

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

На правах рукописи

Бейрахова Ксения Андреевна

**Рекомбинантные полипептиды для терапии глазных
заболеваний, сопровождающихся патологическим ангиогенезом**

специальность - 02.00.10 - биоорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Москва 2012

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биорганической химии им.академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук

Научные руководители:

кандидат химических наук
Есипов Роман Станиславович

доктор медицинских наук
Лихванцева Вера Геннадьевна

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАН
доктор химических наук, профессор,
Цетлин Виктор Ионович

кандидат химических наук, доцент
Демидюк Илья Валерьевич


Ведущая организация:

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии
им. В. А. Энгельгардта Российской
академии наук

Защита состоится 18 апреля 2012 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу: 117997 ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биорганической химии им.академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук

Автореферат разослан « 16 » марта 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук  В.А. Олейников

Актуальность проблемы.

Неоваскуляризация является основной причиной снижения зрительных функций при возрастной макулярной дегенерации (ВМД), пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР), ретинопатии недоношенных, хронической хориоидальной неоваскуляризации при близорукости и др. Распространенность этих заболеваний неуклонно прогрессирует. По данным ВОЗ за 2008 г только количество заболевших ВМД превысило 8 млн. человек. Антиангиогенная терапия этих заболеваний признана перспективным методом лечения. Современная стратегия антиангиогенной терапии в офтальмологии основана на применении препарата (Луцентис), ингибирующего действие сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), ключевого фактора неоангиогенеза. Узкая направленность ингибиторов VEGF и наличие обходных путей ангиогенеза с участием других проангиогенных молекул объясняют их неполноценный и непродолжительный клинический эффект. В этом аспекте представляет научный и практический интерес исследование природных биологически активных белков и их фрагментов, обладающих ангиостатическими свойствами, избирательно проявляющимися на разных этапах ангиогенеза, слабой иммуногенностью и токсичностью с целью создания на их основе инновационных лекарственных препаратов офтальмологического назначения.

Цель работы.

Цель настоящего исследования: получение рекомбинантных аналогов функциональных фрагментов природных ингибиторов ангиогенеза, изучение их способности блокировать различные этапы ангиогенеза и исследование биологической активности полученных полипептидов *in vivo* на моделях заболеваний глаз, сопровождающихся патологическим ангиогенезом.

Для создания рекомбинантных полипептидов были выбраны биологически активные фрагменты трёх эндогенных ингибиторов ангиогенеза: фрагмент фактора дифференцировки пигментного эпителия (PEDF) (44-77), фрагмент тумстатина (L69K-95) и фрагмент эндостатина (1-49).

Основными задачами работы являются:

1. Создание эффективных штаммов-продуцентов гибридных белков, содержащих фрагменты PEDF (44-77), тумстатина (L69K-95) и эндостатина (1-49);
2. Разработка эффективных схем выделения и очистки полипептидов, представляющих собой рекомбинантные аналоги фрагментов PEDF (44-77), тумстатина (69-95) и эндостатина (1-49);
3. Изучение биологических свойств полученных полипептидов на моделях различных этапов развития неоангиогенеза *in vitro*.

4. Исследование *in vivo* биологической активности пептидов на экспериментальных моделях неоваскуляризации роговицы.

Научная новизна:

Разработаны новые эффективные способы получения рекомбинантных аналогов фрагментов эндогенных ингибиторов ангиогенеза (PEDF (44-77) тумстатина (L69K-95) и эндостатина (1-49)). Впервые исследована антиангиогенная активность фрагмента эндостатина (1-49) на моделях неоангиогенеза *in vitro*. Впервые исследована биологическая активность фрагментов тумстатина (L69K-95) и эндостатина (1-49) на экспериментальной модели патологической неоваскуляризации роговицы.

