

МЕМБРАНО-СВЯЗАННЫЙ БЕЛОК ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP70 В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ

© 2018 г. М. А. Шевцов^{1,2,3*}, Б. А. Маргулис², И. В. Гужова², Б. П. Николаев⁴,
А. М. Ищенко⁴, Г. Мультхофф⁵, А. С. Симбирцев⁴

*E-mail: shevtsov-max@mail.ru

¹Институт цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия;

²Российский нейрохирургический институт им. проф. А. Л. Поленова – Филиал СЗФМИЦ
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия;

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия;

⁵Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия

Белок теплового шока HSP70 часто экспрессирован на поверхности мембраны раковых клеток, что делает его потенциальной мишенью для разработок современных диагностических и терапевтических подходов в онкологии. Полученные препараты к HSP70, которые включают в себя моноклональные антитела, пептид TPR и рекомбинантный белок гранзим В, продемонстрировали специфичность распознавания HSP70-положительных раковых клеток. Последующее применение магнитных конъюгатов позволило добиться ранней диагностики новообразований с применением магнитно-резонансной томографии (МРТ). Комбинация анти-HSP70 наночастиц с иммунотерапевтическими антителами (анти-PD-1, анти-CTLA-4) приводила к выраженному терапевтическому эффекту в клинически-значимых моделях раковых заболеваний у животных. Дальнейшая разработка мишеных препаратов против HSP70-положительных опухолей является перспективным направлением в клинической онкологии.

Ключевые слова: белок теплового шока, Hsp70, наночастицы, иммунотерапия, опухолевые клеточные линии

DOI: 10.31857/S102872210002681-4

Адрес: 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. д. 4, ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», лаборатория защитных механизмов клетки, Шевцов Максим Алексеевич.

Тел.: +7(812) 2971829, Факс: +7(812) 2973541

E-mail: shevtsov-max@mail.ru

Авторы:

Шевцов М. А., к.б.н., с.н.с. лаборатории защитных механизмов клетки ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук»; с.н.с., Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова; с.н.с., Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт имени профессора А. Л. Поленова, Санкт-Петербург, Россия;

Маргулис Б. А., д.б.н., г.н.с. лаборатории защитных механизмов клетки ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, Россия;

Николаев Б. П., к.ф.-м.н., заведующий лабораторией медицинских нанотехнологий ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия;

Ищенко А. М., к.б.н., заведующий лабораторией биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский

институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия;

Мультхофф Г., проф., заведующая лабораторией экспериментальной радиоонкологии Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия;

Симбирцев А. С., д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, научный руководитель «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия.

Введение. 70 кДа белок теплового шока (HSP70, HSPA1A) играет важную роль во многих внутриклеточных функциях, включая сборку полипептидных цепей и анти-апоптотическую активность. Исключительная роль белка в обеспечении клеточного гомеостаза объясняет и его повышенную экспрессию в раковых клетках [1]. Отличительной особенностью HSP70 является его презентация на поверхности клеточной мембраны опухолевых клеток, но не на нормальных клетках [2]. Опухоль-специфическая экспрессия шаперона может быть использована для разработ-

ки новых таргетных препаратов для диагностики и терапии (тераностики) новообразований.

Цель исследования заключалась в разработке таргетных препаратов, направленных к мембранной форме HSP70 на опухолевых клетках, и оценке их тераностической активности.

Материалы и методы. С применением современных биоинженерных, биохимических и физико-химических методов были получены и охарактеризованы следующие препараты таргетной доставки: (1) моноклональные антитела cmHsp70.1; (2) 14-мерный пептид TPP (aa. 450–463; TKDNNLLGRFELSG) производный из С-концевого домена белка HSP70; (3) рекомбинантный белок человека гранзим В.

