Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 5, с. 652-656.

УДК 615.277.3: 616.71
©Коллектив авторов

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ С ТРОПНОСТЬЮ К КОСТНОЙ ТКАНИ

Л.Р. Лебедев, Е.Д. Даниленко*, Ю.В. Телегина, Б.Н. Зайцев

Институт медицинской биотехнологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор",
633010, Бердск, Новосибирская область, ул. Химзаводская, д. 9;
тел.:8-383-363-80-14; факс:8-383-363-80-16; эл.почта: danilenko_ed@vector.nsc.ru

Разработан дизайн препарата для лечения костных метастазов на основе рекомбинантного фактора некроза опухолей альфа (ФНО-альфа) человека. Препарат представляет собой молекулярную конструкцию, содержащую дрожжевую двуспиральную рибонуклеиновую кислоту (дсРНК), покрытую оболочкой из конъюгата полианиона декстрана с ФНО-альфа и бисфосфонатом (бифосфонатом) алендроновой кислотой. Особенностью конструкции является сочетание в одной структуре веществ, обладающих противоопухолевой активностью (ФНО-альфа, дсРНК), и векторной молекулы (бисфосфонат), которая обеспечивает тропность к гидроксиапатиту – основному минеральному компоненту матрикса костной ткани. Отработаны условия конъюгирования и синтезированы конъюгаты ФНО-альфа и алендроновой кислоты с декстраном. Молекулярные конструкции получали методом самосборки, образовавшиеся комплексы отделяли гель-фильтрацией на сефарозе CL-6B. Электрофоретический анализ показал снижение подвижности дсРНК в комплексе с конъюгатом по сравнению с подвижностью исходной дсРНК, что подтверждает факт образования конструкций. Методом просвечивающей электронной микроскопии подтверждено наличие в препарате частиц с размерами порядка 30-40 нм. Оценка методом сорбции/десорбции показала более высокое сродство конъюгатов ФНО-альфа к гидроксиапатиту по сравнению с исходными молекулами ФНО-альфа (1,0-1,8 моль/л против 0,3 моль/л калий-фосфатного буфера, для десорбции, соответственно).

Ключевые слова: фактор некроза опухолей, алендроновая кислота, наночастицы

DOI: 10.18097/PBMC20156105652

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются лидирующими причинами смертности населения развитых, а в последние годы и развивающихся стран, и ведут к значительной утрате трудоспособной части общества. Костный скелет, наряду с лёгкими и печенью, представляет собой одно из наиболее распространенных мест метастазирования. Метастазы в кости скелета, прежде всего, позвоночник, регистрируют на поздних стадиях рака молочной и предстательной желез, легких, почек и ряда других злокачественных новообразований [1]. Их рост способствует развитию анемии и гиперкальциемии, резорбции кости, вызывает болевой синдром, переломы, компрессию спинного мозга, что способствует быстрому ухудшению качества жизни больных [2].

Для лечения метастазов в кости скелета, наряду с цитостатиками, могут быть использованы природные противоопухолевые цитокины такие как интерфероны, интерлейкины, факторы некроза опухолей (ФНО) [3]. Однако недостатком этих препаратов является их протеолитическая лабильность и способность депонироваться в "нецелевых" тканях организма. Разработка средств адресной доставки цитокинов позволяет повысить их концентрацию в патологическом очаге и обеспечить противоопухолевый эффект при сниженной дозе, как это было показано, в частности, на примере молекулярной конструкции, несущей ФНО-альфа [4].

В настоящее время все большее внимание в качестве средства адресной доставки лекарственных веществ в костную ткань привлекают бисфосфонаты,

* - адресат для переписки

синтетические аналоги эндогенных пирофосфатов, что связано с их высокой аффинностью к гидроксиапатиту костного матрикса [5].

Цель работы – исследование возможности создания молекулярной конструкции, несущей фактор некроза опухолей альфа и бисфосфонат – алендроновую кислоту – для адресной доставки в костные ткани.

МЕТОДИКА

В работе использовали двуспиральную РНК (дсРНК) из киллерного штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-448, полученную в соответствии с [6]; рекомбинантный человеческий фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) с активностью 8×10^7 МЕ/мг (“Вектор”, Россия); алендроновую кислоту (“Sample”, Япония); спермидин (“Sigma”, США); декстран с молекулярной массой 40000 Да (“AppliChem”, США); хроматографические сорбенты: сефадекс G-25, сефакрил S-200, сефарозу CL-6B (“Pharmacia”, Швеция); акриламид, гидроксилапатит (“Bio-Rad”, США); реактивы отечественного производства (трис, периодат натрия, боргидрид натрия, додецилсульфат натрия) квалификации “х.ч.”.

