



Противоопухолевая активность формируемых *in situ*
фармакологических пар C115H метионин–гамма-лиазы *Clostridium*
novuі и сульфоксидов S-алкил-замещенного L-цистеина

Або Кура Луай

к.б.н., младший научный сотрудник,
Российский университет дружбы народов
НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

louay.ko@gmail.com

Принцип действия фармакологической пары

В организм пациента вводится

А

Б

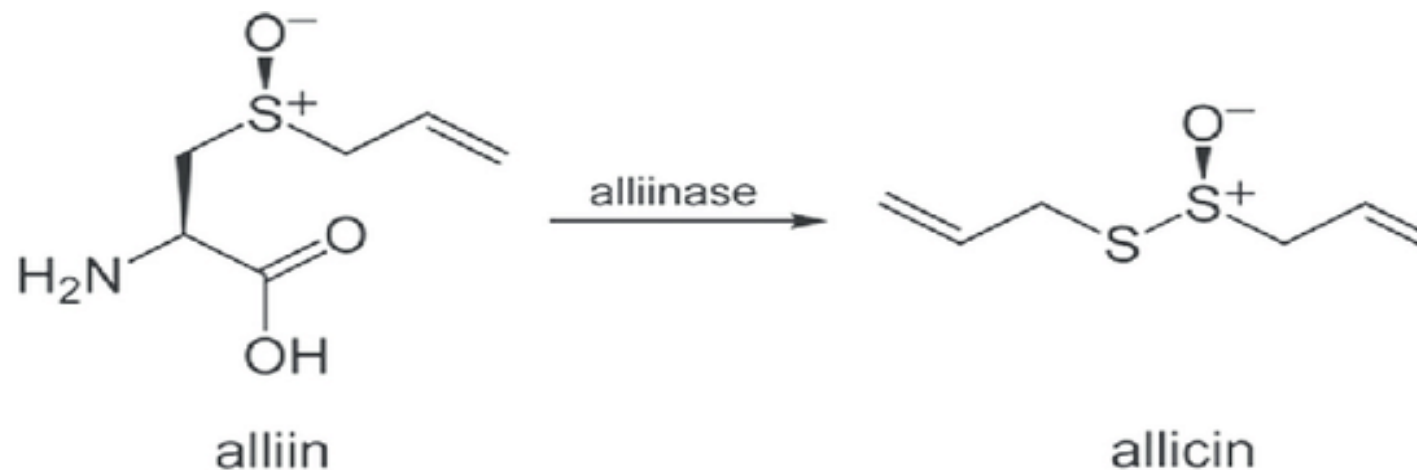
нетоксичное пролекарство + преобразующий его в токсичное соединение фермент

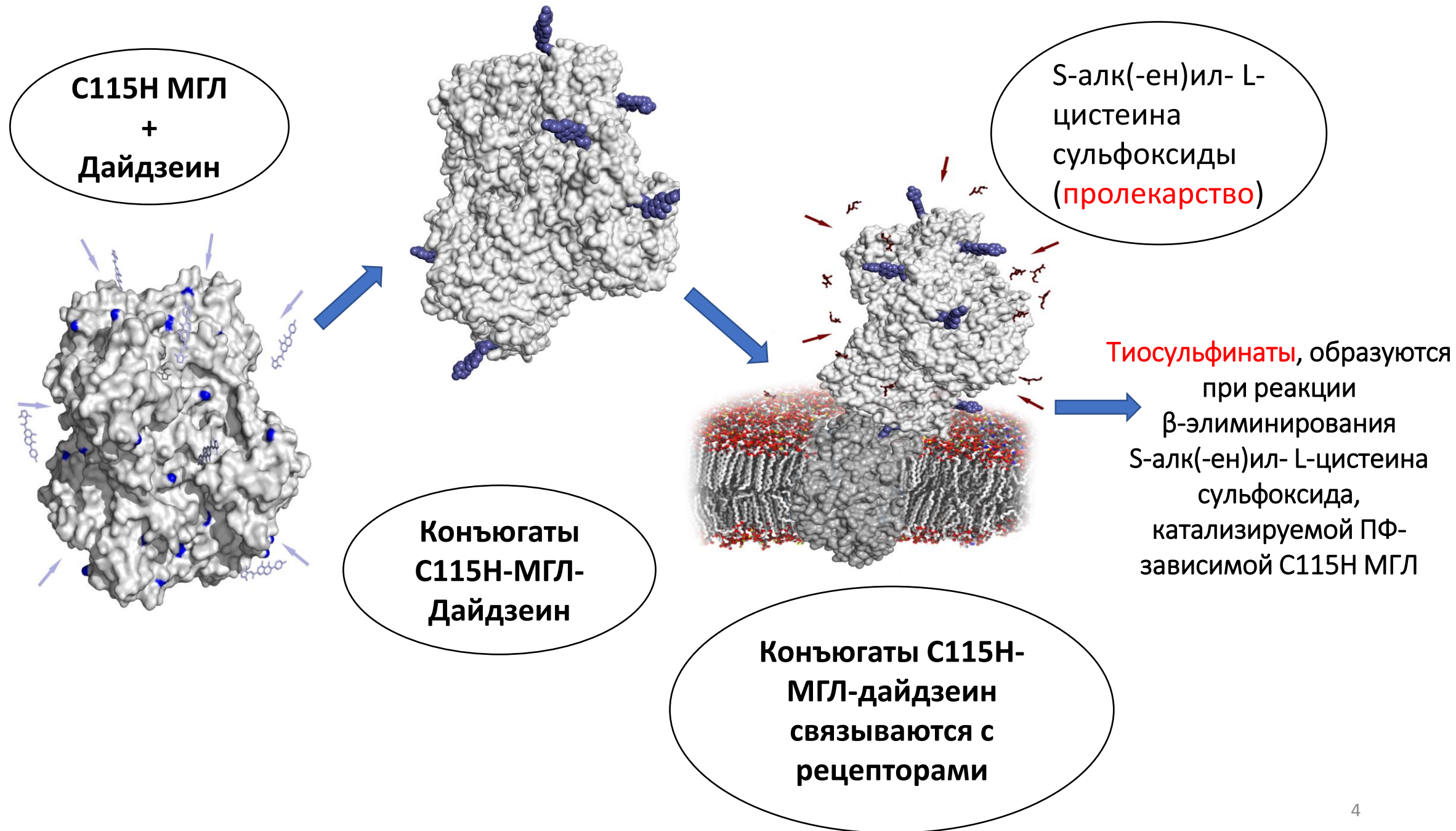
Токсичное соединение образуется непосредственно вблизи опухолевой клетки

