

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-4-62-70>

# Цитотоксические и противоопухолевые свойства конъюгата метионин $\gamma$ -лиаза-дайдзеин в комбинации с сульфоксидами S-алк(ен)ил-L-цистеина

Л. Або Кура<sup>1</sup>, Е.А. Морозова<sup>2</sup>, В.С. Коваль<sup>2</sup>, В.В. Куликова<sup>2</sup>, Т.С. Спирина<sup>3</sup>, Е.А. Демидова<sup>3</sup>, Т.В. Демидкина<sup>2</sup>, В.С. Покровский<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>НИИ молекулярной и клеточной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>4</sup>Научный центр трансляционной медицины АНО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»; Россия; 354340 Сочи, Олимпийский пр-т, 1

**Контакты:** Вадим Сергеевич Покровский [v.pokrovsky@ronc.ru](mailto:v.pokrovsky@ronc.ru)

**Введение.** Ферментная пролекарственная терапия является новой перспективной стратегией в лечении солидных злокачественных новообразований. Использование двухкомпонентных систем, содержащих фермент и нетоксичный субстрат (пролекарство), позволяет вырабатывать цитотоксические вещества непосредственно у поверхности опухолевой клетки, тем самым снижая общую токсическую нагрузку на организм.

**Цель исследования** – оценка противоопухолевой активности фармакологических пар C115H метионин  $\gamma$ -лиазы (C115H МГЛ), конъюгированной с дайдзеином (C115H МГЛ-Dz), и сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина в отношении солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы.** Для определения цитотоксичности фармакологических пар *in vitro* на клеточных линиях рака толстой кишки (SW620), поджелудочной железы (Panc1) и предстательной железы (22Rv1) использовали МТТ-тест. Индукцию апоптоза и изменение клеточного цикла клеток линий 22Rv1, SW620 и SKBR3 исследовали с помощью набора реагентов Muse® Caspase-3/7 и Muse® Cell Cycle Assay kit. Противоопухолевую активность *in vivo* оценивали на ксенографтах SW620, Panc1 и 22Rv1 у мышей Balb/c nude.

**Результаты.** Показано, что конъюгат C115H МГЛ-Dz обладает максимальной цитотоксичностью в присутствии сульфоксида S-пропил-L-цистеина (пропиина) с  $IC_{50}$  равными 3,88 и 5,4 для Panc1 и 22Rv1 соответственно. Дипропилтиосульфид, образующийся в результате реакции  $\beta$ -элиминирования пропиина, катализируемой C115H МГЛ-Dz, индуцирует апоптоз как посредством активации каспаз, так и через альтернативные пути, а также угнетает клеточное деление, способствуя снижению концентрации клеток в фазе  $G_2/M$ . Исследование противоопухолевой активности фармакологической пары *in vivo* показало уменьшение объема опухоли у ксенографтов Panc1 (торможение роста опухоли (ТРО) 67,5 %,  $p = 0,004$ ), SW620 (ТРО 22,07 %,  $p = 0,12$ ) и 22Rv1 (ТРО 70 %,  $p = 0,043$ ).

**Выводы.** Фармакологическая пара C115H МГЛ-Dz/пропиин значительно уменьшает рост злокачественных солидных опухолей и может рассматриваться в качестве возможного терапевтического агента в ферментной пролекарственной терапии злокачественных новообразований.

**Ключевые слова:** метионин  $\gamma$ -лиаза, ферментная пролекарственная терапия, направленная доставка, субстраты пролекарства, тиосульфиды

**Для цитирования:** Або Кура Л., Морозова Е.А., Коваль В.С. и др. Цитотоксические и противоопухолевые свойства конъюгата метионин  $\gamma$ -лиаза-дайдзеин в комбинации с сульфоксидами S-алк(ен)ил-L-цистеина. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):62–70. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-62-70

## Cytotoxic and antitumor properties of methionine $\gamma$ -lyase conjugate in combination with S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides

Louay Abo Qoura<sup>1</sup>, Elena A. Morozova<sup>2</sup>, Vasily S. Koval<sup>2</sup>, Vitalia V. Kulikova<sup>2</sup>, Tatiana S. Spirina<sup>3</sup>, Elena A. Demidova<sup>3</sup>, Tatyana V. Demidkina<sup>2</sup>, Vadim S. Pokrovsky<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN University; 6 Miklukho-Maklaya St., 117198 Moscow, Russia;

<sup>2</sup>V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences; 32 Vavilova St., 119991 Moscow, Russia;

<sup>3</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Scientific Center for Translational Medicine, Sirius University of Science and Technology; 1 Olympiyskiy Ave., 354340 Sochi, Russia

**Contacts:** Vadim Sergeevich Pokrovsky v.pokrovsky@rnc.ru

**Background.** Enzyme prodrug therapy is a promising strategy to treat solid malignancies. The utilization of two-component systems, including an enzyme and a non-toxic prodrug, to generate cytotoxic compounds directly at the surface of the tumor cell can be successful strategy in reducing the overall toxic load on the body.

**Aim.** To determine antitumor activity of the pharmacological pair C115H methionine  $\gamma$ -lyase (C115H MGL) conjugated with daidzein (C115H MGL-Dz) and of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides against various types of solid tumors *in vitro* and *in vivo*.

**Materials.** MTT-test was used to determine the cytotoxicity of C115H MGL-Dz in the presence of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides *in vitro* against SW620 (colon cancer), Panc1 (pancreatic cancer), and 22Rv1 (prostate cancer). Apoptosis induction and cell cycle alteration in 22Rv1, SW620, and SKBR3 cell lines were studied using the Muse® Caspase-3/7 и Muse® Cell Cycle Assay kits. *In vivo* anticancer activity was studied on SW620, Panc1, and 22Rv1 subcutaneous xenografts in Balb/c nude mice.

**Results.** The C115H MGL-Dz had the maximum cytotoxic activity in the presence of S-propyl-L-cysteine sulfoxide (propiin) with  $IC_{50}$  values: 3.88 and 5.4 for Panc1 and 22Rv1, respectively. Dipropyl thiosulfinate formed by the  $\beta$ -elimination of propiin catalyzed by C115H MGL-Dz, induces apoptosis through both the activation of caspases and alternative pathways, and also it inhibits cell division, contributing to a decrease in the concentration of cells in the  $G_2/M$  phase. The anticancer efficacy of the pharmacological pair C115H-Dz/propiin *in vivo* indicated a significant decrease in Panc1 tumor volume (tumor growth inhibition (TGI) 67.5 %,  $p = 0.004$ ), SW620 (TGI 22.07 %,  $p = 0.12$ ) and 22Rv1 (TGI 70 %,  $p = 0.043$ ).

**Conclusion.** Pharmacological pair C115H MGL-Dz/propiin was capable of suppressing tumor development in malignant solid tumors and might be considered as a potential anticancer approach in cancer prodrug therapy.

**Keywords:** methionine  $\gamma$ -lyase, enzyme prodrug therapy, drug targeting, substrate-prodrug, thiosulfates

**For citation:** Abo Qoura L., Morozova E.A., Koval V.S. et al. Cytotoxic and antitumor properties of methionine  $\gamma$ -lyase conjugate in combination with S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21 (4):62–70. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-62-70

### Введение

В последние годы в разработке новых противоопухолевых препаратов и схем комбинированной лекарственной терапии достигнут значительный прогресс. Некоторые опухоли гормонально зависимы, их рост и метастазирование стимулируются эстрогенами и прогестероном [1]. Рецепторы к гормонам, как и другие мембранные белки, могут использоваться в ферментной пролекарственной терапии рака как мишени для направленной доставки ферментов к солидным новообразованиям.

Метионин  $\gamma$ -лиаза (МГЛ) (КФ 4.4.1.11) — пиримидин-5'-фосфат-зависимый фермент, катализирующий реакции  $\gamma$ -элиминирования L-метионина и его аналогов и  $\beta$ -элиминирования S-замещенных аналогов L-цистеина [2]. МГЛ и ее мутантная форма с заменой цистеина 115 на гистидин эффективно расщепляют сульфоксиды S-алк(en)ил-L-цистеина

с образованием тиосульфатов, обладающих противоопухолевой активностью [3].

Наиболее известным тиосульфатом является аллицин, обладающий противоопухолевыми, противомикробными и противовирусными свойствами [4, 5].

До настоящего времени все *in vivo* исследования МГЛ в терапии рака сводились к использованию непосредственно самого фермента в качестве противоопухолевого агента для метионинзависимых новообразований [6, 7]. Способность МГЛ катализировать реакцию  $\beta$ -элиминирования сульфоксидов S-алк(en)ил-L-цистеина с образованием цитотоксических тиосульфатов открывает возможность использования фермента в пролекарственной терапии рака в качестве ферментной составляющей фармакологической пары C115H МГЛ/сульфоксиды S-алк(en)ил-L-цистеина.

Ассоциированный с G-белком рецептор эстрогена 1 (GPER1), также известный как GPR30, — недавно

описанный мембранный рецептор эстрогена, который обеспечивает реализацию негеномных эффектов эстрогенов, приводит к мобилизации внутриклеточного кальция и синтезу фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата [8]. Высокая экспрессия GPER характерна для клеток рака поджелудочной железы [9], молочной железы [10], толстой кишки [11] и предстательной железы [12]. Дайдзеин является структурным аналогом природных эстрогенов и может связываться с высоким сродством с GPER [13].

В настоящей работе для направленной доставки ферментного компонента фармакологической пары к поверхности эстрогензависимых опухолей нами был получен конъюгат C115H МГЛ с дайдеином (C115H МГЛ-Dz). Цитотоксическое действие C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина было оценено на клеточных линиях рака толстой кишки SW620, рака поджелудочной железы Panc1 и рака предстательной железы 22Rv1. Противоопухолевая эффективность фармакологической пары C115H МГЛ-Dz/сульфоксид S-пропил-L-цистеина была показана на ксенографтах SW620, Panc1 и 22Rv1 у мышей Balb/c nude.

**Цель исследования** — оценка противоопухолевой активности фармакологических пар C115H МГЛ-Dz и сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина в отношении солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*.

## Материалы и методы

**Реактивы.** Плазмида с геном C115H МГЛ из *Clostridium novyi* была создана компанией «Евроген» (Россия). S-метил-L-цистеин, никотинамидадениндинуклеотид восстановленный и бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) были получены от Sigma-Aldrich (Германия). L-глутамин, пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ) и D, L-дитиотреитол (ДТТ) были приобретены у компании Serva (Германия). Сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина (S-метил-L-цистеин сульфоксид (метиин), S-этил-L-цистеин сульфоксид (этиин), S-пропил-L-цистеин сульфоксид (пропиин), S-аллил-L-цистеин сульфоксид (аллиин)) были получены, как описано ранее [14, 15]. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) была приобретена у фирмы GE Healthcare (США). Использована фетальная бычья сыворотка (FBS) (HyClone, США). Muse® Cell Cycle Assay kit (MCH100106) был получен от Merck (Германия), Muse® Caspase-3/7 kit (MCH100108) — от Luminex (США).

**Выделение C115H МГЛ.** Клетки *E. coli* BL21 (DE3), содержащие плазмиду с геном мутантной формы МГЛ, выращивали, и фермент очищали, как описано ранее [16]. Концентрация C115H МГЛ была рассчитана с использованием коэффициента поглощения  $A_{1\%}^{278} = 0,8$  при 278 нм [17]. Активность фермента определяли в реакции  $\beta$ -элиминирования S-метил-L-

цистеина. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ/мин кетокислоты.

**Синтез C115H МГЛ-Dz конъюгата.** N-гидроксисукцинимидный эфир 7-(O)-карбоксиметила (дайдеин-NHS) был синтезирован по методике [18]. К раствору 400 мг C115H МГЛ в 50 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ПЛФ и 10 % глицерина, добавляли 400 мкл дайдеин-NHS в диметилформамиде, и реакционную смесь перемешивали 4 ч при 4 °С. Далее препарат диализовали против калий-фосфатного буфера (pH 8,0), содержащего 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ПЛФ, 1 мМ ДТТ.

**Оценка цитотоксичности конъюгатов C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов.** Штаммы клеточных линий аденокарциномы толстой кишки человека SW620, рака поджелудочной железы человека Panc1 и рака предстательной железы человека 22Rv1 были получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клеточные культуры культивировали в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % влажности) в питательной среде DMEM, содержащей 2 мМ L-глутамин, 10 % FBS и 100 мкг/мл пенициллина. Пересев клеточных монослойных линий осуществляли 3 раза в неделю, для снятия клеток с пластиковой поверхности использовали стандартный раствор Версена. Для оценки цитотоксичности C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина клетки, достигшие логарифмической фазы роста, пересеивали в 96-луночные планшеты в количестве 6–8 × 10<sup>3</sup> клеток на лунку и преинкубировали в указанных выше условиях в течение 24 ч перед добавлением тестируемых препаратов. К преинкубированным клеткам добавляли C115H МГЛ-Dz до конечной концентрации 1–64 мМ (2-кратное серийное разведение) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин. Несвязавшиеся конъюгаты удаляли 3-кратным промыванием клеток культуральной средой DMEM, затем добавляли сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина до конечной концентрации 1 мг/мл. Уровень клеточного метаболизма в конце инкубационного периода (24 ч) определяли колориметрическим методом МТТ [19]. Оптическую плотность полученного раствора формазана в диметилсульфоксиде измеряли на планшетном спектрофотометре MultiSkan MS (LabSystems, Финляндия) при длине волны 540 нм. Ингибирующую концентрацию (IC<sub>50</sub>) рассчитывали методом нелинейной регрессии.

**Оценка апоптоза.** Клетки линии 22Rv1 пересеивали в 6-луночные планшеты в количестве 6 × 10<sup>4</sup> клеток на лунку в 3 мл культуральной среды на основе RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 2 мМ L-глутамин, 10 % FBS и 100 мкг/мл пенициллина,

преинкубировали при 37 °С и 5 % CO<sub>2</sub> в течение 24 ч перед добавлением тестируемых препаратов C115H МГЛ-Dz в концентрациях 0,1; 0,4 и 0,5 μМ и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Несвязавшиеся конъюгаты удаляли 3-кратным промыванием клеток средой RPMI-1640, затем добавляли пропиин в концентрации 1 мг/мл на 24 ч. После инкубации собирали взвешенные клетки. Для снятия клеток с пластиковой поверхности использовали стандартный раствор трипсин-ЭДТА 0,05 % («ПанЭко», Россия) и осаждали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Исследования проводили в дуплетах с использованием набора реагентов Muse® Caspase-3/7 kit согласно инструкции производителя. Для учета результатов использовали клеточный анализатор Muse® Cell Analyzer (Millipore, Германия).

**Анализ клеточного цикла.** Влияние C115H МГЛ-Dz/пропиина на деление клеток линий 22Rv1, SW620 и SKBR3 оценивали по изменению клеточного цикла. Клетки инкубировали с пропином, как указано выше, в течение 24 ч. Исследования проводили в дуплетах с использованием набора реагентов Muse® Cell Cycle Assay Kit согласно инструкции производителя. Для учета результатов использовали Muse® Cell Analyzer, анализируя не менее 2000 клеток в каждой пробе.

**Оценка противоопухолевой активности *in vivo*.** Оценку противоопухолевой активности C115H МГЛ-Dz/пропиин *in vivo* проводили на перевиваемых ксенографтах человека у мышей Balb/c nude. В исследовании использовали мышей Balb/c nude в возрасте 6–10 нед с массой тела 23 ± 2 г. Мышей содержали в конвенциональном виварии при естественном освещении, регулируемой температуре воздуха (25 °С), с постоянным доступом к воде и корму. Все эксперименты проводили в соответствии с этическими требованиями к исследованиям на биологических моделях и экспериментальных животных, утвержденными в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Иммунизационные материалы (матригель) использовали для повышения туморогенности и приживаемости клеток. После того как опухоли достигали размера ~100 мм<sup>3</sup>, мышей рандомизировали в 4 группы по 5 животных: 1-я группа (контроль) — введение фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) внутрибрюшинно в объеме 200 мкл, через 1,5 ч введение 100 мкл PBS внутрь опухоли; 2-я группа — введение внутрибрюшинно 30 ед C115H МГЛ-Dz в 200 мкл PBS, через 1,5 ч введение внутрь опухоли 3 мг пропиина в 100 мкл PBS; 3-я группа — схема, как во 2-й группе, но вместо пропиина вводили PBS; 4-я группа — введение неконъюгированной C115H МГЛ (30 ед в 200 мкл PBS) с последующей инъекцией пропиина (3 мг в 100 мкл PBS). Введение препаратов продолжали в течение 10 дней с интервалом

24 ч. Объем опухоли и массу тела измеряли 2 раза в неделю с помощью электронного штангенциркуля. Критериями оценки противоопухолевой активности являлось торможение роста опухоли (ТРО, %) у экспериментальных животных по сравнению с контролем, рассчитываемое по формуле:

$$\text{ТРО} = \frac{V_c - V_e}{V_c} \times 100,$$

где  $V_c$  — средний объем опухолей в контрольной группе (мм<sup>3</sup>),  $V_e$  — средний объем опухолей в опытной группе (мм<sup>3</sup>).

Минимальные критерии активности — ТРО ≥ 50 %.

**Статистический анализ.** Результаты были представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Сравнительный анализ результатов опытных групп и контрольной проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

**Цитотоксический эффект C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина.** Направленная доставка МГЛ C115H в составе фармакологических пар (C115H МГЛ-Dz/сульфоксид) для образования тиосульфидов непосредственно на поверхности опухолевых клеток может снизить токсическое действие тиосульфидов на организм в целом. Для того чтобы выявить линии опухолей, наиболее чувствительных к C115H-Dz в присутствии метиина, этиина, пропиина или аллиина, фармакологическую пару тестировали на культурах опухолевых клеток человека: рак толстой кишки (SW620), рак поджелудочной железы (Panc1) и рак предстательной железы человека (22Rv1). Как видно из табл. 1, C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиина оказывает более выраженное антипролиферативное действие на различные линии опухолевых клеток. Клетки Panc1 проявляли максимальную чувствительность к C115H МГЛ-Dz/сульфоксидам, и для них наблюдалось самое низкое значение IC<sub>50</sub> (3,8 μМ). Клетки 22Rv1 проявляли бо́льшую чувствительность к C115H-Dz/сульфоксидам, чем клетки SW620, со значениями IC<sub>50</sub>, равными 5,4 μМ.

**Индукция апоптоза и изменения клеточного цикла под влиянием C115H МГЛ-Dz/пропиина.** Используемый метод учета позволял детально оценить индукцию апоптоза в культуре клеток под воздействием изучаемого препарата. В частности, отдельно учитывали концентрацию клеток, содержащих в цитоплазме активные каспазы 3/7, с неповрежденной и поврежденной мембраной (ранняя и поздняя фазы апоптоза соответственно), а также погибших клеток без

**Таблица 1.** Цитотоксичность C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина\*

Table 1. Cytotoxicity of C115H MGL-Dz in the presence of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides\*

| Субстрат<br>Substrate                | IC <sub>50</sub> C115H МГЛ-Dz, μM<br>IC <sub>50</sub> C115H MGL-Dz, μM |                               |                               |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                      | Линии опухолевых клеток<br>Tumor cell lines                            |                               |                               |
|                                      | SW620                                                                  | Panc1                         | 22Rv1                         |
| Без субстратов<br>Without substrates | Не обнаружено<br>Not detected                                          | Не обнаружено<br>Not detected | Не обнаружено<br>Not detected |
| Аллиин<br>Alliin                     | Не обнаружено<br>Not detected                                          | 4,5                           | 8,6                           |
| Метиин<br>Methiin                    | Не обнаружено<br>Not detected                                          | 5,7                           | 9,8                           |
| Этиин<br>Ethiin                      | Не обнаружено<br>Not detected                                          | 5,3                           | 9,9                           |
| Пропиин<br>Propiin                   | Не обнаружено<br>Not detected                                          | 3,88                          | 5,4                           |

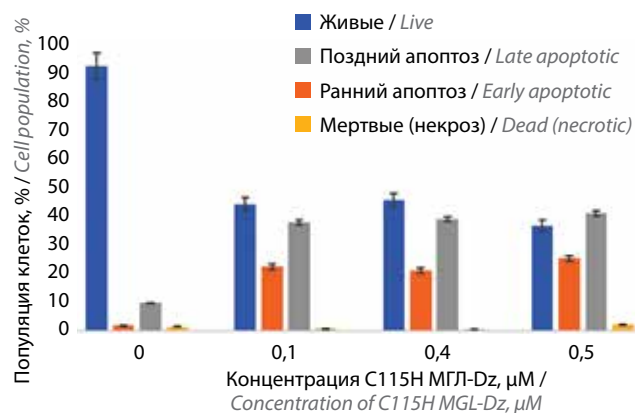
\* Концентрация сульфоксидов – 1 мг/мл.

\*The concentration of sulfoxides – 1 mg/ml.

**Примечание.** C115H МГЛ-Dz – C115H метионин γ-лиаза, конъюгированная с дайдзеином; IC<sub>50</sub> – ингибирующая концентрация на 50 %.

Note. C115H MGL-Dz – C115H methionine γ-lyase conjugated with daidzein; IC<sub>50</sub> – inhibitory concentration by 50 %.

признаков активации каспаз (некроз или каспазане-зависимый апоптоз). Применение C115H МГЛ-Dz в различных концентрациях (0,1; 0,4 и 0,5 μM) в присутствии пропиина (1 мг/мл) приводило к дозозависимому увеличению концентрации клеток в ранней фазе апоптоза (в клетках 22Rv1: 21,22; 19,56 и 24,02 % соответственно) по сравнению с контролем (<2 %) (рис. 1). После коинкубации с C115H МГЛ-Dz/пропином наблюдалось увеличение популяции клеток в поздней стадии апоптоза: с 35,91 до 38,97 % на линии клеток 22Rv1. Менее 2 % клеточной популяции демонстрировали признаки гибели без активации каспаз во всех протестированных клеточных линиях при инкубации с C115H МГЛ-Dz/пропином. Эти результаты свидетельствуют о том, что дипропилтиосульфат, образующийся в результате реакции β-элиминирования пропиина, катализируемой C115H МГЛ-Dz, может индуцировать апоптоз как посредством активации каспаз, так и через альтернативные пути.



**Рис. 1.** Активность каспаз 3/7 при индукции апоптоза на клеточной линии рака предстательной железы (22Rv1). Здесь и на рис. 2: C115H МГЛ-Dz – C115H метионин γ-лиаза, конъюгированная с дайдзеином  
Fig. 1. Caspase 3/7 activity induces apoptosis in prostate cancer line (22Rv1). Here and on fig. 2: C115H MGL-Dz – C115H methionine γ-lyase conjugated with daidzein

Анализ популяции клеток, находящихся на стадиях клеточного цикла G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M, показал, что при коинкубации с 0,1 и 0,4 μM C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиина клетки 22Rv1 делились более активно (24,7 и 29,9 % в фазе G<sub>2</sub>/M соответственно) по сравнению с контрольной группой, где концентрация клеток в этой фазе соответствовала 19,7 % (рис. 2). Аналогичный результат наблюдали после коинкубации клеток линии SKBR3 с 0,1 и 0,4 μM C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиина: 14,2 и 18,0 % клеток в фазе G<sub>2</sub>/M соответственно (см. рис. 2). Наблюдали снижение концентрации клеток в состоянии покоя (фаза G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>): с 60,8 % в контрольной группе до 55,7 % (0,1 μM C115H МГЛ-Dz) и 52,3 % (0,4 μM C115H МГЛ-Dz) в клетках 22Rv1 и с 71,9 % в контрольной группе до 66,4 % (0,1 μM C115H МГЛ-Dz) и 62,9 % (0,4 μM C115H МГЛ-Dz) в клетках SKBR3. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что дипропилтиосульфат, ферментативно образующийся в паре C115H МГЛ-Dz/пропиин, опосредовал снижение концентрации клеток в фазе G<sub>2</sub>/M, т. е. оказывал антипролиферативный эффект.

**Фармакологическая пара C115H МГЛ-Dz/пропиин ингибирует рост подкожных опухолевых ксенографтов рака поджелудочной железы человека Panc1.** Терапия животных фармакологической парой C115H МГЛ-Dz/пропиин приводила к значительному уменьшению размера опухолей Panc1 (ТРО 67 %,  $p = 0,004$ ) по сравнению с контролем. Введение животным фармакологической пары с неконъюгированным ферментом (C115H МГЛ/пропиин), а также фармакологической пары, где сульфоксид заменен на PBS (C115H МГЛ-Dz/PBS), приводило к уменьшению роста опухоли, однако эффект был статистически незначимым (ТРО 48 % ( $p = 0,160$ ) и ТРО 51 % ( $p = 0,462$ ) соответственно) (табл. 2).

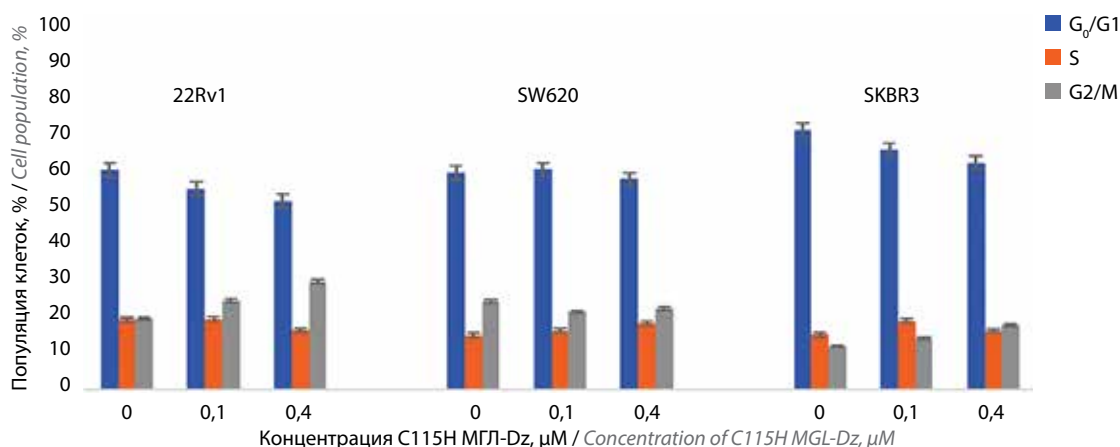


Рис. 2. Анализ фазы клеточного цикла на клеточных линиях 22Rv1, SW620 и SKBR3 при лечении с C115H МГЛ-Dz/пропином

Fig. 2. Analysis of cell cycle phases in 22Rv1, SW620, and SKBR3 cell lines treated with C115H MGL-Dz/propionin

