

УДК 616-006.04-085.277.3-092.4

©Коллектив авторов

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА КОНЬЮГАТОВ
L-ЛИЗИН- α -ОКСИДАЗЫ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ НА
ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА *in vitro*.**

О.С. ЖУКОВА¹, Н.В. ГОГИЧАЕВА², Е.В. ЛУКАШЕВА², Т.Т.БЕРЕЗОВ²

¹ НИИ ЭДнТО РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН,
115478, Москва, Каширское шоссе, д.24

² Российский университет дружбы народов, кафедра биохимии,
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8,
тел., факс: (095)434-04-12; Эл. почта: lukashev@aha.ru

С использованием глутарового альдегида были получены конъюгаты L-лизин- α -оксидазы и моноклональных антител ICO-80 к рецептору CD-5. Исследование цитотоксического действия на клетки линии Yurkat показало, что цитотоксический эффект конъюгатов L-лизин- α -оксидазы с моноклональными антителами был несколько ниже по сравнению с исходным ферментом. Незначительное снижение биологической активности конъюгата можно объяснить тем, что молекула конъюгата с молекулярной массой, в несколько раз превышающей таковую L-лизин- α -оксидазы, вероятно не проникает через клеточную мембрану и вызывает образование перекиси водорода - основного повреждающего агента лишь вне клетки, в то время как нативный фермент действует как вне, так и внутри клетки, что усиливает его цитотоксический эффект.

Ключевые слова: цитотоксическая активность, L-лизин- α -оксидаза, оксидаза L-аминокислот, конъюгат фермент-антитело, иммобилизация ферментов, противоопухолевые ферменты.

ВВЕДЕНИЕ. L-лизин- α -оксидаза катализирует окислительное дезаминирование аминокислоты L-лизина с образованием α -кето- ϵ -аминокапроновой кислоты, аммиака и перекиси водорода [1]. Экспозиция опухолевых клеток различного генеза с ферментом в присутствии L-лизина оказывает рост-тормозящий эффект. Существуют данные, что образующаяся в ходе реакции перекись водорода вызывает освобождение оснований из ДНК и разрушение ее сахаро-фосфатного остова [2]. Инактивация матрицы ДНК

приводит к подавлению синтеза нуклеиновых кислот и белка в опухолевых клетках и блокированию перехода клеток из фазы S в фазу G₂/M клеточного цикла [3]. *In vivo* L-лизин- α -оксидаза ингибирует рост перевиваемых опухолей мышей, проявляя спектр противоопухолевой активности отличный от спектра действия единственного ферментного препарата L-аспарагиназы, который применяется в онкологии для лечения лейкозов [4].

В экспериментальной онкологии разрабатываются различные подходы для избирательной доставки противоопухолевых препаратов в ткани-мишени, которые позволяют усилить специфическое действие и свести к минимуму побочные токсические эффекты [5,6]. Одним из таких подходов является использование специфических иммуноглобулинов — антител против характеристических компонентов клеток-мишеней. Поэтому, представляло интерес исследовать цитотоксическую активность L-лизин- α -оксидазы, иммобилизованной на моноклональных антителах. Таким образом, в задачи данного исследования входили получение конъюгата L-лизин- α -оксидазы с моноклональными антителами и оценка цитотоксического эффекта полученного конъюгата на опухолевых клетках человека *in vitro*.

МЕТОДИКА. В работе использовали L-лизин- α -оксидазу (ЛО) из *Trichoderma harzianum Rifai* (НПО «Фермент», Вильнюс, удельная активность 26 Е/мг), моноклональные антитела (АТ) (IC₈₀-80 к рецептору CD-5, полученные в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДитО РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН), NaIO₄ (ч), NaHCO₃ (хч), NaH₂PO₄ (ч), NaCl (ч), NaOH (чда) ("Chemapol"), L-лизин ("Биолар"), глутаровый альдегид "Sigma", *o*-дианизидин (Олайнский завод химреактивов), МТТ-реагент "Sigma".

Во всех случаях активность ЛО измеряли в международных единицах, принимая за единицу такое количество фермента, которое катализировало образование 1 мкмоль продукта за 1 минуту. Удельную активность фермента оценивали как число единиц ферментативной активности, приходящееся на 1 мг белка. Количество белка определяли по методу Лоури [7].