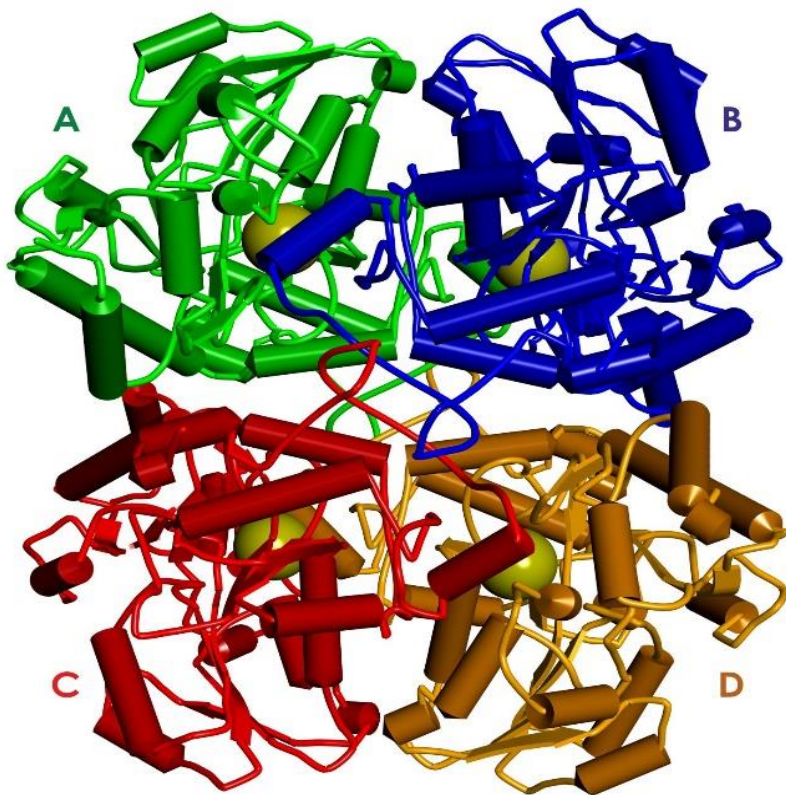
= за счет направленной доставки пролекарства, либо

= за счет направленной доставки фермента [ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy)]

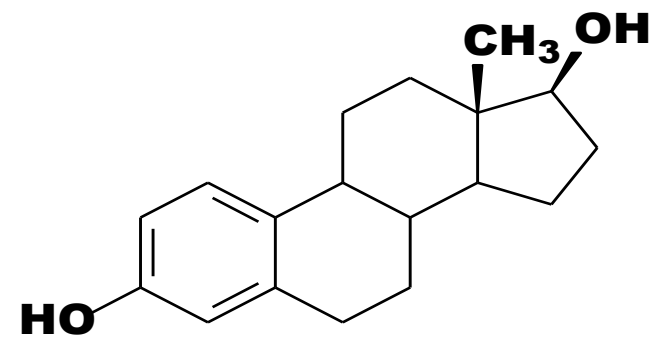
[Аллииназа + аллиин]