Таблица 2. Противоопухолевая активность фармакологических пар C115H МГЛ-Dz/пропиин, C115H МГЛ-Dz/PBS и C115H МГЛ/пропиин на модели рака поджелудочной железы человека Panc1

Table 2. Antitumor effect of pharmacological pairs C115H MGL-Dz/propionin, C115H MGL-Dz/PBS and C115H MGL/propionin in the Panc1 human pancreatic cancer model

| Группа<br>Group                                                        | Начальный объем<br>опухоли, мм <sup>3</sup><br>Initial tumor<br>volume, mm <sup>3</sup> | Конечный объем<br>опухоли, мм <sup>3</sup><br>Final tumor<br>volume, mm <sup>3</sup> | ТРО, %<br>TGI, % | Начальная масса<br>тела мыши, г<br>Initial body weight<br>of a mouse, g | Конечная масса<br>тела мыши, г<br>Final body weight<br>of a mouse, g |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1-я (контроль)<br>1 <sup>st</sup> (control)                            | 70,3 ± 10,6                                                                             | 442,9 ± 65,5                                                                         | —                | 23,6 ± 0,6                                                              | 23,7 ± 0,7                                                           |
| 2-я (C115H МГЛ-Dz/пропиин)<br>2 <sup>nd</sup> (C115H MGL-Dz/propionin) | 80,3 ± 10,6                                                                             | 143,9 ± 36,9                                                                         | 67*              | 23,2 ± 0,8                                                              | 22,5 ± 0,6                                                           |
| 3-я (C115H МГЛ-Dz/PBS)<br>3 <sup>rd</sup> (C115H MGL-Dz/PBS)           | 69,8 ± 17,7                                                                             | 227,9 ± 61,2                                                                         | 48**             | 24,3 ± 0,2                                                              | 24,5 ± 0,6                                                           |
| 4-я (C115H МГЛ/пропиин)<br>4 <sup>th</sup> (C115H MGL/propionin)       | 69,9 ± 18,6                                                                             | 215,7 ± 34,1                                                                         | 51***            | 24,1 ± 1,4                                                              | 24,4 ± 2,0                                                           |

\* $p = 0,004$ ; \*\* $p = 0,160$ ; \*\*\* $p = 0,462$ .

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: C115H МГЛ – C115H метионин  $\gamma$ -лиаза; C115H МГЛ-Dz – C115H метионин  $\gamma$ -лиаза, конъюгированная с дайдзином; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; ТРО – торможение роста опухоли.

Note. Here and in the table. 3, 4: C115H MGL-C115H methionine- $\gamma$ -lyase; C115H MGL-Dz – C115H methionine- $\gamma$ -lyase conjugated with daidzein; PBS – phosphate buffered saline; TGI – tumor growth inhibition.

C115H МГЛ-Dz/пропиин подавляет рост ксенографтов рака толстой кишки человека SW620. К 3-му дню лечения у всех животных, которым были имплантированы суспензии клеточных линий SW620, сформировались подкожные макроскопические опухолевые узлы. Введение фармакологических пар C115H МГЛ-Dz/пропиин, C115H МГЛ/пропиин или C115H МГЛ-Dz/PBS приводило к уменьшению роста опухоли, однако эффект был статистически незначимым (табл. 3).

Противоопухолевая активность C115H МГЛ-Dz/пропиин *in vivo* на модели рака предстательной железы

22Rv1. Как видно из табл. 4, введение животным фармакологической пары C115H МГЛ-Dz/пропиин приводило к значительному уменьшению объема опухолевой массы по сравнению с контролем (ТРО 70 %,  $p = 0,043$ ). Введение мышам C115H МГЛ-Dz/PBS приводило к снижению объема опухоли по сравнению с контролем (ТРО 23 %,  $p = 0,165$ ). Средний объем опухоли достигал  $460,2 \pm 108,0$  мм<sup>3</sup> в контроле,  $436,1 \pm 268,6$  мм<sup>3</sup> – в группе C115H МГЛ/пропиина.

Полученные результаты показывают, что конъюгаты C115H МГЛ-Dz могут связываться на поверхности раковых клеток, при введении сульфоксидов

**Таблица 3.** Противоопухолевая активность фармакологических пар C115H МГЛ-Dz/пропиин, C115H МГЛ-Dz/PBS и C115H МГЛ/пропиин на модели рака толстой кишки человека SW620

Table 3. Antitumor activity of pharmacological pairs C115H MGL-Dz/propine, C115H MGL-Dz/PBS and C115H MGL/propine in SW620 human colon cancer model

| Группа<br>Group                                                           | Начальный объем<br>опухоли, мм <sup>3</sup><br>Initial tumor<br>volume, mm <sup>3</sup> | Конечный объем<br>опухоли, мм <sup>3</sup><br>Final tumor<br>volume, mm <sup>3</sup> | ТРО, %<br>TGI, % | Начальная масса<br>тела мыши, г<br>Initial body weight<br>of a mouse, g | Конечная масса<br>тела мыши, г<br>Final body weight<br>of a mouse, g |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1-я (контроль)<br>1 <sup>st</sup> (control)                               | 82,0 ± 12,9                                                                             | 219,0 ± 26,8                                                                         | —                | 25,3 ± 0,9                                                              | 25,8 ± 0,4                                                           |
| 2-я (C115H МГЛ-Dz/про-<br>пиин)<br>2 <sup>nd</sup> (C115H MGL-Dz/propine) | 82,1 ± 11,5                                                                             | 170,9 ± 92,9                                                                         | 22,07*           | 24,4 ± 0,9                                                              | 22,1 ± 0,4                                                           |
| 3-я (C115H МГЛ-Dz/PBS)<br>3 <sup>rd</sup> (C115H MGL-Dz/PBS)              | 84,8 ± 10,4                                                                             | 185,0 ± 118,8                                                                        | 15,46**          | 26,7 ± 0,6                                                              | 24,8 ± 1,9                                                           |
| 4-я (C115H МГЛ/пропиин)<br>4 <sup>th</sup> (C115H MGL/propine)            | 83,4 ± 9,3                                                                              | 167,1 ± 35,7                                                                         | 23,78***         | 24,7 ± 0,9                                                              | 24,6 ± 1,0                                                           |