Практическая значимость

Предложен метод выделения целевых полипептидов, позволяющий исключить стадию ферментативного расщепления гибридного белка за счет использования мини-интеина в качестве белка-носителя, и таким образом снизить себестоимость получения полипептидов. Дана количественная оценка антиангиогенной активности рекомбинантных аналогов PEDF (44-77), тумстатина (L69K-95) и эндостатина (1-49). Экспериментально подобраны предполагаемые терапевтические дозы рекомбинантных полипептидов PEDF (44-77), эндостатина (1-49) и тумстатина (L69-95).

Основные положения, выносимые на защиту.

Полученные рекомбинантные аналоги фрагментов PEDF (44-77), тумстатина (69-95) и эндостатина (1-49) обладают антиангиогенной активностью на различных этапах неоангиогенеза: подавляют пролиферацию эндотелиальных клеток и образование трубчочкоподобных структур *in vitro* и препятствуют развитию патологической неоваскуляризации *in vivo*.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на международных и российских конференциях: IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008); V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011); научно-практической конференции «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Крым, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 105 страницах, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, списка цитированной литературы (209 ссылок). Диссертация включает 5 таблиц и 32 рисунка.

Основное содержание работы

1. Введение

Использование эндогенных ингибиторов ангиогенеза для лечения неоваскулярных заболеваний глаз может представлять собой альтернативу применяемой сегодня в офтальмологии терапии, направленной на подавление действия сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). Многие эндогенные ингибиторы продемонстрировали высокую активность на этапе биологических испытаний *in vitro*, однако подтвердить их активность в клинике в виде полного подавления неоангиогенеза и/или резорбции новообразованных патологических сосудов с их помощью до сих пор не удавалось. Это может объясняться наличием различных компенсаторных и/или обходных путей развития неоваскуляризации.

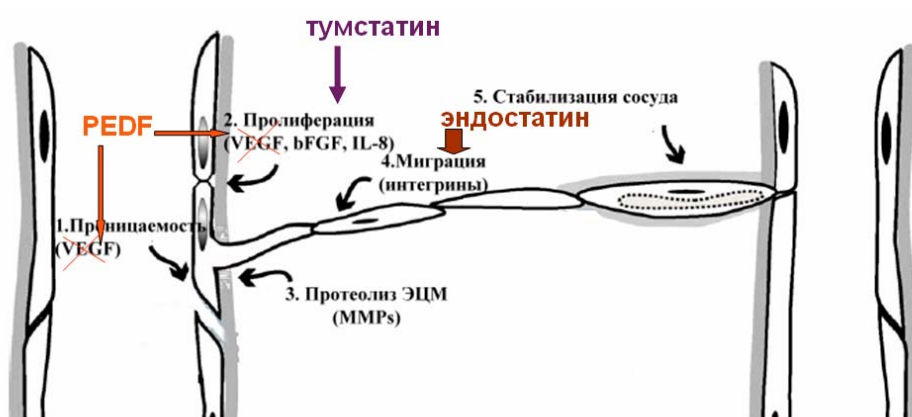


Рисунок 1. Воздействие эндогенных ингибиторов ангиогенеза PEDF, тумстатина и эндостатина на разные этапы ангиогенеза. VEGF - сосудистый эндотелиальный фактор роста, bFGF - основной фактор роста фибробластов, ЭЦМ - экстрацеллюлярный матрикс, MMPs - матриксные металлопротеиназы.

В этой связи перспективным представляется использование для терапии неоваскулярных заболеваний комплекса из нескольких антиангиогенных препаратов, избирательно блокирующих различные этапы развития неоваскуляризации. В качестве кандидатов для создания такого комплекса мы выбрали биологически активные фрагменты трёх эндогенных ингибиторов ангиогенеза: PEDF, тумстатина и эндостатина. Действуя как антагонист VEGF, PEDF снижает его экспрессию; дефицит этого фактора в глазу способствует запуску патологического неоангиогенеза. Восполнение дефицита PEDF может оказаться эффективным на самых ранних стадиях развития неоваскуляризации. Фрагменты коллагенов тумстатин и эндостатин блокируют более поздние этапы развития ангиогенеза, связываясь с интегринами на поверхности пролиферирующих эндотелиальных клеток, присутствующих в патологических кровеносных сосудах пациентов с активной неоваскуляризацией. Тумстатин подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток, связываясь с интегрином

$\alpha v\beta 3$. Эндостатин предотвращает миграцию эндотелиальных клеток, действуя через интегрин $\alpha 5\beta 1$, и таким образом ингибирует ангиогенез отличным от тумстатина путём (Рисунок 1).