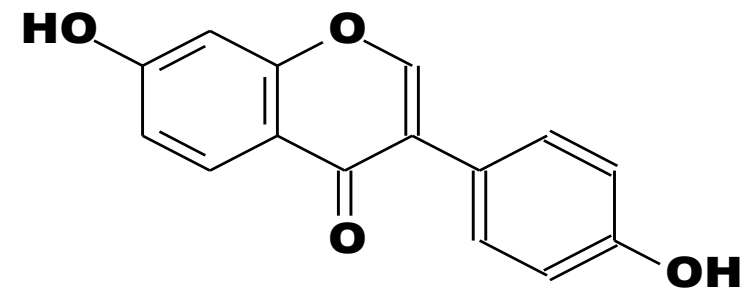




C115H метионин – γ -лиаза



E₂ Estradiol

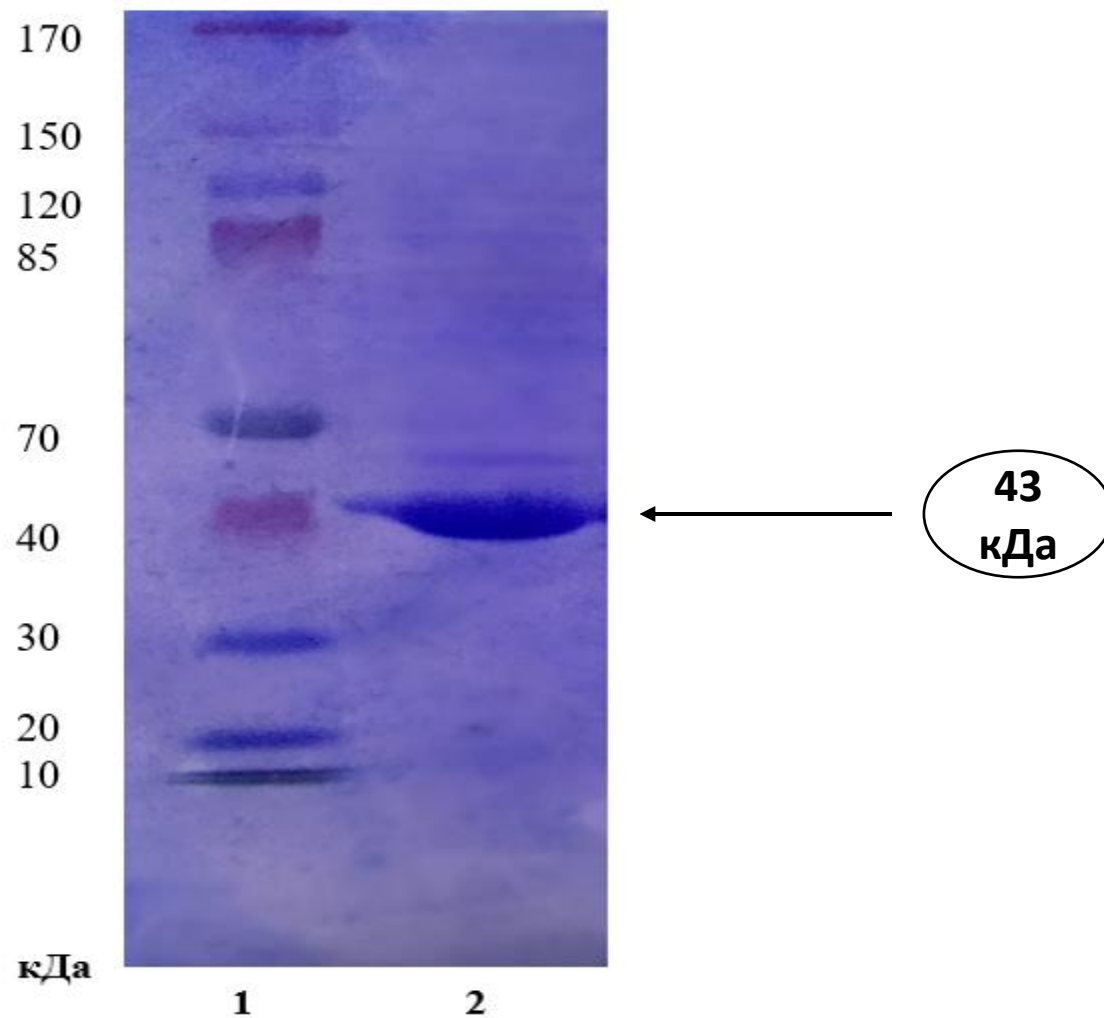


Daidzein

Выделение и очистка С115Н МГЛ из *Clostridium novyi*

Стадия	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, Ед/мг
Озвучивание	23	48,6	-
Осаждение нуклеиновых кислот протаминсульфатом	23	40	8
ДЕАЕ-сефароза	4,5	57,85	28,48
Очистка от эндотоксинов	3,8	59,2	28,7

ДСН-ПААГ (SDS-PAGE)-электрофорез



1 — Маркер молекулярного веса белков; 2 — С115Н МГЛ после хроматографического этапа очистки

Комплекс C115H МГЛ-дайдзеин

Субстрат	Удельная активность, Ед/мг	
	C115H МГЛ	C115H МГЛ-дайдзеин
S-метил-L-цистеин	28,7	25,2

* Ratio $\frac{\text{комплекс C115H МГЛ-дайдзеин (mol/L)}}{\text{C115H МГЛ (mol/L)}} = 1,5$

ERLANGER BF, BOREK F, BEISER SM, LIEBERMAN S.

Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone.

J Biol Chem. 1957 Oct;228(2):713-27. PMID: 13475354.