\*  $p = 0,12$ ; \*\*  $p = 0,25$ ; \*\*\*  $p = 0,15$ .

**Таблица 4.** Противоопухолевая активность фармакологических пар C115H МГЛ-Dz/пропиин, C115H МГЛ-Dz/PBS и C115H МГЛ/пропиин на модели рака предстательной железы 22Rv1

Table 4. Antitumor activity of pharmacological pairs C115H MGL-Dz/propine, C115H MGL-Dz/PBS and C115H MGL/propine in 22Rv1 prostate cancer model

| Группа<br>Group                                                           | Начальный объем<br>опухоли, мм <sup>3</sup><br>Initial tumor<br>volume, mm <sup>3</sup> | Конечный объем<br>опухоли, мм <sup>3</sup><br>Final tumor<br>volume, mm <sup>3</sup> | ТРО, %<br>TGI, % | Начальная масса<br>тела мыши, г<br>Initial body weight<br>of a mouse, g | Конечная масса<br>тела мыши, г<br>Final body weight<br>of a mouse, g |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 1-я (контроль)<br>1 <sup>st</sup> (control)                               | 98,7 ± 45,4                                                                             | 460,2 ± 108,0                                                                        | —                | 25,2 ± 1,6                                                              | 28,8 ± 1,2                                                           |
| 2-я (C115H МГЛ-Dz/про-<br>пиин)<br>2 <sup>nd</sup> (C115H MGL-Dz/propine) | 105,4 ± 55,7                                                                            | 138,5 ± 73,3                                                                         | 70*              | 25,2 ± 2,8                                                              | 25,8 ± 2,3                                                           |
| 3-я (C115H МГЛ-Dz/PBS)<br>3 <sup>rd</sup> (C115H MGL-Dz/PBS)              | 119,8 ± 82,3                                                                            | 352,1 ± 144,8                                                                        | 23**             | 24,6 ± 1,4                                                              | 23,7 ± 3,7                                                           |
| 4-я (C115H МГЛ/пропиин)<br>4 <sup>th</sup> (C115H MGL/propine)            | 104,2 ± 91,1                                                                            | 436,1 ± 268,6                                                                        | 5***             | 25,3 ± 0,4                                                              | 26,1 ± 0,8                                                           |

\*  $p = 0,043$ ; \*\*  $p = 0,165$ ; \*\*\*  $p > 0,05$ .

в опухоль C115H МГЛ-Dz катализируют расщепление сульфоксидов с образованием тиосульфидов, обладающих противоопухолевой активностью. При лечении животных фармакологической парой C115H МГЛ-Dz/пропиин наблюдалось значительное уменьшение объема опухоли для всех линий. Существенных изменений массы тела мышей не наблюдалось ни в одной из групп. Это свидетельствует о том, что схема лечения хорошо переносится и не имеет явных побочных эффектов. В опытных группах — C115H МГЛ-Dz/PBS и C115H МГЛ/пропиин — не наблюда-

лось значительного эффекта в уменьшении объема опухоли во всех исследованных клеточных линиях *in vivo*.

### Выводы

Получены конъюгаты C115H МГЛ из *Clostridium novyi* с дайдзеином. Цитотоксичность конъюгата в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина была продемонстрирована *in vitro* на различных линиях опухолевых клеток. Фармакологическая пара C115H МГЛ-Dz/пропиин уменьшала рост солидных злокачественных новообразований *in vivo*. Наиболее

чувствительными оказались ксенографты 22Rv1. Использование конъюгированной с дайдезином C115H МГЛ в качестве компонента фармакологической пары C115H МГЛ-Dz/сульфоксиды S-алк(ен)ил-