Определение ферментативной активности ЛО и ее конъюгатов с антителами осуществляли, измеряя скорость накопления перекиси водорода в реакционной среде с помощью пероксидазы и *o*-дианизидина. Стандартные опытные пробы содержали 1,7 мл раствора *o*-дианизидина в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4 (0,019 мМ), 0,2 мл раствора L-лизина (10 мМ), 0,05 мл раствора пероксидазы хрена (0,01 мМ) и 0,05 мл раствора, содержащего ЛО или ее конъюгаты. За нарастанием оптической плотности следили при длине волны 460 нм на спектрофотометре Specord M-40. Ферментативную активность рассчитывали, принимая, что коэффициент молярной экстинкции продукта окисления *o*-дианизидина в присутствии перекиси водорода и пероксидазы в данных условиях составляет $1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

В качестве объекта исследования цитотоксической активности конъюгатов и их компонентов были использованы клетки неходжкинской лимфомы линии Yurkat, экспрессирующей рецептор CD-5. Клетки выращивали на среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, при 37°C и 5% CO₂. Цитотоксичность соединений определяли с помощью МТТ-теста [8].

Для получения конъюгатов ЛО с антителами использовали метод, основы которого были разработаны в работе [9]. К 0,2 мл раствора ЛО (50 Е/мл) в 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4 добавляли 0,15 мл 2% раствора глутарового

альдегида, реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и встряхивании. Избыток глутарового альдегида удаляли диализом против 0,1 М натрий-фосфатного буфера (pH 7,4) в течение суток. После диализа к раствору фермента добавляли 0,5 мл раствора антител (1 мг/мл) и проводили инкубацию в течение 1 часа при комнатной температуре.

МТТ-тест основан на ферментном восстановлении бесцветной соли тетразолия [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид] в живых метаболически активных клетках с образованием голубых кристаллов формазана. Для экспериментов использовали 96-луночные пластины. В каждую лунку помещали ≈ 17 тыс. клеток в питательной среде в конечном объеме 180 мкл и выращивали в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂. Затем в лунки вносили исследуемые соединения в определенной концентрации в объеме 20 мкл так, что конечные концентрации составили 10⁻⁵ - 10⁻⁴ Е/мл, и инкубировали 48 часов при тех же условиях. По окончании инкубации в лунки добавляли МТТ-реагент в конечной концентрации 25 мкг/мл и инкубировали далее в течение 4 часов в указанных условиях. Образовавшиеся голубые кристаллы формазана растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) в течение 20 минут. Оптическое поглощение окрашенных растворов измеряли, используя Titertek Multiskan MCC/340 при длине волны 570 нм. Ошибка измерений не превышала 10%. Результаты в опытных образцах оценивали по отношению к контрольным (без исследуемых соединений). Ингибирование роста клеток (ИК) в пробах определяли по формуле:

$$\text{ИК\%} = (1 - N_{\text{опыт}}/N_{\text{контроль}}) \times 100\%$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящее время известно большое количество методов получения конъюгатов ферментов с белками или какими-либо другими полимерными молекулами. Для достижения поставленной цели – получения конъюгатов ЛО с антителами – предстояло выбрать такой метод, который не привел бы к полной потере активности антител, а также обеспечивал бы наличие максимально возможной ферментативной активности в конъюгатах. Тестирование различных методов конъюгации ЛО было проведено в работе [9] с использованием неспецифических антител. Максимальная ферментативная активность сохранялась при сшивании ЛО и антител глутаровым альдегидом, а также при использовании в качестве сшивающей молекулы пероксидазы из хрена, на поверхности которой созданы альдегидные группы путем окисления ее углеводных компонентов периодатом натрия.

Метод получения конъюгатов с использованием глутарового альдегида оказался более приемлемым, поэтому он был выбран в данной работе для связывания L-лизин- α -оксидазы и моноклональных антител ISO-80 к рецептору CD-5.

Существует две возможности получения конъюгатов с помощью глутарового альдегида: одновременной реакцией фермента, антител и сшивающего агента (одностадийный способ) или двухстадийным способом, который включает первоначальную обработку ЛО избытком глутарового альдегида (таким образом, на поверхности фермента создаются альдегидные группы), удаление глутарового альдегида и последующую реакцию активированного фермента с антителами. В работе [9] было показано, что двухстадийный метод позволяет избежать образования гомоферментных конъюгатов и, кроме того, обеспечивает весьма высокий выход по

ферментативной активности до 70% от исходной. Использование двухстадийного метода позволило получить конъюгат ЛО и моноклональных антител ICO-80 к рецептору CD-5 с выходом по ферментативной активности 65 %. Снижение каталитической активности ЛО в процессе конъюгации может быть вызвано как инактивирующим воздействием глутарового альдегида, так и конформационными изменениями в молекуле фермента или стерическими затруднениями при взаимодействии L-лизина с активным центром конъюгированного фермента.