Первым этапом исследования *in vitro* оценивалась опухолевая специфичность полученных препаратов к мембранной форме HSP70. Для этого препараты были помечены флуоресцентными красителями и далее их накопление в раковых клетках (клетки колоректального рака CT26, глиомы человека U87, GL261, B16, C6) изучалось с применением методов конфокальной и электронной микроскопии, проточной цитометрии. Для отслеживания внутриклеточного транспорта препаратов применялось окрашивание клеток против-эндосомальными (Rab4, Rab5, rab7, Rab9, Rab11) и против-лизосомальными антителами (LAMP1, LAMP2) меченными флуоресцентным маркером с последующей конфокальной микроскопией образцов.

Вторым этапом исследования *in vivo* оценивалось накопление анти-HSP70 препаратов в опухоли при системном внутривенном введении в моделях колоректального рака CT26 у мышей линии BALB/c, глиомы GL261 у мышей линии C57/B16, глиомы C6 у крыс породы Wistar. После инъекции препаратов проводилась прижизненная оценка накопления веществ с применением эпифлуоресцентной микроскопии с последующим иммуногистохимическим исследованием. Отдельным этапом работ была выполнена оценка (с применением ПЭТ/КТ аппарата) биораспределения TPP пептида меченного радиоизотопной меткой (TPP-PEG₂₄-DFO-[⁸⁹Zr]) в моделях колоректального рака CT26 и рака молочной железы 4T1.

Третьим этапом исследования изучалась возможность использования функционализированных суперпарамагнитных частиц в диагностике новообразований с применением магнитно-резонансной томографии [3]. Магнитные конъюгаты наночастиц железа в комплексе с анти-HSP70 антителами (cmHsp70.1-SPIONs) [4] либо гран-

зимом В (GrB-SPIONs) были охарактеризованы с применением ЯМР спектроскопии, метода динамического рассеяния света, методов конфокальной, электронной и атомно-силовой микроскопии. После завершения *in vitro* исследований по оценке мишеных свойств конъюгатов с раковыми клетками был изучен диагностический потенциал (в режиме МРТ) наночастиц *in vivo* в моделях глимы C6, глиомы U87 у иммунодефицитных мышей NMRI nu/nu, глиомы GL261, рака лёгкого H1339 у иммунодефицитных мышей NMRI nu/nu.

Результаты. Полученные анти-HSP70 препараты (cmHsp70.1 антитела, пептид TPP, гранзим В) специфически взаимодействовали с HSP70-положительными раковыми клетками, накапливаясь в цитоплазме клеток в результате эндоцитоза. Подавление экспрессии HSP70 на мембране клеток рака молочной железы 4T1 (4T1_{Hsp70-}) с применением системы CRISP/Cas9 приводило к существенному снижению захвата клетками белка. *In vivo* исследования с флуоресцентными маркерами также подтвердили избирательность накопления препаратов в опухолевой ткани. Так исследование по биораспределению пептида TPP показало, что в течение 3-х часов от момента внутривенного введения TPP-PEG₂₄-DFO-[⁸⁹Zr] накапливался в опухоли 4T1, достигая максимальных значений через 24 часа. Так в опухоли 4T1_{Hsp70+} захват пептида составил $6,22 \pm 1,1\%$ ID/g по сравнению с $5,47 \pm 0,3\%$ ID/g в опухоли 4T1_{wt}. Для опухоли CT26 – $2,66 \pm 0,5\%$ ID/g.

Синтезированные магнитные конъюгаты (cmHsp70.1-SPIONs, GrB-SPIONs) обладали выраженными МР контрастными свойствами и по данным *in vitro* экспериментов специфически накапливались в HSP70-положительных раковых клетках [4]. Наличие про-апоптотической активности у гранзима В приводило к дозозависимой гибели клеток. Системное введение наночастиц в моделях опухолевого поражения у животных сопровождалось накоплением частиц в опухоли и усилением её контрастирования при проведении МРТ. Сопутствующая радиотерапия (Small Animal Radiation Research Platform (SARRP), X-strahl) глиомы головного мозга приводила к увеличению экспрессии HSP70 и, как следствие, повышению аккумуляции наночастиц в опухоли. Курс внутривенного введения GrB-SPIONs приводил к замедлению прогрессии опухоли (по данным МРТ) и увеличению выживаемости животных. Комбинированная терапия с применением конъюгатов наночастиц GrB-SPIONs и моноклональных иммунотера-

пептических антител (анти-PD-1, анти-CTLA-4) приводила к выраженному терапевтическому эффекту за счёт активации иммунного противоопухолевого ответа. Так по данным иммуногистохимических исследований наблюдалось увеличение инфильтрации опухолевой ткани CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами, NK1.1⁺ натуральными киллерами.