I . Цитотоксичность конъюгатов C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов

	Культура клеток	IC ₅₀ C115H МГЛ-Dz, μM				
		Аллиин	Метиин	Этиин	Пропиин	Без субстратов
Фибробласты	HEK-293	-	-	-	ND	ND
Клетки плаценты	-	-	-	-	ND	ND
Клетки рака молочной железы	MCF7	1,3 ± 0,09	0,4 ± 0,04	0,3 ± 0,03	0,5 ± 0,04	ND
	SKBR3	1,0 ± 0,06	14,5 ± 1,10	0,8 ± 0,05	1,1 ± 0,08	ND
	T-47D	2,1 ± 0,18	2,8 ± 0,23	2,2 ± 0,16	1,9 ± 0,18	ND
Клетки рака толстой кишки	HT29	10,4 ± 1,10	7,5 ± 0,67	9,1 ± 0,81	6,9 ± 0,40	ND
	COLO205	ND	ND	ND	ND	ND
	SW620	ND	ND	ND	ND	ND
Клетки рака поджелудочной железы	Panc1	4,5 ± 0,21	5,7 ± 0,90	5,3 ± 0,10	3,8 ± 0,10	ND
	MIA-PACA2	-	-	-	6,4 ± 0,50	ND
Клетки рака предстательной железы	22Rv1	8,6 ± 0,08	9,8 ± 0,98	9,9 ± 1,20	5,4 ± 0,20	ND
	DU145	-	-	-	17,4 ± 0,90	ND
	PC3	-	-	-	16,9 ± 0,50	ND

Концентрация сульфоксидов 1 мг/мл;

