

УДК 577.29

УДАЛЕНИЕ ТРАНСЛОКАЦИОННОГО ДОМЕНА И САЙТА РАСЩЕПЛЕНИЯ ФУРИНОМ УМЕНЬШАЕТ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТЬ НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ТОКСИНОВ

Ю. М. Ходарович*, Е. В. Коновалова, А. А. Шульга, С. М. Деев,
академик РАН Р. В. Петров

Поступило 15.08.2019 г.

Направленные токсины являются перспективными противораковыми агентами, позволяющими селективно уничтожать раковые клетки за счёт повышенного содержания на их поверхности онкоспецифических маркёров. Применение таких противораковых токсинов в медицине сдерживается в основном их высокой неспецифической токсичностью, в особенности гепатотоксичностью. В экспериментах на клетках человека мы показали, что удаление транслокационного домена токсина DARPin-PE40 приводит к уменьшению гепатотоксичности и неспецифической активности. Такой же эффект наблюдается и при инактивации в молекуле DARPin-PE40 сайта расщепления фурином. Одновременное удаление как транслокационного домена, так и сайта расщепления фурином показало наилучшие результаты. Такая модификация токсина может найти применение при создании противораковых направленных токсинов с повышенной селективностью.

Ключевые слова: псевдомонадный токсин, терапия рака, таргетная терапия, фурин, направленный токсин.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524892209-212>

Направленный токсин представляют собой гибридный белок, состоящий из двух фрагментов. Первый, адресный, фрагмент способен высокоафинно связываться с онкоспецифическим рецептором на поверхности клеток. Второй фрагмент является частью белкового токсина и при попадании в клетку убивает её. Развитие идеи использования направленных токсинов продолжается уже более двух десятилетий и привело к созданию двух одобренных к применению препаратов: Ontak™ для лечения рецидивирующей кожной Т-клеточной лимфомы и препарата moxetumomab pasudotox для терапии волосатоклеточного лейкоза. Однако, несмотря на имеющиеся успехи, большинство разработок направленных токсинов окончилось неудачей. Основной причиной неудачного завершения испытаний направленных токсинов была высокая неспецифическая активность препаратов [1]. Неспецифическая активность направленных токсинов может объясняться наличием целевых рецепторов на поверхности не только опухолевых, но и здоровых клеток. Другая причина неспецифической активности может быть связана со взаимодействием с поверхностью клеток не адресной части токсина,

а фрагмента, несущего цитотоксическую функцию [2]. Какие последовательности токсичного фрагмента отвечают за неспецифическое взаимодействие с клетками и возможно ли их удаление с сохранением цитотоксичности токсина, в настоящее время остаётся малоизученным вопросом. Так, было показано, что удаление транслокационного домена во фрагменте псевдомонадного токсина приводит к незначительному падению токсичности направленного токсина и многократному увеличению максимально переносимой дозы у мышей [3]. Авторы этой работы предположили, что данный эффект связан с уменьшением гепатотоксичности модифицированного варианта токсина у мышей. Стоит отметить, что сравнение гепатотоксичности токсинов на клетках человека в этой работе проведено не было.

Ранее нами были разработаны направленные токсины DARPin-PE40 [4] и DARPin-LoPE [5], селективно уничтожающие клетки с повышенным содержанием онкоспецифического рецептора ERBB2. Этот рецептор часто используется при разработке различных направленных противораковых агентов [6]. Различие между разработанными нами токсинами заключается в использовании в токсине DARPin-LoPE низкоиммунногенного варианта фрагмента псевдомонадного токсина с удалённым транслокационным доменом. Целью на-

*Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии наук, Москва
E-mail: khodarovich@mail.ru

стоящей работы было сравнительное изучение токсичности белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE, а также вариантов этих белков с инактивированным сайтом расщепления фурином на линии клеток гепатоцитов человека. Токсины с инактивированным сайтом расщепления фурином DARPin-PE40-F⁻ и DARPin-LoPE-F⁻ отличаются от исходных токсинов заменой последовательности RHRQPRGWEQL, узнаваемой фурином, на последовательность GQAGFSLPAG. Схема изучаемых токсинов приведена на рис. 1.