Для активации полисахаридной матрицы при получении конъюгатов декстрана с ФНО-альфа и алендроновой кислотой растворы декстрана и периодата натрия смешивали и инкубировали при температуре (22±3)°С. Через 60 мин активированный декстран отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 в буфере 25 мМ $NaHCO_3$, pH 8,6. В раствор, содержащий декстран, вносили ФНО-альфа (в молярном отношении 1:1), инкубировали 4 ч, затем добавляли растворы алендроновой кислоты и спермидина и продолжали инкубацию в течение 2 ч. Реакцию останавливали боргидридом натрия (инкубация в течение 60 мин). Синтезированные конъюгаты отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25, в 0,9%-ном растворе хлорида натрия. Полученные препараты анализировали гель-фильтрацией на сефакриле S-200 и электрофорезом в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Уровень цитолитической активности ФНО-альфа определяли титрованием в 96-луночных планшетах на монослое клеток мышиных фибробластов L-929 в присутствии актиномицина Д [7].

Для получения молекулярных конструкций синтезированные конъюгаты смешивали с препаратом дсРНК, образовавшиеся комплексы отделяли гель-фильтрацией на сефарозе CL-6B.

Результаты электрофореза обрабатывали с использованием компьютерной программы Gel-pro31. Содержание белка в растворах определяли по методу Лоури [8].

Молекулярные конструкции визуализировали методом просвечивающей электронной микроскопии (JEM 1400, Jeol) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Пробоподготовку осуществляли методом негативного контрастирования (1%-ный водный раствор уранилацетата). Анализ электронных снимков (определение размеров частиц) осуществляли при помощи программного пакета iTEM (“Olympus”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярная конструкция, теоретическая модель которой была описана ранее [4], представляет собой частицу, содержащую индуктор интерферона двуспиральную РНК, в комплексе с конъюгатом декстрана с ФНО-альфа и бисфосфонатом алендроновой кислотой. Как было показано авторами работы [5], катионные липид-кальций-фосфатные наночастицы, нагруженные золендроновой кислотой и поли (И:Ц), имели значительно большую противоопухолевую активность в культуре клеток меланомы B16BL6, чем свободные препараты. Достоинством разработанной нами конструкции является сочетание в одной структуре веществ, обладающих противоопухолевой активностью (ФНО-альфа, дсРНК) [9, 10], способных модулировать эффект друг друга, и векторной молекулы (алендроновая кислота) для повышения тропности конструкции к костной ткани. Подобный методический подход может быть перспективен при разработке нового противоопухолевого препарата для лечения костных метастазов.

Для того, чтобы снизить вероятность экранирования активного центра молекулы ФНО-альфа, бисфосфонат конъюгировали не с ФНО, а с молекулой посредника – спейсером. В качестве спейсера был выбран биодеградируемый полимер декстран с молекулярной массой 40-60 кДа, протяженность цепи которого позволяет вводить в состав конъюгата цитокин/декстран более одной молекулы алендроновой кислоты. Для обеспечения положительного заряда, необходимого для ионной связи с отрицательно заряженной молекулой дсРНК, в состав конъюгата были введены положительно заряженные молекулы спермидина.

Среди нескольких апробированных способов активации декстрана (с помощью эпихлоргидрина, бензохинона, периодата натрия) наиболее удобным в техническом отношении оказался способ активации периодатом натрия.

Методом электрофореза в 15%-ном ПААГ было показано, что конъюгаты декстрана с ФНО-альфа визуализируются в виде “облаков” с кажущейся молекулярной массой в диапазоне 120-150 кДа (рис. 1А). Однако при исследовании конъюгатов методом гель-хроматографии на колонке с сефарозой CL-6B были получены пики, соответствующие молекулярной массе 50-60 кДа. Повышение подвижности полимера при электрофорезе (рис. 1Б) может быть связано с изменением его заряда из-за введения в состав конъюгатов декстран/ФНО молекул спермидина.