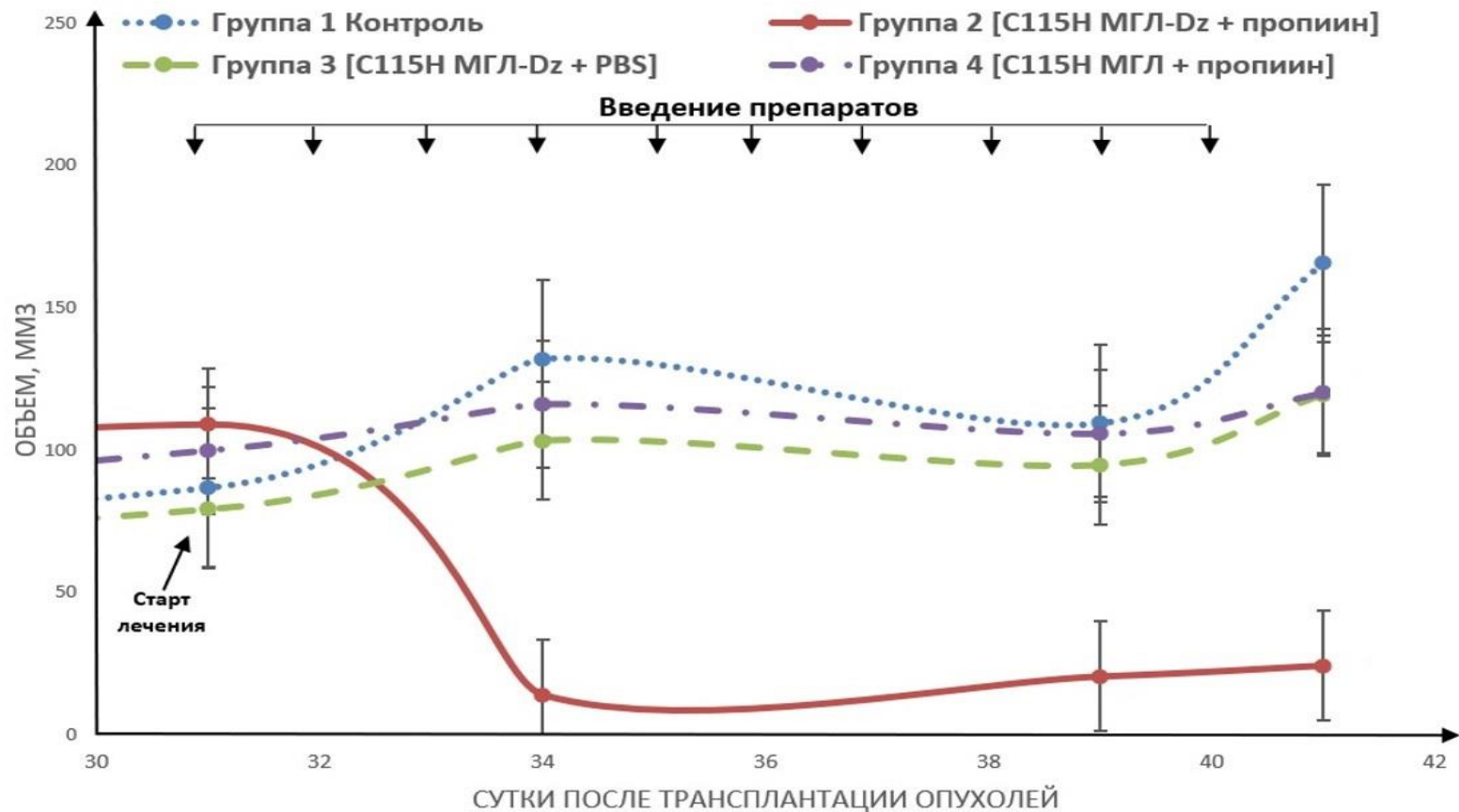
ND — не обнаружено

II. Цитотоксичность дипропилтиосульфидата

	Клетки	Дипропилтиосульфидат
		IC ₅₀ (μM)
Фибробласты	HEK-293	34,23 ± 0,21
Плацента	-	42,10 ± 0,54
Рак молочной железы	MCF7	15,03 ± 0,14
	SKBR3	60,10 ± 0,58
	T47D	51,75 ± 0,55
Рак толстой кишки	HT-29	43,10 ± 0,47
	COLO205	48,61 ± 0,53
	HCT116	43,42 ± 0,48
	SW620	19,20 ± 0,20
Рак поджелудочной железы	Panc1	18,64 ± 0,19
	MIA-PaCa2	62,62 ± 0,65
Рак предстательной железы	22Rv1	66,36 ± 0,69
	DU 145	60,99 ± 0,61

Рак молочной железы

Модель ксенографтов **SKBR3**



Группа	ТРОmax, %
[C115H МГЛ-Dz + пропиин]	85,2; p= 0,04
[C115H МГЛ-Dz + PBS]	27,8; p= 0,3
[C115H МГЛ + пропиин]	27,4; p= 0,3

Группа 1 — контроль, PBS в/б в объеме 200 мкл, через 1,5 часа введение 100 мкл PBS внутрь опухоли.

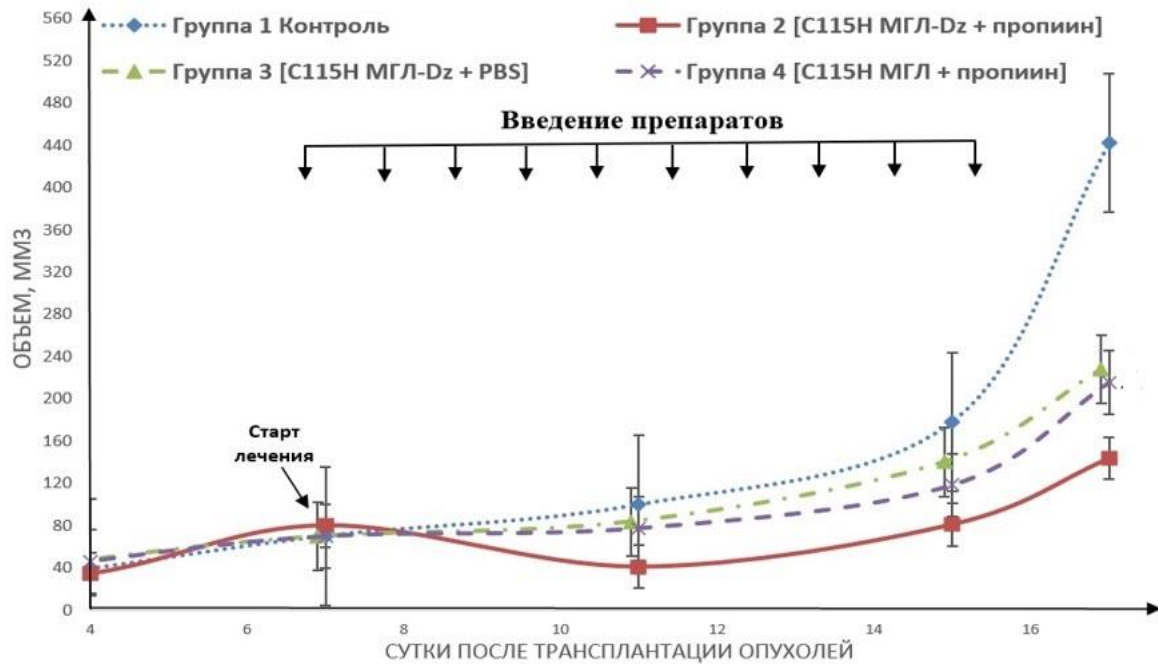
Группа 2 — введение в/б 30 Ед C115H МГЛ-Dz в 200 мкл PBS, через 1,5 часа введение внутрь опухоли 3 мг пропиина в 100 мкл PBS.

Группа 3 — аналогично группе 2, но вместо пропиина вводили PBS.

Группе 4 — вводили неконъюгированную C115H МГЛ (30 Ед. в 200 мкл PBS) с последующей инъекцией пропиина (3 мг в 100 мкл PBS).