На основе анализа литературных данных мы определили минимальные функциональные фрагменты указанных эндогенных ингибиторов. Полученные нами модифицированные рекомбинантные аналоги этих фрагментов были исследованы на моделях различных этапов развития патологической неоваскуляризации *in vitro* и *in vivo* на глазах экспериментальных животных.

2. Получение рекомбинантного фрагмента тумстатина (L69K-95)

Тумстатин (28кДа), фрагмент цепи $\alpha 3$ коллагена IV типа, проявляет антиангиогенные свойства, связываясь с интегрином $\alpha v\beta 3$ на поверхности ЭК. Антиангиогенная активность локализована в фрагменте тумстатина (69-95) (пептид Т8). Свойства данного активного фрагмента были исследованы преимущественно в опухолевых моделях. Представляет большой интерес изучение биологической активности пептида Т8 не только на опухолевых, но других моделях заболеваний связанных с неоангиогенезом. Мы взяли последовательность пептида Т8 за основу при разработке рекомбинантного аналога активного фрагмента тумстатина.

Создание штамма-продуцента гибридного белка, содержащего тумстатин (L69K-95)

Для обеспечения высокого уровня биосинтеза гибридного белка была выбрана экспрессионная система на основе вектора рЕТ32b(+) и штамма *E. coli* ER2566. Плазмида рЕТ32b(+) кодирует последовательность гена тиоредоксина А и аффинную группу из шести остатков гистидина. В данный вектор ввели нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт узнавания протеиназы вируса гравировки табака (TEV протеазы) ENLYFQ/S. Для обеспечения стерической доступности сайта его поместили между двумя гибкими глицин-содержащими линкерами. В полученной рекомбинантной плазмиде рTVG затем клонировали ген тумстатина (L69K-95).

Ген тумстатина (L69K-95), оптимизированный по составу кодонов для эффективной экспрессии в клетках *E. coli*, синтезировали из перекрывающихся олигонуклеотидов и клонировали в векторной плазмиде рGEM5zf(-). Для увеличения стабильности пептида *in vivo* к искусственному гену тумстатина (L69K-95) была добавлена последовательность, кодирующая три дополнительные аминокислоты на С-конце пептида (Pro-Gly-Pro).

Полученную плазмиду рGEM-Т8 обрабатывали рестриктазами *NcoI* и *HindIII*, выделяли фрагмент, несущий целевой ген, и проводили лигирование с рекомбинантным век-

тором рTVG, расщепленным по тем же сайтам рестрикции. Полученной рекомбинантной плазмидой рTVG-T8 (Рисунок 2) трансформировали штамм-носитель *E. coli* ER2566.