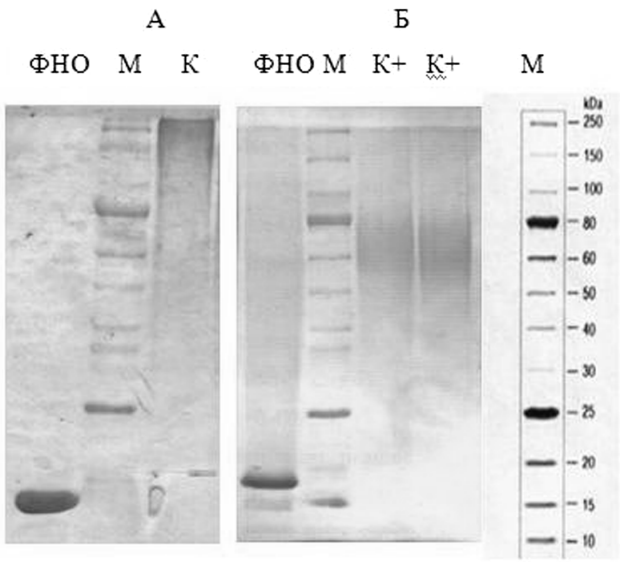

Рисунок 1. Электрофореграмма образцов конъюгатов декстрана с ФНО-альфа и декстрана с ФНО-альфа и спермидином в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Окраска Кумасси R-250. ФНО - фактор некроза опухолей альфа, исходный препарат; М - маркеры молекулярных масс (10-250 кДа); К - конъюгат ФНО с декстраном; К+ - конъюгат ФНО с декстраном и спермидином.

.

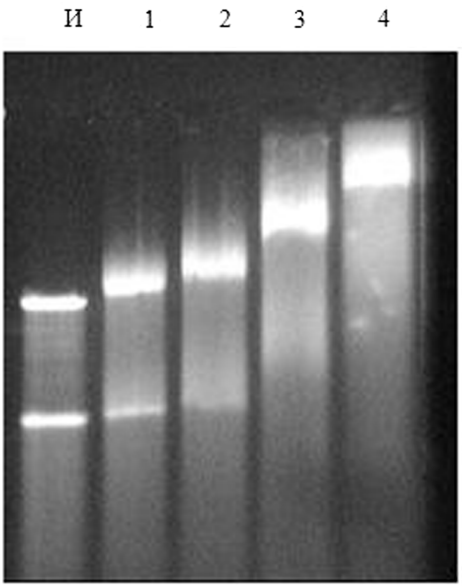

Рисунок 2. Электрофореграмма (1%-ный гель агарозы, окрашивание этидиум бромидом) образцов, содержащих дсРНК с конъюгатами декстрана со спермидином (мкг/мкг) при молярных соотношениях в конъюгатах спермидин/декстран: 1 - 5:1; 2 - 10:1; 3 - 20:1; 4 - 50:1; И - исходный препарат дсРНК.

Для оценки влияния количества молекул спермидина в составе конъюгата на образование комплексов с дсРНК, конъюгаты декстран/ФНО/спермидин смешивали с дсРНК в соотношении 1:1 (мг/мг). Анализ образцов электрофорезом в геле агарозы показал, что комплексы двуспиральной РНК (L- и M-формы) и конъюгата имеют заметно меньшую подвижность по сравнению с дсРНК, начиная с молярного отношения спермидин/декстран в конъюгате 10:1 и выше (рис. 2). Это можно объяснить увеличением молекулярной массы комплекса за счёт включения молекул спермидина и тем, что положительно заряженный спермидин частично нейтрализует отрицательный заряд РНК.

Для дальнейших работ при получении конъюгатов декстрана были выбраны соотношения спермидин/декстран 15:1-20:1. При этом подвижность дсРНК в оболочке из молекул конъюгата при электрофорезе в геле агарозы снижалась на 30-40% по сравнению с подвижностью исходной дсРНК.