Выводы. Мембрано-связанный HSP70 может служить основой для таргетной диагностики и терапии новообразований. Комбинированная терапия с применением магнитных наночастиц и иммунотерапевтических антител является новым перспективным направлением в онкологии и может быть в дальнейшем использована в терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shevtsov M., Multhoff G. Heat shock protein-peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer. *Front Immunol.* 2016, 7, 171.
2. Multhoff G. Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods.* 2007, 43, 229–237.
3. Shevtsov M.A., Multhoff G. Recent Developments of Magnetic Nanoparticles for Theranostics of Brain Tumor. *Current Drug Metabolism.* 2016, 17(8), 737–744.
4. Shevtsov M.A., Nikolaev B.P., Ryzhov V.A., Yakovleva L.Y., Marchenko Y.Y., Parr M.A., Rolich V.I., Mikhrina A.L., Dobrodumov A.V., Pitkin E., Multhoff G. Ionizing radiation improves glioma-specific targeting of superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with cmHsp70.1 antibodies (SPION-cmHsp70.1). *Nanoscale.* 2015, 7(48), 20652–20664.

MEMBRANE-BOUND HEAT SHOCK PROTEIN HSP70 AS A TARGET FOR THERANOSTICS OF TUMORS

© 2018 M. A. Shevtsov^{1,2,3*}, B. A. Margulis², I. V. Guzhova², B. P. Nikolaev⁴, A. M. Ischenko⁴, G. Multhoff⁵, A. S. Simbirtsev⁴

*E-mail: shevtsov-max@mail.ru

¹Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), St. Petersburg, Russia;

²Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery, St. Petersburg, Russia;

³Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia;

⁴Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia;

⁵Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar, Munich, Germany

Heat shock protein HSP70 is frequently expressed on the plasma membrane of tumor cells, thus rendering this protein as a potential target for development of novel diagnostic and therapeutic approaches in oncology. Developed anti-HSP70 agents, which include monoclonal antibodies, TPP peptide and recombinant granzyme B, demonstrated specificity in targeting of HSP70-positive tumor cells. Subsequent application of magnetic conjugates functionalized with anti-HSP70 agents could provide an early diagnosis of tumors employing magnetic resonance imaging (MRI). Combination of anti-HSP70 nanoparticles with immunotherapeutic antibodies (anti-PD-1, anti-CTLA-4) resulted in increased survival and delay of tumor progression in the clinically relevant models of cancer. Further development of the targeted agents against HSP70-positive tumors could be applied for the treatment in clinical oncology.

Key words: heat shock protein, Hsp70, nanoparticles, immunotherapy, tumor cell lines

Authors:

Shevtsov M.A., MD, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Cell Protection Mechanisms, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), St. Petersburg, Russia; Senior Researcher, Polenov Russian Scientific Research Institute of Neurosurgery, St. Petersburg, Russia; Senior Researcher, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia; E-mail: shevtsov-max@mail.ru;

Margulis B.A., DrSci, Leading Researcher of the Laboratory of Cell Protection Mechanisms, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences (RAS), St. Petersburg, Russia;

Nikolaev B.P., PhD, Head of the Laboratory of medical nanotechnologies, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia;

Ischenko A.M., PhD, Head of the Laboratory of protein biochemistry, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia;

Multhoff G., Professor, Head of the Laboratory of Experimental Radio-oncology, Technical University of Munich, Munich, Germany;

Simbirtsev A.S., DrSci, Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia.