

на таких моделях открывает возможность их использования при доклиническом изучении новых таргетных препаратов, в частности направленных на рецепторы к  $\alpha$ -фетопротеину (АФП) (receptors for alfa fetoprotein, ReCAF).

**Цель исследования** – определение экспрессии ReCAF на опухолевых моделях, предлагаемых для доклинического изучения АФП-содержащих препаратов.

**Задачи исследования.** 1) Адаптация метода компетентного хемилюминесцентного анализа на специфических моноклональных антителах (МКА) для гомогенатов и культуры клеток опухолей человека; 2) количественное определение экспрессии ReCAF в опухолевых моделях.

**Материалы и методы.** Использовали гомогенаты п/к ксенографтов опухолей человека (рак молочной железы Т47D, рак толстой кишки SW620) у Balb/c nude мышей и культуру клеток рака печени HepG2. Опухоли сонифицировали 30 с на льду ультразвуковым гомогенизатором (BILON-150Y, КНР) при 60 Вт (40 %) с последующим центрифугированием 10 мин при 13000 об/мин до получения однородных гомогенатов-супернатантов для иммунохемилюминесцентного анализа (ИХА). Для количественного определения ReCAF в гомогенатах использовали ранее разработанный ИХА «РЕКАФ», основанный на компетентном одностадийном анализе присутствующих в образце молекул АФП-рецептора с фиксированным количеством меченого конъюгата (АФП-рецептор – акридин) за связывание со специфическими МКА. Гомогенат нормальной ткани мыши служил отрицательным контролем, клеточная суспензия К-562 – положительным контролем. Наличие рецепторов АФП в гомогенатах опухолей подтверждали по стандартной методике Лэммли на полиакриламидном гель-электрофорезе и вестерн-блоттингом с использованием специфических МКА.

**Результаты.** Результаты ИХА показали, что в гомогенате Т47D содержится 9152 Ед/мл, в гомогенате SW620–2839 Ед/мл, а в культуре клеток HepG2–4865 Ед/мл ReCAF. Видно, что количество ReCAF убывает в ряду Т47D > HepG2 > SW620. В контрольных и тестируемых образцах по этой методике выявлено большое количество рецепторов с молекулярной массой 67 кДа, которые подтверждены на полиакриламидном гель-электрофорезе и иммунологически при помощи МКА.

**Заключение.** Таким образом, из протестированных моделей наиболее адекватной для доклинического изучения АФП-содержащих таргетных препаратов можно считать рак молочной железы человека Т47D с аутокринным типом гормональной зависимости, дающий п/к ксенографты у иммунодефицитных мышей.

*Ж.Р. Черкасова<sup>1</sup>, С.А. Цуркан<sup>1</sup>, Г.Б. Смирнова<sup>2</sup>,  
Ю.А. Борисова<sup>2</sup>, Е.М. Трещалина<sup>2</sup>*

#### СПЕЦИФИЧНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ПРЕПАРАТА АИМПИЛА С РЕЦЕПТОРАМИ $\alpha$ -ФЕТОПРОТЕИНА НА ПОВЕХНОСТИ ОПУХОЛИ ЧЕЛОВЕКА Т47D ИЗ КОЛЛЕКЦИИ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА

<sup>1</sup>ООО «ФНЦ «Фармаксес», Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

**Введение.** Препарат Аимпила представляет собой запатентованный в РФ пероральный нековалентный ком-

плекс, состоящий из транспортного белка  $\alpha$ -фетопротеина (АФП) и известного индуктора апоптоза. Ранее показано, что препарат активен *in vivo* на подкожных (п/к) ксенографтах некоторых опухолей человека, экспрессирующих рецепторы АФП. Уровень ингибирования роста п/к опухолей сопряжен с уровнем экспрессии рецепторов в гомогенатах или суспензии опухолей. Наиболее чувствительным оказался рак молочной железы человека Т47D/АФП<sup>+++</sup>. Специфичность связывания препарата Аимпила с АФП-рецептором в опухоли ранее не изучали.

**Цель исследования** – определение специфичности связывания препарата Аимпила с рецепторами АФП в гомогенатах наиболее чувствительной модели опухоли человека.

**Задачи исследования.** 1) Разработка твердофазного иммунохемилюминесцентного анализа (ИХА) по типу «сэндвич» на специфических моноклональных антителах (МКА) для гомогенатов и культуры клеток опухолей человека; 2) количественное определение связывания препарата Аимпила с АФП-рецептором в п/к ксенографтах Т47D/АФП<sup>+++</sup>.

**Материалы и методы.** Для тестирования использовали конъюгат препарата Аимпила с акридином и гомогенат п/к ксенографтов рака молочной железы человека Т47D/АФП<sup>+++</sup> у Balb/c nude мышей. Опухоль сонифицировали 30 с на льду ультразвуковым гомогенизатором (BILON-150Y, КНР) при 60 Вт (40 %) с последующим центрифугированием 10 мин при 13000 об/мин до получения однородных гомогенатов-супернатантов для проведения разработанного нами ИХА. Твердофазный ИХА с высокоспецифичными МКА типа IgM к рецептору АФП проводили в 2 стадии: 1) связывание молекул рецептора АФП в гомогенате Т47D с МКА, иммобилизованными на твердой фазе, где серию разбавлений гомогената наносили вертикально на планшет с МКА и выдерживали 2 ч; 2) на иммобилизованном планшете горизонтально проводили двукратные разбавления люминесцентного конъюгата и измеряли результаты связывания на 96-микропланшетном флуориметре Glomax (Promega, США) после часовой инкубации при комнатной температуре и тщательного промывания микроплшета.

**Результаты.** Конъюгат Аимпила – акридин в концентрации 800 нг/мл демонстрирует высокую специфичность связывания с АФП-рецепторами высокочувствительной к нему Т47D/АФП<sup>+++</sup> независимо от разбавления гомогената. При этом максимальный эффект наблюдался при 10-кратном разбавлении гомогената Т47D/АФП<sup>+++</sup> без «насыщения» центров связывания. Чувствительность системы ограничена степенью разбавления гомогената.

**Заключение.** Препарат Аимпила проявляет высокую специфичность связывания с рецепторами АФП в относительно низкой концентрации 800 нг/мл в чувствительной к нему опухоли – раке молочной железы Т47D/АФП<sup>+++</sup>. Увеличение специфичности связывания с рецептором до максимального «насыщения» системы возможно при увеличении концентрации Аимпила и плотности гомогената. Полученные данные позволяют предположить, что связанные с рецептор-опосредованным действием эффекты Аимпила будут проявляться в невысоких разовых дозах и дозозависимо.