Синтез конъюгатов, содержащих помимо молекул ФНО и спермидина алендроновую кислоту, проводили аналогичным образом, но в присутствии различных количеств алендроновой кислоты (от 5:1 до 40:1 моль/моль декстрана). Выбор оптимальной нагрузки бисфосфоната осуществляли по способности конъюгатов к сорбции и десорбции *с* гидроксиапатита – основного минерального компонента матрикса костной ткани. Для этого раствор конъюгата (1 мг по декстрану) наносили на колонку *с* гидроксиапатита (0,5 мл). По завершении связывания конъюгатов с сорбентом (в течение 30 мин) колонку промывали 0,9%-ным раствором хлорида натрия для вымывания несорбировавшегося материала и проводили десорбцию повышающейся концентрацией соли (фосфат калия). Результаты исследований, представленные в таблице показывают, что при увеличении содержания алендроновой кислоты в составе конъюгата с 5:1 до 20:1 молярность буфера, необходимого для его десорбции, пропорционально увеличивалась. На основании этих данных в дальнейшем для получения конъюгатов декстран/ФНО/спермидин/алендроновая кислота использовали соотношения алендроновая кислота/декстран 10:1-15:1, при которых десорбция конъюгатов осуществляется при концентрации фосфата калия в буферном растворе в диапазоне 1-1,5 моль/л.

Таблица. Зависимость концентрации фосфата калия в растворе (моль/л), необходимой для десорбции конъюгатов (декстрана с ФНО-альфа, спермидином и алендроновой кислотой) *с* гидроксилапатита, от количества молекул алендроновой кислоты в конъюгате.

Количество алендроновой кислоты, внесённой в реакционную смесь для конъюгирования, моль/моль декстрана	0	5	10	20	40
Молярность калий-фосфатного буфера для элюции материала, моль/л	0,3±0,1	0,6±0,2	1,0±0,2	1,8±0,3	≥2

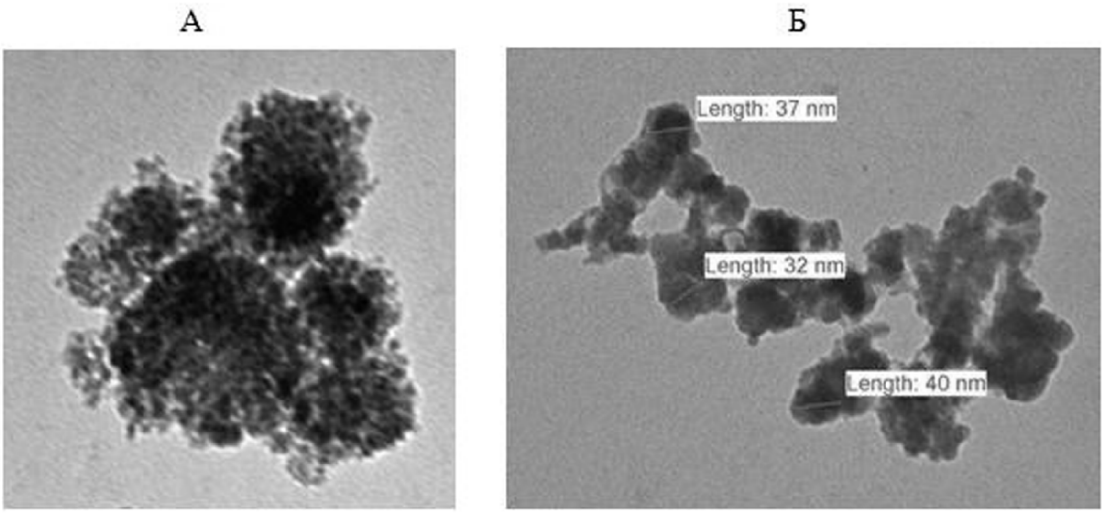

Рисунок 3. Электронно-микроскопические фотографии частиц, образованных дсРНК и конъюгатами декстрана с ФНО-альфа, спермидином и алендроновой кислотой: А - структуры из нескольких частиц; Б - сложные комплексы.

Полученные конъюгаты были использованы для сборки молекулярной конструкции. Электрофоретический анализ показал снижение подвижности дсРНК после инкубации с конъюгатом по сравнению с подвижностью исходной дсРНК, что подтверждает факт образования конструкций, содержащих конъюгат и нуклеиновую кислоту. Оптимальным по показателю электрофоретической подвижности являлось соотношение 1 моль дсРНК/100-120 моль конъюгата.

