

# РАЗРАБОТКА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПРОТЕАСОМЫ

**Н.П. Шарова**

*ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия,  
[npsharova@bk.ru](mailto:npsharova@bk.ru)*

Протеасомы, мультипротеолитические субкомплексы, регулируют клеточные процессы, образуя биологически активные пептиды и гидролизуя рецепторы, факторы роста, компоненты сигнальных путей, транскрипционные факторы и другие белки. Кроме того, протеасомы контролируют качество белков и устраняют те из них, у которых повреждена теритичеая структура. Многочисленные функции протеасом обусловлены множественностью их форм, различающихся структурой и, следовательно, спецификой гидролиза белков. Возникновение и развитие различного рода патологий во многом связано с изменением клеточного пула протеасом. Рост злокачественных опухолей сопровождается возрастанием химотрипсинподобной (ХТП) активности протеасом и увеличением экспрессии 26S-протеасом, распознающих и гидролизующих убиквитинированные полноразмерные белки. Причем это справедливо как для экспериментальных опухолей грызунов, так и для злокачественных новообразований человека. Более того, регрессия опухолей у грызунов сопровождается резким падением указанных параметров протеасом. Таким образом, протеасомы представляют собой перспективную модель для противоопухолевых воздействий.

С 2003 года в клинической практике используется первое противоопухолевое соединение, бортезомиб, являющееся конкурентным обратимым ингибитором ХТП-активности протеасом. Бортезомиб применяется внутривенно, главным образом, для лечения гематологических онкологических заболеваний, более чувствительных к нему по сравнению с солидными опухолями. Вместе с тем, это соединение вызывает серьезные побочные эффекты, к числу которых относятся периферическая нейропатия, тромбоцитопения, нарушение функций желудочно-кишечного тракта, отклонения в сердечной деятельности, слабость. С целью снижения побочных эффектов и улучшения противоопухолевой эффективности синтезированы новые ингибиторы протеасом. Некоторые из них – карфилзомиб (необратимый ингибитор ХТП-активности протеасом) и иксазомиб (препа-

рат орального применения) – прошли начальные этапы клинических испытаний, выявивших побочные эффекты, похожие на эффекты бортезомиба.

Нами предложен иной подход к разработке противоопухолевых препаратов, а именно, создание композиций химических соединений комбинированного действия на протеасомы. В качестве первого компонента мы выбрали бортезомиб в количествах, в 4 и 10 раз ниже клинической дозы, для уменьшения токсического эффекта. В качестве второго компонента был выбран менадиона натрия бисульфит (МНБ) (Vicasolum, витамин К3). За счет хиноновой структуры МНБ вызывает окисление NADH, генерирует супероксидные радикалы и, как следствие, повреждает функции протеасом во внутриклеточной среде.

Если дозы бортезомиба для противоопухолевых композиций мы могли выбрать теоретически, то концентрации МНБ нужно было определить экспериментально, а именно, нас интересовали те концентрации МНБ, которые влияли бы на злокачественные клетки и их протеасомы, но не на нормальные клетки. В исследование вошли злокачественные и иммортализованные клетки человека и мыши, в качестве контрольных клеток были выбраны развивающиеся зародыши костистой рыбы вьюн. Зародыши вьюна представляют собой уникальную мини-модель *in vivo*, которая дает возможность сравнивать процессы, происходящие в делящихся злокачественных клетках, с процессами в делящихся нормальных клетках. Кроме того, эта модель позволяет осуществлять обработку злокачественных и нормальных клеток *in vivo* одинаковым способом – введением химических соединений в инкубационную среду.

Цитотоксический эффект МНБ на клеточные линии оценивали с помощью стандартного МТТ-теста, на зародыши вьюна – по приобретению погибшими экземплярами непрозрачной белой оболочки. Выявлено, что минимальная концентрация МНБ, вызывающая цитотоксический эффект по отношению к клеткам линий С26 (аденокарцинома прямой кишки мыши), Нера 1-6 (гепатоклеточная карцинома мыши), А-431 (эпидермоидная карцинома человека), HaCat (иммортализованные кератиноциты человека), составляет 20 мкМ. В то же время требовалось 70 мкМ МНБ для подобного цитотоксического эффекта по отношению к зародышам вьюна. В связи с этим концентрация 20 мкМ (6,6 мкг/мл) МНБ была выбрана для одной из разрабатываемых противоопухолевых композиций.