L-цистеина позволяет вырабатывать противоопухолевые тиосульфиды непосредственно у поверхности раковой клетки и тем самым значительно минимизировать возможные негативные побочные эффекты.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Henderson B.E., Ross R.K., Pike M.C., Casagrande J.T. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 1982;42(8):3232–9.
- Tanaka H., Esaki N., Soda K. A versatile bacterial enzyme: L-methionine  $\gamma$ -lyase. *Enzyme Microb Technol* 1985;7(11):530–7. DOI: 10.1016/0141-0229(85)90094-8
- Morozova E., Anufrieva N., Koval V. et al. Conjugates of methionine  $\gamma$ -lyase with polysialic acid: two approaches to antitumor therapy. *Int J Biol Macromol* 2021;182:394–401. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.201
- Fujisawa H., Watanabe K., Suma K. et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73(9):1948–55. DOI: 10.1271/bbb.90096
- Weber N.D., Andersen D.O., North J.A. et al. *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med* 1992;58(5):417–23. DOI: 10.1055/s-2006-961504
- Hoffman R.M. Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15(1):21–31. DOI: 10.1517/14712598.2015.963050
- Pokrovsky V.S., Anisimova N.Yu., Davydov D.Zh. et al. Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts. *Invest New Drugs* 2019;37(2):201–9. DOI: 10.1007/s10637-018-0619-4
- Filardo E.J., Quinn J.A., Frackelton A.R.J., Bland K.I. Estrogen action *via* the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16(1):70–84. DOI: 10.1210/mend.16.1.0758
- Mesmar F., Dai B., Ibrahim A. et al. Clinical candidate and genistein analogue AXP107-11 has chemoenhancing functions in pancreatic adenocarcinoma through G protein-coupled estrogen receptor signaling. *Cancer Med* 2019;8(18):7705–19. DOI: 10.1002/cam4.2581
- Ariyani W., Miyazaki W., Amano I. et al. Soy isoflavones accelerate glial cell migration *via* GPER-mediated signal transduction pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:554941. DOI: 10.3389/fendo.2020.554941
- Jacenic D., Beswick E.J., Krajewska W.M., Prossnitz E.R. G protein-coupled estrogen receptor in colon function, immune regulation and carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2019;25(30):4092–104. DOI: 10.3748/wjg.v25.i30.4092
- Chan Q.K.Y., Lam H.-M., Ng C.-F. et al. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G2 cell-cycle arrest. *Cell Death Differ* 2010;17(9):1511–23. DOI: 10.1038/cdd.2010.20
- Sarkar F.H., Li Y. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest* 2003;21(5):744–57. DOI: 10.1081/CNV-120023773
- Morozova E.A., Kulikova V.V., Rodionov A.N. et al. Engineered *Citrobacter freundii* methionine  $\gamma$ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfonates. *Biochimie* 2016;128–129:92–8. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.07.007
- Kulikova V., Morozova E., Rodionov A. et al. Non-stereoselective decomposition of ( $\pm$ )-S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides to antibacterial thiosulfonates catalyzed by C115H mutant methionine  $\gamma$ -lyase from *Citrobacter freundii*. *Biochimie* 2018;151:42–4. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.05.011
- Kulikova V.V., Morozova E.A., Revtovich S.V. et al. Gene cloning, characterization, and cytotoxic activity of methionine  $\gamma$ -lyase from *Clostridium novyi*. *IUBMB Life* 2017;69(9):668–76. DOI: 10.1002/iub.1649
- Morozova E.A., Bazhulina N.P., Anufrieva N.V. et al. Kinetic and spectral parameters of interaction of *Citrobacter freundii* methionine  $\gamma$ -lyase with amino acids. *Biochemistry (Moscow)* 2010;75(10):1272–80. DOI: 10.1134/S0006297910100093
- Kohen F., Gayer B., Kulik T. et al. Synthesis and evaluation of the antiproliferative activities of derivatives of carboxyalkyl isoflavones linked to N-t-Boc-hexylenediamine. *J Med Chem* 2007;50(25):6405–10. DOI: 10.1021/jm070727z
- Bank U., Reinhold D., Ansorge S. [Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method (In German)]. *Allerg Immunol (Leipzig)* 1991;37(3–4):119–23.

### Благодарности

Авторы благодарят д.б.н. Н.Ю. Анисимову, ведущего научного сотрудника Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, за помощь в проведении экспериментов *in vitro*.

### Acknowledgments

The authors thank N.Yu. Anisimova, PhD, DSc, a leading researcher at the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, for assistance in conducting experiments *in vitro*.

### Вклад авторов

Л. Або Кура: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи; Е.А. Морозова, В.С. Покровский: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных; В.С. Коваль, В.В. Куликова, Т.С. Спирина, Е.А. Демидова: получение данных для анализа, анализ полученных данных; Т.В. Демидкина: разработка дизайна исследования.

**Author's contribution**

L. Abo Qoura: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article, writing of the manuscript;  
E.A. Morozova, V.S. Pokrovsky: research design development, review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data;  
V.S. Koval., V.V. Kulikova, T.S. Spirina, E.A. Demidova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;  
T.V. Demidkina: research design development.

**ORCID авторов / ORCID of authors**

Л. Або Кура / L. Abo Qoura: <https://orcid.org/0000-0001-5391-5077>  
Е.А. Морозова / E.A. Morozova: <https://orcid.org/0000-0003-2922-2793>  
В.В. Куликова / V.V. Kulikova: <https://orcid.org/0000-0003-0618-1407>  
В.С. Покровский / V.S. Pokrovsky: <https://orcid.org/0000-0003-4006-9320>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Эксперименты *in vitro* и *in vivo* выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор о субсидиях № 075-15-2021-1060 от 28 сентября 2021 г.). Синтез дайдзеина и конъюгатов C115H-Dz поддержан Российским научным фондом (проект № 20-14-00258).

**Funding.** *In vitro* and *in vivo* experiments were performed with the financial support by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement on subsidies No. 075-15-2021-1060 dated on September 28, 2021). The synthesis of daidzein and conjugate C115H MGL-Dz was supported by the Russian Science Foundation (project No. 20-14-00258).

**Соблюдение правил биоэтики.** Все эксперименты проводили в соответствии с этическими требованиями к исследованиям на биологических моделях и экспериментальных животных, утвержденными в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

**Compliance with principles of bioethics.** The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia local ethics committee for animal trials.

Статья поступила: 08.10.2022. Принята к публикации: 07.11.2022.

Article received: 08.10.2022. Accepted for publication: 07.11.2022.