Агент растворяли *ex tempore* в стерильном физ. растворе и вводили мышам ежедневно в/б на 3-10 сутки после трансплантации меланомы в суммарной дозе 900 мг/кг с удвоенной первой дозы.

Определение эффективности лио-SAV-RGD. Оценка эффективности лио-SAV-RGD выполняли с использованием показателя T/C<42% («treatment/control»), который вычисляли по средним объемам (V_{cp} , мм³) 3-кратно в процессе и после окончания курса лечения [3]. Учитывая биологические особенности модели, например, восстановление меланиногенеза и замедление роста при пассировании, проведены 2 дополнительных измерения опухолей в экспоненциальной фазе роста, т.е. на фоне лечения.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных проведена с помощью компьютерной программы Excel для Windows 2007 с использованием Ttest, значимыми считаются различия при $p < 0,05$.

Результаты

Имунофенотипирование культур клеток меланомы. Из иллюстраций видно (рис. 1), что интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ экспрессируется на клетках MeWo/mel- с помощью мышиных антител 23C6 к человеческому интегрину $\alpha\upsilon\beta 3$, а на клетках меланомы человека mel Cher/mel+ с использованием флуоресцентно-меченых крысиных антител Luc. H11 ($\beta 3$ -цепи, CD61).

Эффективность лио-SAV-RGD на п/к ксенографтах mel Cher

Видно (табл. 1), что в группе КРО без лечения меланомы mel Cher/mel+ после трансплантации растет относительно медленно. На 10, 14, 20 и 23 сутки п/к роста опухолевые узлы достигают $V_{cp}=65 \pm 13,3$ мм³; $V_{cp}=111 \pm 35,2$ мм³; $V_{cp}=130 \pm 31,7$ мм³ и $V_{cp}=155 \pm 22,9$ мм³, соответственно. Гибель мышей от опухоли наступала на 23 сутки после трансплантации. В группе, получившей лио-SAV-RGD, опухоли были существенно меньше и достигли, соответственно на 2, 6, 10 и 13 сутки после окончания лечения $V_{cp}=35 \pm 15$ мм³; $V_{cp}=56 \pm 23,3$ мм³; $V_{cp}=70 \pm 37,6$ мм³; $V_{cp}=92 \pm 70,1$ мм³. На последнем сроке 2 мыши пали от опухоли. Рассчитанные показатели эффективности составляли, в среднем, T/C=50-59%, что больше критерия эффективности (T/C<42%). Следует отметить, что до 10-го дня после окончания курса лечения опухоли были достоверно меньше контрольных ($p=0,01-0,001$), но затем возобновили рост. Анализ переноси-

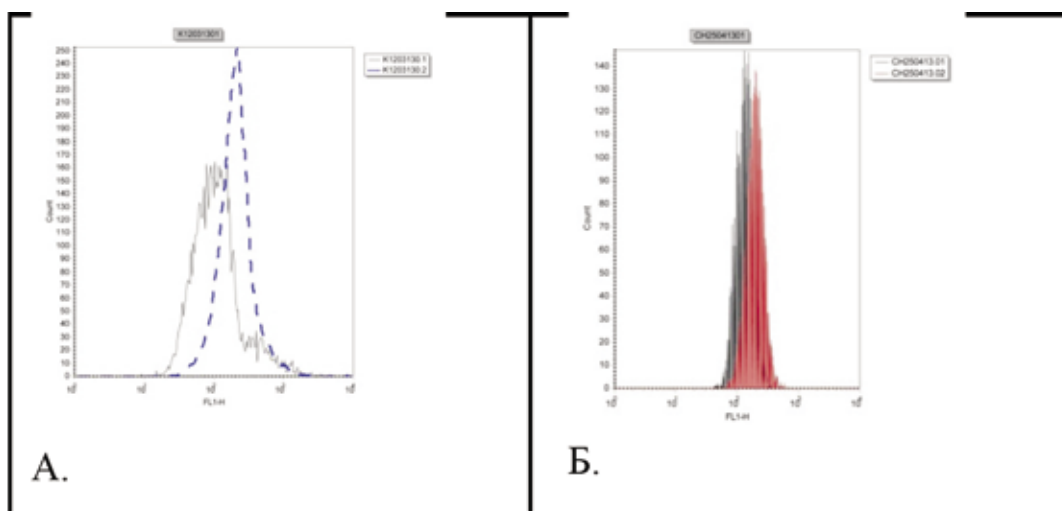


Рис. 1. Гистограммы интенсивности флуоресценции (проточная цитометрия) EricsExcelMCL клеток меланомы человека с МКА к человеческому интегрину α

А. Клетки MeWo/mel- окрашены мышиными антителами 23С6, докраска FITC-мечеными антителами к иммуноглобулинам мыши. По оси абсцисс – интенсивность флуоресцентного сигнала. По оси ординат – количество событий. Пунктирная линия – реакция антител 23С6. Сплошная линия – контрольное окрашивание. Антитела Luc.H11 дают положительную реакцию с клетками опухоли.