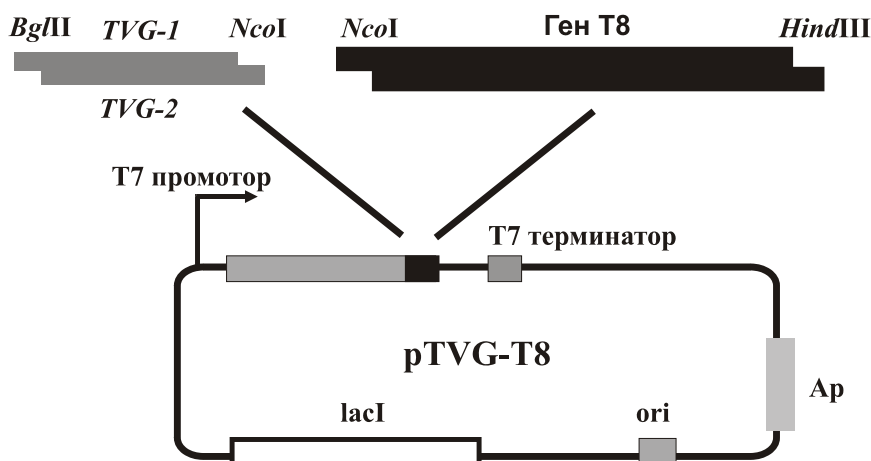


Рисунок 2. Рекомбинантная плазмида рTVG-T8. TVG-1, TVG-2 – перекрывающиеся олигонуклеотиды, кодирующие сайт расщепления TEV протеазы; trxA – ген, кодирующий тиоредоксин А.

В результате был создан продуцент *E. coli* ER2566/pTVG-T8, синтезирующий гибридный белок TVG-T8 (21,2 кДа), состоящий из тиоредоксина, аффинной группы из шести гистидинов, сайта расщепления TEV протеазой (ENLYFQ/S) и тумстатина (L69K-95):



Штамм-продуцент *E. coli* ER2566/pTVG-T8 культивировали в закрепленных качалочных колбах в среде LB при 37°C. Биосинтез гибридного белка индуцировали добавлением ИПТГ (изопропилтио-β-D-галактопиранозид). Получали 3 г влажных клеток с 1 литра культуры. Гибридный белок синтезировался в растворимой форме. Уровень биосинтеза гибридного белка составил 25% от суммарного клеточного белка (Рисунок 3, дорожка 1).

Очистка гибридного белка TVG-T8 с помощью аффинной хроматографии

Гибридный белок TVG-T8 содержал в своём составе аффинную группу из шести остатков гистидина, поэтому мы осуществляли очистку этого белка с использованием аффинного сорбента Ni²⁺-IDA Sepharose. Биомассу штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pTVG-T8 разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора, осветлённый клеточный лизат наносили на колонку с аффинным сорбентом. Элюцию целевого белка TVG-T8 производили градиентом концентрации имидазола (20-500 мМ). Фракции, содержащие очищенный целевой белок, объединяли (Рисунок 3, дорожка 2).

Получение рекомбинантной протеиназы вируса гравировки табака (TEV протеазы).

Ген TEV протеазы был получен из ИБФМ РАН. Ген клонировали в векторе рЕТ23b+ по сайтам *EcoRI* и *HindIII*. Полученной экспрессионной плазмидой рER-TEV трансформировали клетки *E. coli* ER2566. Штамм ER2566/pER-TEV продуцировал рекомбинантную TEV протеазу, содержащую на N-конце лидерную последовательность, обеспечивающую высокий уровень биосинтеза белка, а на C-конце аффинную группу из 6 остатков гистидина. TEV протеазу получали в виде нерастворимых телец включения. Фермент экстрагировали из телец включения буфером, содержащим мочевины (8 М). Дальнейшую очистку фермента производили при помощи металл-аффинной хроматографии с использованием сорбента Ni²⁺-IDA Sepharose.

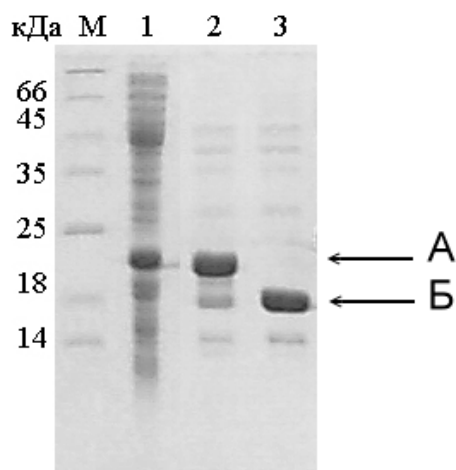


Рисунок 3. Очистка и расщепление гибридного белка TVG-T8. Электрофорез в денатурирующих условиях в 13% ПААГ. М стандарт молекулярных масс; 1 тотальный клеточный лизат штамма ER2566/pTVG-T8; 2 очищенный с помощью аффинной хроматографии TVG-T8; 3 расщепление TVG-T8 TEV протеазой. А - TVG-T8, Б – остаточный полипептид, состоящий из тиоредоксина и сайта расщепления TEV протеазы.

Выделение и очистка рекомбинантного пептида Т8.

Очищенный с помощью аффинной хроматографии белок TVG-T8 обрабатывали TEV протеазой при соотношении фермент : субстрат 1:100. Выход реакции достигал 98% (Рисунок 3, дорожка 3).

Продукты реакции анализировали с применением ОФ ВЭЖХ (Рисунок 4А) и масс-спектрометрии. Масса пептида, соответствующего пику 1 на хроматограмме, совпала с теоретически рассчитанной массой пептида Т8 в восстановленной форме (3872.4 Да). Для рефолдинга пептида была использована окислительно-восстановительная пара GSH/GSSG (10:1). Молекулярный вес окисленного Т8 (Рисунок 4Б) составил 3870.72 Да.

Очистку пептида Т8 от тиоредоксина и TEV протеазы производили с помощью ультрафильтрации на установке Amicon. Была применена мембрана YM10 (Millipore). На завершающей стадии пептид Т8 очищали с помощью ОФ ВЭЖХ. Фракции, содержащие пептид объединяли и лиофильно высушивали.

Масштабирование схемы выделения и очистки рекомбинантного пептида Т8

Выход пептида Т8 при очистке по разработанной нами схеме составил 4 мг с 1 л культуральной среды. Для наработки экспериментальной партии пептида Т8 для биологических испытаний (200 мг) было необходимо масштабировать схему выделения и очистки пептида. Переход культивирования штамма-производителя с качалочных колб на ферментёр сразу позволил добиться значительного увеличения, не менее чем в 3 раза, количества получаемой биомассы с литра культуры.

