

Введение

Костные метастазы являются одним из часто встречающихся осложнений опухолевых заболеваний, таких как миеломная болезнь, рак молочной железы, предстательной железы и ряда других.

В связи с этим, очевидно, что поиск способов и средств лечения костных метастазов для удлинения и улучшения качества жизни онкологических больных в настоящее время чрезвычайно актуален.

Создание эффективных и безопасных средств лечения метастазов костей может быть подразделено: а) разработка противоопухолевого препарата, обладающего высокой интенсивностью и максимально возможной селективностью воздействия; б) ингибирование процесса разрушения костной ткани, индуцированной опухолевым процессом и инициация ее восстановления; в) доставка лекарственного вещества в патологический очаг кости.

Выбор противоопухолевых веществ обусловлен тем, что:

ФНО-альфа обладает прямым цитостатическим, цитотоксическим и апоптогенным действием в отношении опухолевых клеток, а также способностью повышать активность клеток иммунной системы, участвующих в реализации противоопухолевого иммунного ответа (Lejeune F.J., Ruegg C., 2006; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Шмелев В.А., 2008).

ФНО-альфа, подобно ряду других цитокинов, принимает активное участие в регуляции процессов ремоделирования кости, обеспечивая поддержание баланса между активностью остеобластов и остеокластов (Коровина Н.А., Творогова Т.М., Гаврюшова Л.П. и соавт. 2005; Риггз Б.Л., Мелтон Л., 2000; Храмова С.Н., Щеплягина Л.А. 2005).

Бифосфонат - алендроновая кислота отличается высоким сродством к костной ткани, активизирует процесс ремоделирования кости, способен ингибировать процесс модификации белков в остеокластах и обладает высоким аффинитетом к гидроксиапатиту костного матрикса.

Цель исследования. Разработка метода получения препарата рекомбинантного ФНО-альфа человека, ковалентно связанного с алендроновой кислотой, оценка его физико-химических и биологических свойств.

Материалы и методы

рчФНО-альфа, полученный ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; - фактор некроза опухоли альфа рекомбинантный человеческий (субстанция) концентрацией белка 1,95 мг/мл и удельной специфической активностью 2,5*10⁸ МЕ/мг производства ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» по ЭПР № 00479979-32-00 «Фактор некроза опухоли альфа человеческого рекомбинантный (субстанция)», соответствующий требованиям проекта ФСП «Фактор некроза опухоли альфа человеческого рекомбинантный (рчФНО-альфа) Тазонермин субстанция»;

Алендроновая кислота, pharm grade 66376-36-1;

Альбумин бычий сывороточный Кат.# BSA.0025ф, >99,0%;

Гидроксиапатит BIO-RAD, № 130-0520;

Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, Thermo scientific;

Животные. Мыши DBA/2, самцы, массой 18-22 г., полученные из вивария ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии» СО РАМН (г. Новосибирск).

Методы Определение содержания белка в препарате проводили по СОП № СМА 1.5-002/02-2012 «Определение содержания белка по Лоури»

Способность ФНО-альфа в составе конъюгатов образовывать тримеры оценивали с помощью гель-фильтрации в нативных условиях на сорбенте Сефакирил S-200 [Скоупс Р, 1985].

Определение молекулярной массы ФНО-альфа проводили методом электрофореза в 12%-ном ПААГ в редуцирующих и нередуцирующих условиях. (Laemmli U.K., 1970).

Специфическую цитолитическую активность рчФНО-альфа (субстанция) определяли на культуре мышечных фибробластов L929 в присутствии актиномицина D методом, описанным в проекте ФСП «Фактор некроза опухоли альфа человеческого рекомбинантный (рчФНО-альфа)». В качестве стандарта использовали Отраслевой стандартный образец активности рчФНО-альфа (ОСО 42-28-400-08), специфическая активность которого установлена относительно Международного стандартного образца рчФНО-альфа rhTNF-альфа фирмы «Селтек» (Англия, каталожный номер 1740/58).

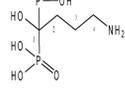
Метод изучения накопления конъюгатов алендроновой кислоты с ФНО-альфа в опухолевой ткани проводили на модели костных метастазов, индуцированных введением мышам клеток лимфоцитарного лейкоза L1210/1. Животные были разделены на 3 группы, две опытных и контрольную. Животные первой опытной группы (17 особей) получали инъекцию ФНО-альфа, второй опытной группы (17 голов) - конъюгат ФНО-альфа с алендроновой кислотой. Третья группа - контроль (мыши с опухолью без введения препаратов (5 особей)).