Б. Экспрессия $\beta 3$ -цепей (CD61) на клетках mel Cher/mel+. ИФА-окрашивание клеток антителами 23С6. По оси абсцисс – интенсивность флуоресцентного сигнала. По оси ординат – количество событий. Красный цвет – окраска антителами Luc.H11. Черный цвет – контроль

Таблица 1. Эффективность лио-SAV-RGD в оптимальной суммарной дозе 900 мг/кг на п/к ксенографтах меланомы человека mel Cher/mel+

№ опухоли	Результаты измерения объема опухолей (мм ³) на сутки после имплантации / сутки после окончания лечения							
	10/2		14/6		20/10		23/13	
	KPO	SAV-RGD	KPO	SAV-RGD	KPO	SAV-RGD	KPO	SAV-RGD
Vcp	65	35	111	56	130	70	155	92
Станд.отклон.	13,27	15,03	35,17	23,26	31,67	37,63	22,97	70,12
T/C%	54		50		54		59	
Ttest p=	0,003		0,001		0,01		0,17	
	<0,05				>0,05			

Таблица 2. Динамика роста меланомы человека MeWo/mel- под действием SAV-RGD при ежедневном внутрибрюшинном введении лио-SAV-RG в суммарной дозе 900 мг/кг

n=16	Результаты измерения опухолей на сутки после имплантации опухоли/ сутки после окончания лечения									
	12/1		15/4		19/8		22/11		25/14	
	KPO	SAV- RGD	KPO	SAV- RGD	KPO	SAV- RGD	KPO	SAV- RGD	KPO	SAV- RGD
Vcp	189	78	377	176	791	467	1325	794	1716	1335
Станд.отклон.	70,35	22,64	153,11	62,33	278,35	139,89	473,48	211,00	718,34	289,02
T/C%	41%		47%		59%		60%		78%	
(Ttest)	0,000016		0,00004		0,0009		0,0013		=0,1	
P	<0,05									

мости лечения, в т.ч. преждевременной гибели мышей показал отсутствие каких-либо побочных эффектов.

Эффективность лио-SAV-RGD на п/к ксенографтах MeWo/mel

Эксперименты на меланоме MeWo/mel-, перевитой из культуры клеток подкожно мышам Balb/c nude, проведены при ежедневном внутривнутрибрюшинном дискретном введении лио-SAV-RGD в суммарной дозе 900 мг/кг.

Показано (табл. 2), что в течение 3-х недель после подкожной имплантации культуры клеток мышам Balb/c nude меланома MeWo/mel- без специфического лечения (КРО) растет достаточно быстро. Начиная от 12 суток после перевивки, пальпируемые опухоли от $V_{cp}=70,35$ мм³ увеличивались в течение последующих 2-х недель в 10,2 раза, достигая $V_{cp}=1716$ мм³. В группе мышей, получившей SAV-RGD, достигнуто значимое ингибирование роста опухоли с высокой степенью достоверности различий в сравнении с группой контроля. На 1 сутки $V_{cp}=78$ мм³ против 189 мм³ ($p=0,000016$), на 4 сутки $V_{cp}=176$ мм³ против 377 мм³ ($p=0,00004$) и на 8 сутки $V_{cp}=467$ мм³ против 791 мм³ ($p=0,0009$), на 11 сутки $V_{cp}=794$ мм³ против 1325 мм³ ($p=0,0013$). Показатели эффективности на эти сроки были на уровне или близки к пороговой величине: T/C=41%, 47%, 49% и 50%, соответственно.

Переносимость лечения лио-SAV-RGD во всех изученных дозовых режимах удовлетворительная.

Заключение

Объектом исследования была лиофилированная субстанция рекомбинантного белка SAV-RGD, полученного на основе самособирающегося в тетрамерные структуры слитого белка, содержащего меланома-узнающий трипептид Arg-Gly-Asp (RGD) и адапторную часть стрептавидина (SAV) для присоединения токсического агента. В качестве моделей меланомы кожи человека выбраны амеланотическая MeWo/mel- и пигментированная mel Cher/mel+ с проспективно определенной экспрессией маркера, дающие п/к ксенографты у мышей Balb/c nude. Целью исследований была оценка антипролиферативных свойств лио-SAV-RGD *in vivo* на моделях меланомы кожи mel Cher и MeWo с различной способностью к меланиногенезу и экспрессией интегрин $\alpha v \beta 3$. Для решения задач использованы стандартные методы непрямой иммунофлуоресценции с МКА CD61, SantaCruz, 23C6 и экспериментальной химиотерапии. Терапия меланом лио-SAV-RGD выполнена длительно