ХТП-активность протеасом после инкубации клеток с МНБ определяли по гидролизу флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC. Минимальное ингибирующее действие на протеасомы клеток линий С26 и Нера 1-6 оказывал 10 мкМ МНБ, на клетки зародышей вьюна – 30 мкМ МНБ. С помощью разработанного в нашей лаборатории метода нативного электрофореза для неочищенных фракций протеасом исследовано действие МНБ на отдельные формы протеасом клеток рака прямой кишки С26. МНБ подавлял активность 26S-протеасом (но не других форм протеасом), не влияя при этом на их количество, что указывает на повреждение функций РА700-активатора – неотъемлемой части исключительно 26S-протеасом. Полученные результаты позволили выбрать МНБ в концентрации 10 мкМ (3,3 мкг/мл) для второй разрабатываемой противоопухолевой композиции. Терапевтические дозы рассчитывали исходя из 5 л объема крови пациентов. В качестве наполнителя использовали маннитол до 38,5 общей массы композиции (как в действующем препарате на основе бортезомиба).

Таким образом, нами были разработаны композиция БМ1 (Бортезомиб, МНБ), содержащая 0,9 мг бортезомиба, 33 мг МНБ, 4,6 мг маннитола, и БМ2, содержащая 0,35 мг бортезомиба, 16,5 мг МНБ, 21,65 мг маннитола. Для сравнения, действующий противоопухолевый препарат содержит 3,5 мг бортезомиба и 35 мг маннитола.

Для понимания механизма действия разработанных композиций необходимо было оценить сочетанные и отдельные эффекты их компонентов на протеасомы опухолей *in vitro*. В число исследуемых концентраций бортезомиба и МНБ вошли и те концентрации, которые использованы для БМ1 и БМ2. Как и ожидалось, МНБ не действовал на протеасомы *in vitro*, а бортезомиб ингибировал ХТП-активность концентрационно-зависимым

образом. Однако к нашему удивлению, совместно бортезомиб и МНБ оказывали синергетическое ингибирующее действие на протеасомы, которое детектировали Bliss-методом. Каким образом МНБ, не влияя на протеасомы, может усиливать ингибирующий эффект бортезомиба?

Для ответа на этот вопрос мы исследовали действие бортезомиба и МНБ на множественные формы протеасом гепатоклеточной карциномы Нера 1-6. Протеасомы осветленного гомогената клеток инкубировали в присутствии или отсутствии бортезомиба и МНБ и разделяли в 4-10% ПААГ в нативных условиях. Гель инкубировали в среде с субстратом (300 мкМ Suc-LLVY-AMC) и фотографировали флуоресцирующие полосы при 365 нм. Данный метод позволил выявить в гепатоклеточной карциноме три формы протеасом, различающихся наличием или отсутствием активаторов. Две наиболее активные в условиях эксперимента формы содержали активатор PA700 (26S-протеасома) или активатор PA28 $\alpha\beta$ . Наименее активная форма была свободна от активаторов (20S-протеасома). МНБ усиливал эффект бортезомиба в отношении каждой из этих трех форм. Мы предположили, что МНБ приоткрывает вход в протеолитическую камеру протеасом для бортезомиба за счет связывания гидрофобным фрагментом своей структуры гидрофобной пробки в структуре протеасом, предотвращающей случайное попадание белков в протеолитическую камеру. Этого приоткрывания, очевидно, недостаточно для свободного проникновения в протеолитическую камеру субстрата Suc-LLVY-AMC, молекулярная масса которого вдвое превышает молекулярную массу бортезомиба. Для проверки этого предположения дизайн эксперимента модифицировали следующим образом: после нативного электрофореза ХТП-активность в геле выявляли в присутствии 0,04% SDS. Как известно, такая низкая концентрация SDS полностью открывает гидрофобную пробку 20S-протеасом, что усиливает «поток» субстрата в протеолитическую камеру и его доступ к каталитическим центрам. Как и следовало ожидать, в нашем эксперименте 0,04% SDS привел к резкому увеличению активности 20S-протеасом, но не двух других форм протеасом. Крайне важно, что при этом исчезло усиливающее действие МНБ на ингибирующий эффект бортезомиба только по отношению к 20S-протеасомам, что обусловлено вытеснением из каталитического центра бортезомиба «хлынувшим» в протеолитическую камеру субстратом. Таким образом, синергетическое действие МНБ и бортезомиба на ХТП-активность протеасом связано с усилением проникновения бортезомиба в протеолитическую камеру.