Специфичность связывания моноклональных антител, входящих в состав конъюгата, с рецепторами CD-5 на поверхности клеток линии Yurkat была определена в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН.

Таблица. Цитотоксический эффект нативной L-лизин- α -оксидазы (ЛО) и конъюгатов L-лизин- α -оксидазы и моноклональных антител (ICO-80) на клетки линии Yurkat.

| Соединение | Концентрация, Е/мл | Ингибирование роста клеток, % |
|------------|--------------------|-------------------------------|
| ЛО | $1 \cdot 10^{-4}$ | 78,9 |
| ЛО | $1 \cdot 10^{-5}$ | 18,4 |
| ЛО* ICO-80 | $1 \cdot 10^{-4}$ | 56,6 |
| ЛО* ICO-80 | $1 \cdot 10^{-5}$ | 1,3 |

Исследование цитотоксического эффекта конъюгата ЛО и моноклональных антител на клетках линии Yurkat показало снижение активности конъюгата по сравнению с исходным ферментом (табл.). По-видимому, цитотоксический эффект ЛО реализуется за счет действия перекиси водорода, образующейся в результате каталитической реакции превращения L-лизина, находящегося как в питательной среде опухолевых клеток, так и в цитоплазме клеток. Незначительное снижение биологической активности конъюгата можно объяснить тем, что молекула конъюгата с молекулярной массой, в несколько раз превышающей молекулярную массу ЛО, не проникает через клеточную мембрану. Следовательно, в этом случае не образуется внутриклеточная перекись водорода, то есть суммарная концентрация повреждающего агента ниже, чем при использовании нативного фермента. Полученные результаты согласуются с опубликованными данными о ведущей роли перекиси водорода в проявлении цитотоксического эффекта ЛО [2]. Кроме того, биологическое действие ЛО, вероятно, связано с ее проникновением в клетку, на что указывает снижение цитотоксической активности конъюгированной формы фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы "Университеты России".

ЛИТЕРАТУРА

1. Berezov T.T., Lukasheva E.V. (1988) Biochem.Int., 17, 529-534.
2. Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Soda K. (1980) Agric.Biol.Chem, 44, 387-392.

3. Жукова О.С., Хадуев С.Х., Добрынин Я.В., Смирнова И.П., Лукашева Е.В., Березов Т.Т. (1985) Эксперим.онкология, 7, 42-44.
4. Treshalina H.M., Lukasheva E.V., Sedakova L.A., Firsova G.A., Guerassimova G.K., Gogichaeva N.V., Berezov T.T. (2000) Applied Biochem.Biotechnol., 84, 267-273.
5. Owens J. (2001) Drug Discovery Today, 6, 384-386.
6. Fisher J. (2001) Drug Discovery Today, 6, 387-389.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L. et al. (1951) J.Biol.Chem., 193, 265-275.
8. Mosmann T. (1983) J. Immunol. Meth. 65, 55-63.
9. Гогичаева Н.В., Лукашева Е.В., Гаврилова Е.М., Смирнова И.П., Егоров А.М., Березов Т.Т. (2000) Вопр.мед.химии, 46, 410-418.

Пооступила 4.06.01.

CYTOTOXIC EFFECT OF CONJUGATES OF L-LYSINE α -OXIDASE WITH MONOCLONAL ANTIBODIES ON HUMAN TUMOR CELL LINES

O.S.ZHUKOVA¹, N.V.GOGICHAEVA², E.V.LUKASHEVA², T.T.BEREZOV²

¹ Blokhin Cancer Research Center of Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoje shosse, 24, Moscow, 115478 Russia.

² Department of Biochemistry, Russian Peoples' Friendship University, ul.Mikluho-Macklaja, 8, Moscow, 117198, Russia

tel, fax: (095)434-04-12; e.mail: lukashev@aha.ru

The conjugates of L-lysine α -oxidase and monoclonal antibodies ICO-80 towards CD-5 receptor were produced using glutaraldehyde. The cytotoxic effect of conjugates on Yurkat cells line appeared to be lower in comparison with the native enzyme. Negligible decrease of conjugate biological activity may be explained by the large molecular weight of conjugate, which is several times higher than the molecular weight of the native enzyme. Such conjugates can not penetrate into the cells. So they catalyze the hydrogen peroxide formation, the main damaging agent, probably only outside the cells. We suppose also that the free native enzyme penetrates into the cell and activates there the oxidative deamination of L-lysine and correspondingly the hydrogen peroxide formation. This may be the proper explanation for the higher cytotoxic effect of L-lysine α -oxidase on Yurkat cell line.

Key words: L-lysine α -oxidase, enzyme-antibody conjugates, cytotoxic effect, antitumor enzyme.