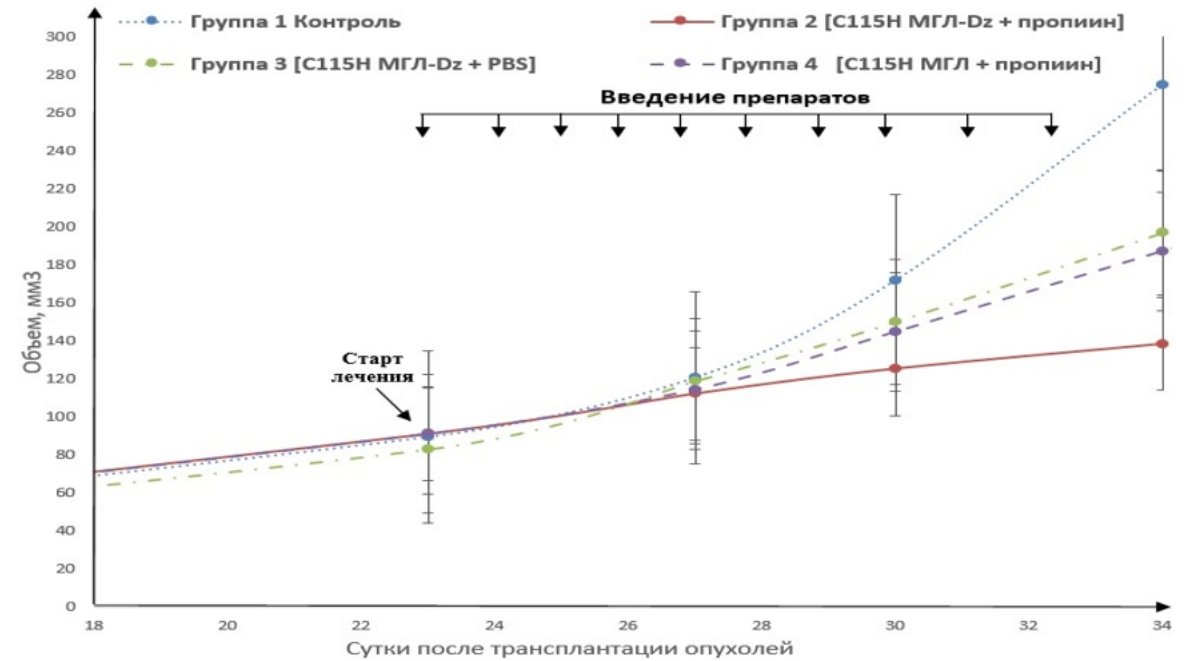
Рак поджелудочной железы

Модель ксенографтов **Panc1**



Группа	ТРОмах, %
[C115H МГЛ-Dz + пропиин]	67,51; p= 0,004
[C115H МГЛ-Dz + PBS]	48,54; p= 0,160
[C115H МГЛ + пропиин]	51,30; p= 0,462

Модель ксенографтов **MIA-PaCa2**



Группа	ТРОмах, %
[C115H МГЛ-Dz + пропиин]	50,0; p= 0,011
[C115H МГЛ-Dz + PBS]	28,3; p= 0,439
[C115H МГЛ + пропиин]	32,0; p= 0,606

Группа 1 — контроль, PBS в/б в объеме 200 мкл, через 1,5 часа введение 100 мкл PBS внутрь опухоли.

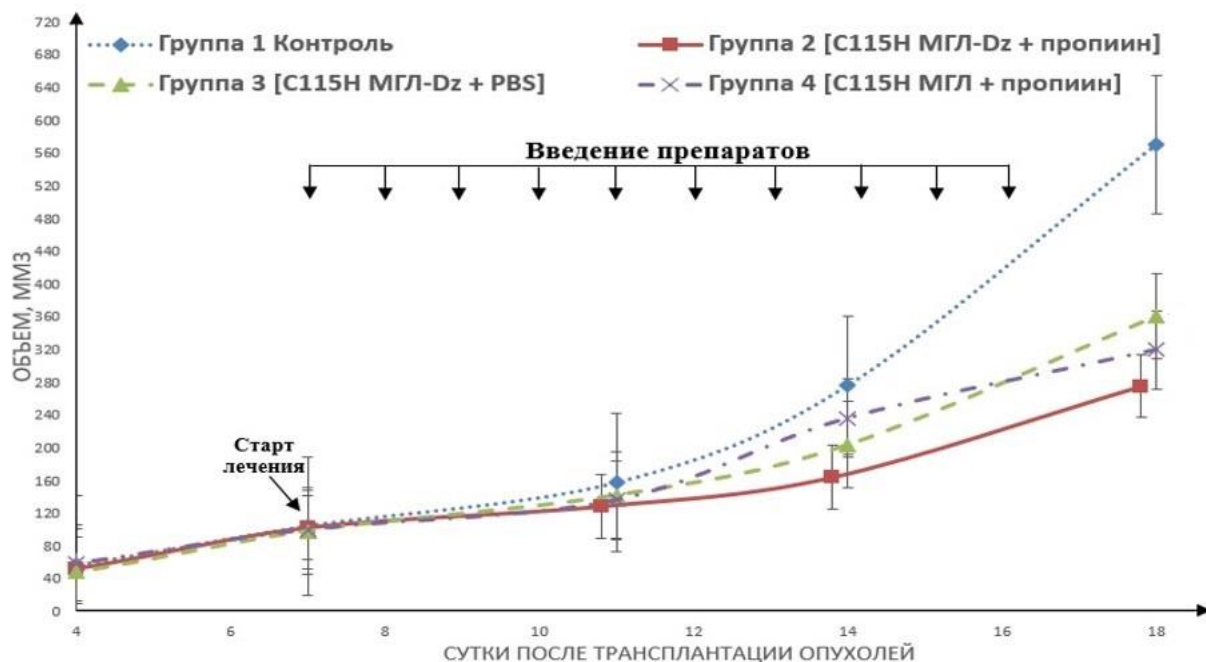
Группа 2 — введение в/б 30 Ед C115H МГЛ-Dz в 200 мкл PBS, через 1,5 часа введение внутрь опухоли 3 мг пропиина в 100 мкл PBS.