Направленные токсины (рис. 1) выделялись и очищались, как это было описано в [4, 5]. Было показано, что белки DARPin-PE40-F⁻ и DARPin-LoPE-F⁻, в которых была проведена замена сайта расщепления фурином, действительно приобретают устойчивость к расщеплению фурином (данные не приведены). Для определения гепатотоксичности направленных токсинов использовали линию клеток печени человека HepG2. Клетки HepG2 являются в настоящее время общепризнанной и наиболее распространённой клеточной моделью для определения гепатотоксичности препаратов [7, 8]. Для сравнения цитотоксичность направленных токсинов также измеряли с использованием линий клеток с различным содержанием рецептора ERBB2. Использовали линии клеток BT474 и SCOV3 с высоким количеством рецептора ERBB2, линии клеток HEK293 и AsPc1 с низким количеством рецептора ERBB2 и клетки RAJI, на поверхности которых рецептор практически отсутствует [9]. Тестирование направленных токсинов проводили путём добавления токсинов в лунки с клетками с последующей

инкубацией в течение 5 дней. Цитотоксичность оценивали с помощью МТТ-теста. Результаты тестов приведены в табл. 1.

Видно, что удаление транслокационного домена приводит к снижению токсичности в 10–70 раз, примерно такое же снижение токсичности наблюдалось и при инактивации сайта расщепления фурином, причём эти две модификации действуют независимо. В целом токсичность белков зависит от количества рецепторов на поверхности клеток, за исключением клеток HepG2, у которых оказалась аномально высокая чувствительность к токсинам. Измерение количества рецептора ERBB2 на поверхности клеток HepG2 показало, что его в 30 раз меньше, чем на поверхности клеток BT474, и примерно соответствует содержанию рецептора на поверхности клеток HEK293. Таким образом, аномально высокая чувствительность клеток HepG2 к действию направленных токсинов связана скорее всего с неспецифическим взаимодействием клеток HepG2 с токсичной частью молекулы.

Таблица 1. Результаты измерения токсичности направленных токсинов (IC50)

	IC50, нМ			
	DARPin-PE40	DARPin-PE40-F ⁻	DARPin-LoPE	DARPin-LoPE-F ⁻
SCOV3	0,09	1,50	1,31	30,22
BT474	0,07	0,89	0,75	3,67
AsPc1	0,11	10,24	18,61	624,80
HEK293	0,12	10,71	20,08	1306,00
RAJI	241,70	1051,00	374,70	>2000
HEPG2	0,000037	0,45	0,92	60,51

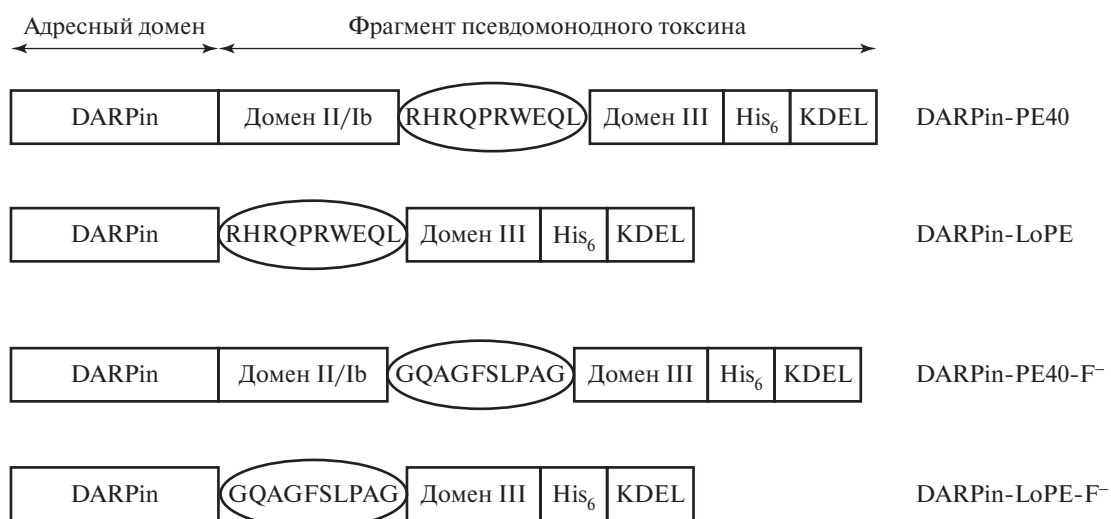


Рис. 1. Схематическое изображение используемых в работе направленных токсинов DARPin — дарпин 9.29, селективно связывающийся с рецептором ERBB2. His₆ — С-концевая гексагистидиновая метка. KDEL — сигнал транспорта в эндоплазматический ретикулум.