На электронно-микроскопических фотографиях (рис. 3) видно, что в исследованных образцах содержатся частицы с размерами 30-40 нм, склонные к объединению в структуры из нескольких частиц (рис. 3А), наблюдались и более сложные комплексы (рис. 3Б). Оценка специфической цитолитической активности ФНО-альфа на культуре мышиных фибробластов L929 показала, что удельная активность конъюгированного ФНО сохранялась на высоком уровне (6×10^6 МЕ/мг), хотя и снижалась по сравнению с активностью исходного белка (8×10^7 МЕ/мг).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Разработан метод сборки молекулярных конструкций в виде наночастиц, содержащих в своём составе противоопухолевые агенты (ФНО-альфа, дсРНК) и алендроновую кислоту как векторную молекулу для доставки и обеспечения связывания конструкций с гидроксиапатитом костной ткани.

Полученные частицы имели размеры 30-40 нм и обладали способностью образовывать комплексы. Исследование специфической цитолитической активности ФНО-альфа в составе конъюгата подтвердило сохранность биологических свойств цитокина. Установлено, что введение в состав конъюгатов алендроновой кислоты повышает степень их связывания с гидроксиапатитом – аналогом матрикса костной ткани.

Данная публикация подготовлена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы", тема "Разработка адресного терапевтического средства для лечения костных метастазов опухолей на основе бифосфонатов и белков-цитокинов" (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0061 от 27.06.2014). Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0061.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F.* (2015) Int. J. Cancer, **136**, E359-386. DOI: 10.1002/ijc.29210.
2. *Hibberd C., Cossigny D.A.F., Quan G.M.Y.* (2013) Cancer Growth and Metastasis, **6**, 23-34.
3. *Шмелев В.А.* (2008) Интерферон-гамма, фактор некроза опухолей, тимозин-альфа1-противоинфекционные и противоопухолевые цитокины и препараты, Медпрактика, М.
4. *Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г.* (2010) Патент РФ №2386447. Бюлл. Изобр. № 11.
5. *Chen L., Ding Y., Wang Y., Liu X., Babu R., Ravis W., Yan W.* (2013) Int. J. Nanomed., **8**, 138-145.
6. *Лебедев Л.Р., Аликин Ю.С., Рослякова Е.Ю., Подгорный В.Ф., Дубинкина О.С., Азаев М.Ш.* (2014) Биофарм. ж., **6**, 32-38.
7. *Tracey K.J.* (1994) in: The Cytokine Handbook (Thompson A.W., ed.), pp. 289-304.
8. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* (1951) J. Biol. Chem, **193**, 265-275.
9. *Lejeune F.J., Rüegg C.* (2006) Bull. Cancer, **93**, E 90-100.
10. http://www.cancer.gov/drugdictionary/?CdrID=39559 (2010).

Поступила: 04. 06. 2015.

AN ANTITUMOR OSTEOTROPIC AGENT BASED ON TUMOR NECROSIS FACTOR

L.R. Lebedev, E.D. Danilenko, Yu.V. Telegina, B.N. Zaitsev

Institute of Medical Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector",
9, Khimzavodskaya str., Berdsk, Novosibirsk region, 633010 Russia;
tel.: 8-383-363-80-14; fax: 8-383-363-80-16; e-mail: danilenko_ed@vector.nsc.ru

A novel drug for treatment of bone metastases based on human recombinant tumor necrosis factor (TNF-alpha) has been designed. The drug is a molecular structure containing yeast double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) covered by the conjugate of polyanion dextran with TNF-alpha and bisphosphonate, alendronic acid. The structure is characterized by the combination of substances possessing antitumor activity (TNF-alpha, dsRNA) and a vector molecule (bisphosphonate) providing tropism to hydroxyapatite, the main mineral component of the bone tissue matrix. The conjugation conditions were optimized and the conjugates of TNF-alpha and alendronic acid with dextran were synthesized. Molecular structures were obtained by self-assembly, and the resulting complexes were separated by gel filtration on Sepharose CL-6B. The electrophoretic analysis method revealed decreased mobility of dsRNA in the complex with the conjugate as compared to the mobility of the original dsRNA. This confirms formation of the designed structures. Transmission electron microscopy confirmed the presence of particles with sizes of 30-40 nm in the drug. Evaluation by the sorption/desorption method showed a higher affinity of TNF-alpha conjugates to hydroxyapatite as compared to the original TNF-alpha molecules (from 1.0 to 1.8 mol/L vs. 0.3 mol/L of potassium phosphate buffer for desorption, respectively).

Key words: tumor necrosis factor, alendronic acid, nanoparticles