Группа 3 — аналогично группе 2, но вместо пропиина вводили PBS.

Группе 4 — вводили неконъюгированную C115H МГЛ (30 Ед. в 200 мкл PBS) с последующей инъекцией пропиина (3 мг в 100 мкл PBS).

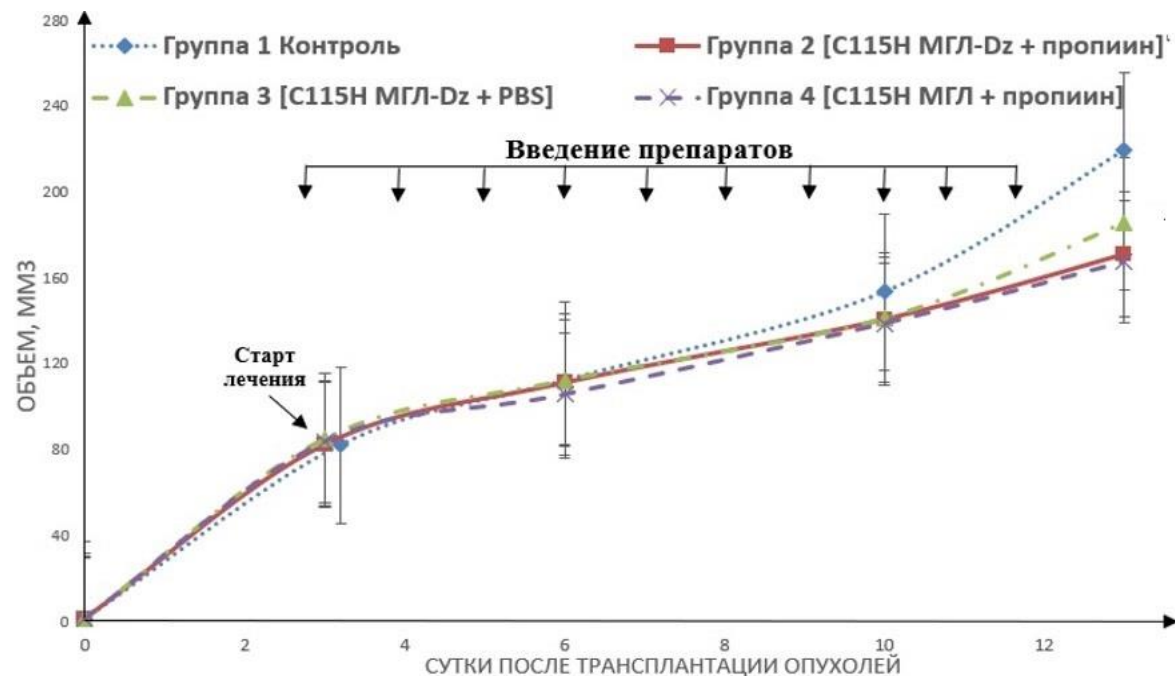
Рак толстой кишки

Модель ксенографтов **HT29**



Группа	ТРОмах, %
[C115H MGL-Dz + пропиин]	51,78; p= 0,041
[C115H MGL-Dz + PBS]	36,75; p= 0,110
[C115H MGL + пропиин]	43,97; p= 0,093

Модель ксенографтов **SW620**



Группа	ТРОмах, %
[C115H MGL-Dz + пропиин]	22,07; p= 0,111
[C115H MGL-Dz + PBS]	15,64; p= 0,258
[C115H MGL + пропиин]	23,78; p= 0,155

Группа 1 — контроль, PBS в/б в объеме 200 мкл, через 1,5 часа введение 100 мкл PBS внутрь опухоли.