Наиболее высокая относительная гепатотоксичность наблюдалась для немодифицированного токсина DARPIn-PE40, для которого клетки печени были более чем в 2000 раз более чувствительны к действию токсина, чем, например, клетки рака молочной железы человека BT474. Токсин с инактивированным сайтом протеолиза фурином, а также токсин с удалённым транслокационным доменом обладают примерно одинаковой токсичностью как для клеток печени человека, так и для клеток BT474 (табл. 1). Одновременное использование данных модификаций (белок DARPIn-LoPE-F⁻) позволило добиться преимущественного уничтожения клеток рака молочной железы (BT474), а не клеток печени (различие в IC₅₀ 16 раз). Стоит отметить, что аналогичные тенденции уменьшения относительной гепатотоксичности наблюдались не только в случае сравнения действия токсинов на клетки HerG2 и клетки BT474, но и для других линий клеток. Таким образом, одновременное удаление транслокационного домена и инактивация сайта протеолиза позволяют существенно снизить гепатотоксичность направленных токсинов и могут быть использованы при дальнейшей разработке терапевтических препаратов.

Информация о конфликте интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, который может иметь отношение к содержанию сообщения.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–04–00212 А. Работы по выделению и очистке направленных токсинов были выполнены при поддержке Российского научного фонда, проект № 19–14–00112. Работа Е.В. Коноваловой была выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18–34–00899 мол-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Allahyari H., Heidari S., Ghamgosha M., et al.* Immunotoxin: A new tool for cancer therapy // *Tumour Biol.* 2017. V. 39. № 2: 1010428317692226.
2. *Bokori-Brown M., Metz J., Petrov P.G., et al.* Interactions between *Pseudomonas* Immunotoxins and the Plasma Membrane: Implications for CAT-8015 Immunotoxin Therapy // *Front Oncol.* 2018. V. 8: 553.
3. *Weldon J.E., Xiang L., Chertov O., et al.* A protease-resistant immunotoxin against CD22 with greatly increased activity against CLL and diminished animal toxicity // *Blood.* 2009. V. 113. № 16. P. 3792–3800.
4. *Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., et al.* Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPIn possesses a strong selective cytotoxic effect in vitro and a potent antitumor activity in vivo // *J. Control Release.* 2016. V. 233. P. 48–56.
5. *Sokolova E., Shilova O.N., Kiseleva D.V., et al.* HER2-Specific targeted toxin DARPIn-LoPE: immunogenicity and antitumor effect on intraperitoneal ovarian cancer xenograft model // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 10: 2399.
6. *Glinka E.M., Edelweiss E., Sapozhnikov A.M., et al.* A new vector for controllable expression of an anti-HER2/neu mini-antibody-barnase fusion protein in HEK 293T cells // *Gene.* 2006. V. 17. № 366. P. 97–103.
7. *Donato M.T., Jover R., Gómez-Lechón M.J.* Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering // *Curr. Drug Metab.* 2013. V. 14. № 9. P. 946–968.
8. *Guo L., Dial S., Shi L., et al.* Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes // *Drug Metab. Dispos.* 2011. V. 39. № 3. P. 528–538.
9. *Oberg H.H., Kellner C., Gonnermann D., et al.* Tribody [(HER2)2xCD16] is more effective than trastuzumab in enhancing $\gamma\delta$ T cell and natural killer cell cytotoxicity against HER2-expressing cancer cells // *Front Immunol.* 2018. V. 19. № 9: 814.

**REMOVAL OF THE TRANSLOCATION DOMAIN
AND THE FURIN CLEAVAGE SITE DECREASES
THE RELATIVE HEPATOTOXICITY OF THE TARGETED ANTITUMOR TOXINS**

**Yu. M. Khodarovich, E. V. Konovalova, A. A. Schulga, S. M. Deyev,
Academician of the RAS R. V. Petrov**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Received August 15, 2019

Targeted toxins are promising anticancer agents that allow selectively destroying cancer cells due to the increased content of onco-specific markers on their surface. The use of such anti-cancer toxins in medicine is mainly hampered by their high non-specific toxicity, in particular, hepatotoxicity. In our work on human cell line, we have shown that the removal of the DARPIn-PE40 translocation toxin domain leads to a decrease in hepatotoxicity. The same effect is also observed when inactivation of the furin cleavage site in the DARPIn-PE40 molecule was done. Simultaneous removal of both the translocation domain and the furin cleavage site showed the best results. This toxin modification can be used to create more selective anti-cancer toxins.

Keywords: pseudomonas toxin, cancer therapy, targeted therapy, furin, targeted toxin.