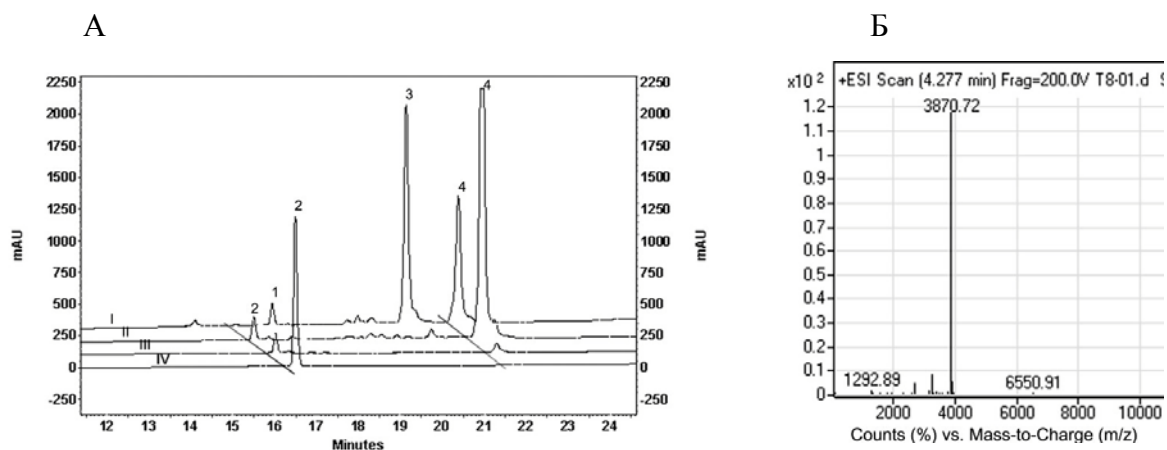


Рисунок 4. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ полипептидных продуктов на разных стадиях получения пептида Т8. А – ОФ ВЭЖХ на колонке с сорбентом Prosphere C-18 300 А 5μ, градиент ацетонитрила (8 – 64 %) в 0,1 % ТФУ, скорость потока 0,75 мл/мин. I - продукты расщепления TVG-T8 протеазой TEV, II - продукты расщепления ГБ TVG-T8 после ре-фолдинга, III – пептид Т8 после очистки от тиоредоксина, IV – пептид Т8, очищенный с помощью ОФ ВЭЖХ (чистота > 99 %); 1 – восстановленный Т8, 2 – ренатурированный Т8, 3 – восстановленный тиоредоксин, 4 – окисленный тиоредоксин; Б - ESI-TOF масс-спектр ренатурированного пептида Т8.

Ферментация продуцента *E. coli* ER2566/pTVG-T8 была проведена на участке экспериментальной ферментации отдела биологического производства (ОБП) ИБХ РАН. Целевой белок синтезировался в растворимой форме и составлял до 40 % от суммарного клеточного белка (Рисунок 5, дорожка 1).

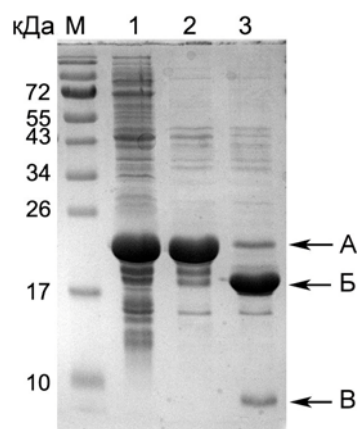


Рисунок 5. Масштабирование стадий очистки и протеолитическое расщепление ГБ TVG-T8 (15% SDS-PAGE). **М** – стандарты молекулярных масс; **1** – осветлённый клеточный лизат продуцента ER2566/pTVG-T8; **2** – объединённая фракция после ионообменной хроматографии, содержащая гибридный белок TVG-T8; **3** – расщепление TVG-T8 протеазой TEV. А - TVG-T8, Б – лидерный полипептид, состоящий из тиоредоксина и сайта расщепления TEV протеазы, В – пептид Т8.

При масштабировании процесса выделения мы отказались от использования аффинного сорбента, и очистку гибридного белка проводили на колонке с анионообменном сорбентом Q Sepharose XL (Рисунок 5, дорожка 2) (рН 9,0, элюция градиентом NaCl 70-300 мМ). Указанный сорбент обладает значительной химической и механической устойчивостью, выдерживает высокие скорости потока может применяться как в лабораторных, так и в промышленных масштабах. Очищенный с помощью ионообменной хроматографии TVG-T8 обрабатывали TEV протеазой при соотношении фермент : субстрат 1:100. Выход реакции достигал 95% (Рисунок 5, дорожка 3).

Таблица 1. Выделение и очистка рекомбинантного пептида Т8 (из 1 л культуральной среды)

Этап очистки	Общий белок (мг)	Содержание ГБ (%)	Содержание Т8 (%)
Осветлённый клеточный лизат	2217,0	40	
Ионообменная хроматография на сорбенте Q XL (1)	877,5	85	
Расщепление ГБ TEV протеазой	877,5		14,5
Ионообменная хроматография на сорбенте Q XL (2)	112,5		78
ОФ ВЭЖХ	78,75		98

После рефолдинга пептида (в описанных ранее условиях) проводилась повторная хроматография на колонке с Q-Sepharose XL. Были подобраны условия нанесения раство-

ра, при которых 90% высокомолекулярных полипептидов (тиоредоксин и TEV протеаза) задерживались на колонне, а целевой пептид не сорбировался на смоле.

На завершающей стадии пептид Т8 очищали с помощью ОФ ВЭЖХ. Фракции, содержащие пептид чистотой более 98% объединяли и лиофильно высушивали. Выход пептида составил 78,8 мг с 1 л культуры (Таблица 1).