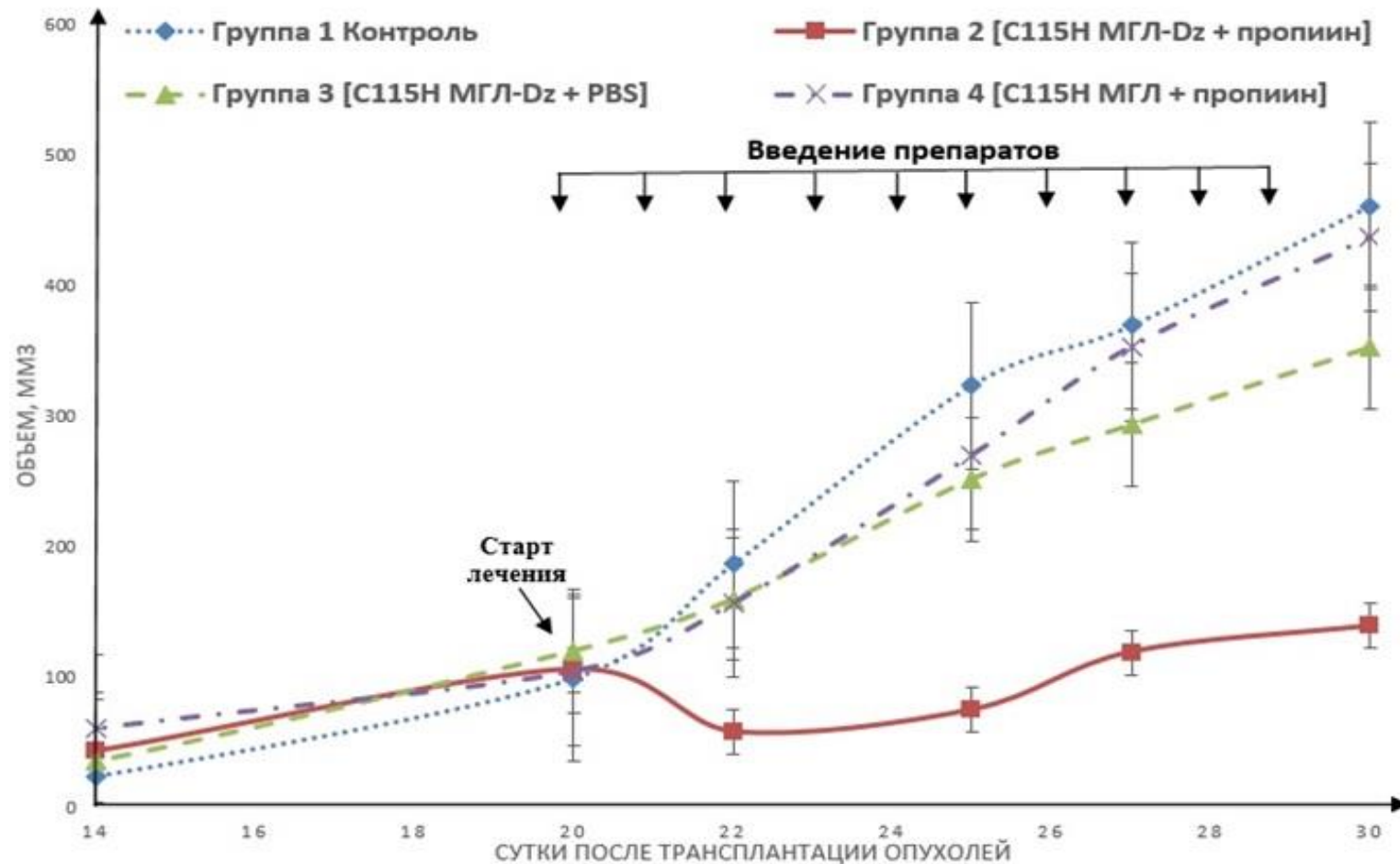
Группа 2 — введение в/б 30 Ед C115H MGL-Dz в 200 мкл PBS, через 1,5 часа введение внутрь опухоли 3 мг пропиина в 100 мкл PBS.

Группа 3 — аналогично группе 2, но вместо пропиина вводили PBS.

Группе 4 — вводили неконъюгированную C115H MGL (30 Ед. в 200 мкл PBS) с последующей инъекцией пропиина (3 мг в 100 мкл PBS).

Рак предстательной железы

Модель ксенографтов **22Rv1**



Группа	ТРОmax, %
[C115H МГЛ-Dz + пропиин]	70,0; p= 0,043
[C115H МГЛ-Dz + PBS]	23,05; p= 0,165
[C115H МГЛ + пропиин]	5,0; p> 0,05

Группа 1 — контроль, PBS в/б в объеме 200 мкл, через 1,5 часа введение 100 мкл PBS внутрь опухоли.

Группа 2 — введение в/б 30 Ед C115H МГЛ-Dz в 200 мкл PBS, через 1,5 часа введение внутрь опухоли 3 мг пропиина в 100 мкл PBS.

Группа 3 — аналогично группе 2, но вместо пропиина вводили PBS.

Группе 4 — вводили неконъюгированную C115H МГЛ (30 Ед. в 200 мкл PBS) с последующей инъекцией пропиина (3 мг в 100 мкл PBS).

Выводы

1. Модификация C115H-МГЛ дайдзеином практически не влияла на стационарные кинетические параметры конъюгированного фермента. Каталитическая эффективность конъюгатов в реакции β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина была близкой к параметрам, определённым для нативного фермента МГЛ.
2. Цитотоксичность C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиина оказалась гораздо выше, чем цитотоксичность конечного продукта, дипропилтиосульфата, образуемого фармакологической парой C115H МГЛ + пропиин.
3. Фармакологическая пара C115H МГЛ-Dz + пропиин тормозила рост солидных злокачественных новообразований *in vivo*. Наиболее чувствительными оказались ксенографты с гиперэкспрессией мембранных рецепторов эстрогенов SKBR3.

Спасибо за внимание!