Препараты вводили однократно внутривенно в дозе 0,45 мкг белка на 20 г массы тела в объеме 0,5 мл. у животных всех групп. В супернатантах гомогенатов темных костей черепа определяли содержание ФНО-альфа через 1, 4 и 24 ч после введения препаратов иммуноферментным методом с помощью набора реагентов «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», п.г.т. Кольцово, Новосибирская обл.). Диапазон измерения 0-250 пг/мл, чувствительность набора - 2 пг/мл.

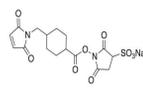
Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Statgraphics, Vers.5.0» (Statistical Graphics Corp., USA).. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез (p) принимали равным 0,05.

Результаты исследований

Структура алендроновой кислоты (4-амино-1-гидроксибутиленди)-дифосфоновая кислота, C₄H₁₂NNaO₇P₂, М.м. 325,1)



Sulfo-SCMM (сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилат) – сукцинимид



Sulfo-SMCC способен вступать в реакцию со свободными аминогруппами алендроновой кислоты по связи N-О, образуя амидную связь. В результате образуется активный комплекс, который в дальнейшем способен вступать в реакцию с сульфидными группами (-SH) белка ФНО-α по двойной связи имида малеиновой кислоты с образованием конъюгата

Схема проведения синтеза конъюгатов

Экспериментальные образцы конъюгатов алендроновой кислоты с ФНО-альфа получали методом твердофазного синтеза с использованием Sulfo-SCMM по схеме

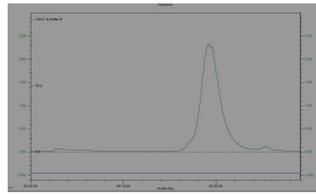


Рис.1. Профиль хроматографии конъюгата ФНО-альфа и АЛН, полученного на твердой фазе.

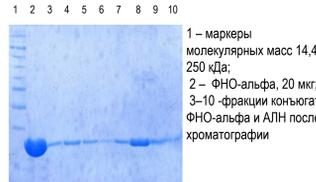


Рис.2. Электрофореграмма фракций конъюгата ФНО-альфа с АЛН в 15% ПААГ.

Определение способности к ди- и тримеризации ФНО-альфа в составе конъюгата

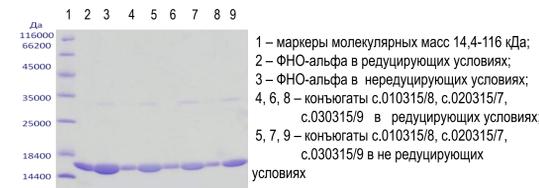


Рис.1. Электрофореграмма ФНО-альфа и его конъюгатов с АЛН. Электрофорез в 12% ПААГ, окрашивание Кумасси R-250.

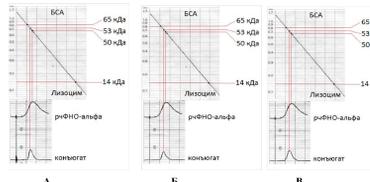


Рис.2. Определение молекулярной массы конъюгатов ФНО-альфа с алендроновой кислотой в нативных условиях методом гель-фильтрации на Сефакириле S-200

Показано, что ФНО-альфа в составе конъюгатов представлен мономерной и димерной (следовые количества) формами (рис.1). Молекулярная масса ФНО-альфа в составе конъюгатов в мономерной форме соответствовала 16,7 кДа, в форме димера - 32 кДа, что соответствует характеристикам исходного ФНО-альфа. Методом гель-фильтрации на Сефакириле S-200 установлено, что молекулярная масса конъюгированных ФНО-альфа (53 кДа) соответствовала молекулярной массе ФНО-альфа в форме тримера (рис.2).

Конъюгирование ФНО-альфа с алендроновой кислотой НЕ приводит к утрате способности ФНО-альфа к тримеризации, что является необходимым для сохранения биологической активности белка

Рис.3. Динамика сорбции свободной алендроновой кислоты и в составе конъюгата (А) и свободного ФНО-альфа и ФНО-альфа в составе конъюгата на гидроксиапатите (Б)

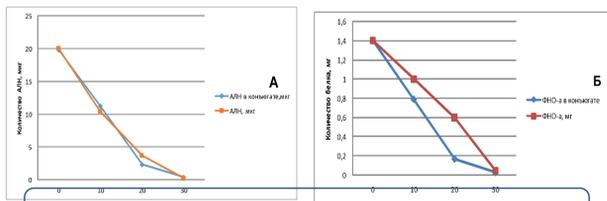
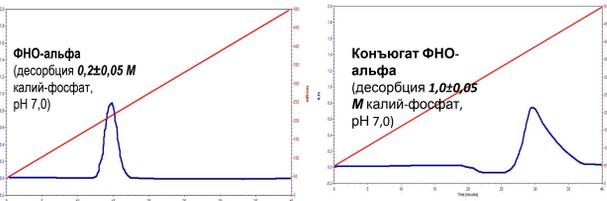


Рис. 4. Динамика десорбции свободного ФНО-альфа и ФНО-альфа в составе конъюгата на колонке с гидроксиапатитом



Конъюгат ФНО-альфа с алендроновой кислотой обладает высоким сродством к гидроксиапатиту, аналогу минерального матрикса костной ткани.