Кроме того, были исследованы цитотоксические эффекты бортезомиба и МНБ, взятых по отдельности и совместно. Оказалось, что эти соединения проявляют синергетическое цитотоксическое действие по отношению к исследованным опухолевым клеткам Нера 1-6 и А-431. При этом синергетический эффект проявлялся как в отношении апоптоза, так и в отношении некроза.

Итак, полученные данные свидетельствуют о комбинированном действии разработанных композиций на протеасомы после проникновения в опухолевые клетки. Во-первых, МНБ вызывает нарушение функций PA700-активатора 26S-протеасом. Этот эффект обусловлен способностью хиноновой части молекулы МНБ генерировать супероксидные радикалы, повреждающие структуру белков во внутриклеточной среде. Во-вторых, бортезомиб совместно с МНБ синергетически ингибируют ХТП-активность тотального пула протеасом, скорее всего, за счет увеличения способности бортезомиба преодолевать входной барьер в протеасомы с помощью гидрофобного фрагмента молекулы МНБ. Перечисленные свойства МНБ и бортезомиба обуславливают их синергетический цитотоксический эффект. Все вышеизложенное дало нам основание предположить высокую противоопухолевую эффективность и низкую токсичность разработанных композиций *in vivo*. Мы проверили это предположение в доклинических исследованиях на моделях мышей и крыс.

Острую токсичность композиций оценивали по полулетальной дозе (ЛД<sub>50</sub>) для белых беспородных мышей и крыс в сравнении с действующим препаратом бортезомиба. Значения ЛД<sub>50</sub> композиций БМ1, БМ2 и бортезомиба были выше для мышей, чем для

крыс. Для мышей ЛД50 композиции БМ1 была в 4 раза, а композиции БМ2 – в 10-13 раз выше, чем ЛД50 бортезомиба. Для крыс ЛД50 композиции БМ1 была в 6-7 раз, а композиции БМ2 – в 12-14 раз выше, чем ЛД50 бортезомиба. В целом, для исследованных грызунов токсичность БМ1 и БМ2 была в 4–7 и 10–14 раз ниже соответственно, чем токсичность бортезомиба.

Противоопухолевые эффекты исследовали на растущих опухолях (гепатоклеточной карциноме Нера 1-6, аденокарциноме молочной железы Са 755 и карциноме легких Льюиса LLC1), инъецированных подкожно мышам C57Bl/6, по показателям торможения роста опухоли и выживаемости мышей. Для лечения вводили одинаковые дозы БМ1, БМ2 и бортезомиба (по 5,5 мг/кг), которые не превышали максимально переносимую дозу бортезомиба, наиболее токсичного препарата, дважды в неделю в течение трех недель. По обоим показателям композиции БМ1 и БМ2 были более эффективны, чем бортезомиб, по отношению к гепатоклеточной карциноме и аденокарциноме молочной железы и проявляли эффективность, сходную с бортезомибом, по отношению к карциноме легких Льюиса.

Таким образом, разработанные композиции БМ1 и БМ2 комбинированного действия на протеасомы представляют собой новое поколение бортезомиб-содержащих противоопухолевых препаратов, сочетающих высокую эффективность, низкую общую токсичность и потенциально расширенный спектр опухолей-мишеней.

*Работа частично выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-04-00017-а).*