внутрибрюшинно в суммарной дозе 900 мг/кг с удвоенной первой дозой. Изучение показало, что обе линии меланомы человека экспрессируют интегрин $\alpha v \beta 3$, но в реакции с различными антителами. Лео-SAV-RGD в высокой терапевтической суммарной дозе 900 мг/кг показал соответствующий объективному критерию (T/C<42%) воспроизводимый эффект только на меланоме на MeWo/mel-. Полученные результаты позволяют считать целесообразным углубленное доклиническое изучение анти-интегрин SAV-RGD, ориентированное на наиболее агрессивную диссеминированную амеланотическую меланому кожи, независимо от характера блокирования экспрессии рецептора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент №2577138, 2016. Способ получения рекомбинантного белка SAV-RGD/ Рубцов, М.А., Сыркина, М.С., Вейко, В.П., Окорокова, Н.А., Замятнин, А.А.
2. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека/под ред. М.И. Давыдова. – М., Практическая медицина, 2009. – С. 176.
3. Трещалина, Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований // РБЖ –2017. – №3. – Т.16. – С. 6-13. – DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13.
4. Тулицын Н.Н., Кадагидзе З.Г., Шатинина Н.Н. и др. Иммунодиагностика гемобластозов человека / Пособие для врачей. – М., 2003. – С. 47-49.
5. 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. –№ 25. p. 139. <https://doi.org/10.1007/s10585-007-9132-4>.
6. H lig P., Bach M., V lkel T. et al. Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells // Protein Eng. Des. Sel. – 2004. –№ 17. – P. 433-441. – DOI:10.1093/protein/gzh055.
7. 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.
8. Lavergne, M., Janus-Bell, E., Schaff, M. et al. Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target? // Cancers. – 2017. – № 9(10). – issue 133. – P. 1-17. – doi:10.3390/cancers9100133.
9. Mas-Moruno C., Rechenmacher F., Kessler H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation // Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. – 2010. – № 10. – P. 753-768.
10. Pickarski M., Gleason A., Bednar B., Duong L.T. Orally active $\alpha v \beta 3$ integrin inhibitor MK-0429 reduces melanoma metastasis // Oncol Rep. – 2015. – Vol. 33(6). – P. 2737-2745. – doi: 10.3892/or.2015.3910.
11. 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(3). –p. 1349-1370. DOI:10.3390/cancers7030840.
12. 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. – Vol. 280, Special Issue: SI Supplement: 1. – P. 324-325.
 13. 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. – P. 143-150.

Поступила в редакцию 19.10.2018 г.

*H.M. Treshalina, N.V. Andronova, G.B. Smirnova,
E.N. Sholokhova, N.N. Tupicin, Ju.A. Borisova,
I.N. Mikhailova, S.M. Sitdikova, M.V. Kiselevsky*

**Antitumor activity of anti-integrin protein
SAV-RGD on xenografted human skin
melanoma with integrin $\alpha\beta 3$ expression**

FSBI «National Medical Research Center of Oncology of
N.N. Blokhin», Ministry of Health of Russia, Moscow

Anti-integrins are considered as potential anticancer agents capable of inhibiting differentiation and proliferation of various malignant cells, including disseminated melanoma. The possibility of including anti-integrins with different RGD-motives in combined therapy schedules is discussed. We have studied the oridinal recombinant lyophilized protein SAV-RGD (lyo-SAV-RGD), specifically binding to melanoma cells by means of the Tripeptide Arg-Gly-Asp. As models of melanoma of the skin selected amalonaticus MeWo/mel- and pigmented melCher/mel+ with prospectively certain expression of the marker, giving subcutaneous xenograft in mice Balb/c nude. Objective: to evaluate the antitumor activity of lyo-SAV-RGD in vivo on human skin melanoma models melCher and MeWo with different melanogenesis ability and integrin $\alpha\beta 3$ expression. Both melanomas in vitro were shown to express integrin $\alpha\beta 3$ detected in melCher/mel+ cells with fluorescent-labeled rat antibodies Luc.H11 according to the expression component integrins $\alpha\beta 3$, $\beta 3$ -chain (CD61), and MeWo cells/mel- antibodies 23C6. In a high therapeutic total dose of 900 mg/kg, lyo-SAV-RGD inhibited growth of both melanomas in vivo with satisfactory tolerability. Compared to melCher/mel+, MeWo/mel-: T/Cmin=30% ($p<0.05$) versus T/Cmin=50% ($p=0.001$) was more sensitive to treatment. The effect on melCher/mel+ was obtained only in the exponential phase of tumor growth. The results obtained allow us to consider it expedient to conduct an in-depth preclinical study of anti-integrin SAV-RGD, focused on the most aggressive disseminated amelanotic melanoma of the skin, regardless of the nature of blocking receptor expression.

Keywords: SAV-RGD, xenograft, melanoma human, expression $\alpha\beta 3$, antitumor effect