Данные о специфической активности конъюгата ФНО-альфа и с алендроновой кислотой

Таблица 1- Характеристики экспериментальных образцов конъюгатов ФНО-альфа с алендроновой кислотой

Образец конъюгата	концентрация белка, мг/мл	Содержание алендроновой кислоты, мкг/мл	Электрофоретическая чистота, %	Активность, МЕ/мл
010315/8	0,73	10,0	95,3	1,55*10 ⁷
020315/7	1,4	15,3	95,3	3,1*10 ⁷
030315/9	0,74	10,0	95,7	1,55*10 ⁷
010315/8 (лиоф)	0,73	10,0	95,1	1,24*10 ⁷
020315/7 (лиоф)	1,47	15,3	95,4	1,24*10 ⁷
030315/9 (лиоф)	0,84	10,0	95,1	1,24*10 ⁷
Исходная субстанция ФНО-альфа	1,95	-	95,5	4,96*10 ⁸

Специфическая цитолитическая активность ФНО-альфа в составе конъюгатов всех трех серий остается на высоком уровне. Процесс лиофилизации не оказывал существенного влияния на активность конъюгатов.

Биологические исследования

Исследование накопления конъюгатов алендроновой кислоты с ФНО-альфа в гомогенатах темных костей

В экспериментах использовали препарат ФНО-альфа (субстанция) с концентрацией белка 1,28 мг/мл и специфической активностью 7,0*10⁷ МЕ/мг; конъюгат алендроновой кислоты с ФНО-альфа (Sulfo-SMCC): концентрация белка 1,4 мг/мл, алендроновой кислоты 15,3 мкг/мл и активностью 2,2*10⁷МЕ/мг;

Таблица 2- Уровень ФНО-альфа (пг/г ткани) в гомогенатах темных костей самцов мышей DBA/2 с трансплантированной опухолью лейкоза L1210/1 после однократного внутривенного введения препаратов

Препарат	Уровень ФНО-альфа (пг/г ткани) в гомогенатах темных костей мышей		
	1 час	4 часа	24 часа
ФНО-альфа, субстанция	906 ± 218	1531 ± 185	1527 ± 144
Конъюгат ФНО-альфа с АЛН	5202 ± 453	4194 ± 569	5157 ± 411
Контроль (без введения препарата)	1711 ± 116		

* - отличия статистически значимы, по сравнению с контролем (p<0,05)
** - отличия статистически значимы, по сравнению с субстанцией ФНО-альфа (p<0,05)

Содержания ФНО-альфа в области локализации метастатического узла показал, что его концентрация у мышей, получавших конъюгат ФНО-альфа с АЛН, через час после введения возрастала в 3 раза по сравнению с контролем, и сохранялась на этом уровне в течение всего периода наблюдения. В группе сравнения показатели не выходили за границы диапазона значений мышей контрольной группы.

Данные свидетельствуют о способности конъюгатов алендроновой кислоты с ФНО-альфа накапливаться в тканях метастатического узла темных костей мышей, более выраженной, чем у исходных белков.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют что :

1. Выбранные условия синтеза на нерастворимом носителе позволяют получать конъюгаты ФНО-альфа с Sulfo-SCMM (сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилат)-сукцинимид, с заданной стехиометрией, исключают образование межмолекулярных сшивок белка.
2. Молекулярная масса ФНО-альфа в составе конъюгата соответствует молекулярной массе исходного белка. Подтверждена способность ФНО-альфа в составе конъюгата к образованию тримеров в физиологических условиях.
3. Анализ специфической активности конъюгата ФНО-альфа с алендроновой кислотой подтвердил сохранность цитотоксических свойств ФНО-альфа в составе конъюгата.
4. На модели костной ткани *in vitro* показано, что конъюгат ФНО-альфа с алендроновой кислотой обладают высоким сродством к гидроксиапатиту, аналогу минерального матрикса костной ткани.
5. На модели костных метастазов, индуцированных введением мышам клеток лимфоцитарного лейкоза L1210/1, установлено, что конъюгат ФНО-альфа с алендроновой кислотой более интенсивно накапливается в клетках метастатического узла по сравнению с исходными белками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0061 от 27.06.2014г. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEF60414X0061