3. Получение рекомбинантного фрагмента PEDF (44-77)

Фактор дифференцировки пигментного эпителия (pigment epithelium-derived factor, PEDF) - гликопротеин (молекулярный вес 50 кДа) из группы ингибиторов сериновых протеиназ, секретируемый клетками пигментного эпителия. PEDF является эффективным эндогенным ингибитором ангиогенеза: он препятствует миграции эндотелиальных клеток, блокирует патологический рост сосудов и снижает экспрессию VEGF, ключевого проангиогенного фактора.

Фрагмент PEDF (аминокислотные остатки с 44 по 77) обладает всем спектром антиангиогенных эффектов полноразмерного белка. Для исследования биологической активности фрагмента PEDF (44-77) нами был синтезирован его рекомбинантный аналог. Целевой пептид получали в составе слитного белка с модифицированным мини-интеином *SspDnaB*. Использование мини-интеина в качестве белка-носителя при биотехнологическом получении пептидов медицинского назначения имеет ряд преимуществ: при расщеплении гибридного белка N-концевая аминокислота пептида не модифицируется; расщепление гибридной конструкции стимулируется сдвигом pH и не требует применения дорогостоящих специфических протеиназ или реактивов.

Создание штамма-продуцента гибридного белка SspDnaB-PEDF(44-77)

Искусственный ген фрагмента PEDF (44-77), оптимизированный по составу кодонов для экспрессии в *E. coli*, был синтезирован из перекрывающихся олигонуклеотидов и клонирован в векторе pGEM5zf(-). Для увеличения стабильности пептида *in vivo* к искусственному гену PEDF (44-77) была добавлена последовательность, кодирующая три дополнительные аминокислоты на C-конце пептида (Pro-Gly-Pro).

Полученную плазмиду расщепляли рестриктазами *SapI* и *BamHI*, выделяли фрагмент, несущий целевой ген, и клонировали его в векторе pTWIN2, предварительно обработанном этими же рестриктазами. Экспрессионный вектор pTWIN2 кодирует гены интеина *SspDnaB* и хитин-связывающего домена под контролем промотора из бактериофага T7 и обеспечивает суперэкспрессию гибридной конструкции в соответствующих штаммах *E. coli*. В качестве штамма-носителя для полученной экспрессионной плазмиды pTWIN-PEDF использовали штамм *E. coli* ER2566. В результате был создан продуцент *E. coli*

ER2566/pTWIN-PEDF, в котором при биосинтезе образуется гибридный белок SspDnaB-PEDF(44–77) (29,2 кДа), состоящий из хитин-связывающего домена (CBD, 6,4 кДа) интеина SspDnaB (17,3 кДа) и целевого фрагмента PEDF-(44–77) (4 кДа):

CBD	SspDnaB	DPFFKVPVNKLAAAVSNFGYDLYRVRSSMSPTTNPGR
-----	---------	---------------------------------------

Ферментация продуцента *E. coli* ER2566/pTWIN-PEDF была проведена на участке экспериментальной ферментации отдела биологического производства (ОБП) ИБХ РАН. Уровень биосинтеза гибридной конструкции составил 43% от суммарного клеточного белка. Гибридный белок SspDnaB-PEDF(44–77) синтезировался в нерастворимой форме, автокаталитическое расщепление *in vivo* не превышало 5% (

Рисунок 6, дорожка 1).

Очистка гибридного белка SspDnaB-PEDF(44–77)

Тельца включения (ТВ), содержащие гибридный белок SspDnaB-PEDF(44–77), выделяли из лизата продуцента *E. coli* ER2566/pTWIN-PEDF с помощью центрифугирования и отмывали сначала буфером для разрушения, а затем дистиллированной водой. Гибридный белок солюбилизировали в щелочном буферном растворе (рН 9,0), содержащем мочевины (8 моль/л).

Реакцию автокаталитического расщепления ГБ производили в растворе. Экстракт телец включения титровали до значений рН 7,0-7,2 и затем снижали концентрацию мочевины разбавлением раствора белка. Эффективность реакции расщепления в таких условиях достигала 77% (

Рисунок 6, дорожка 3).

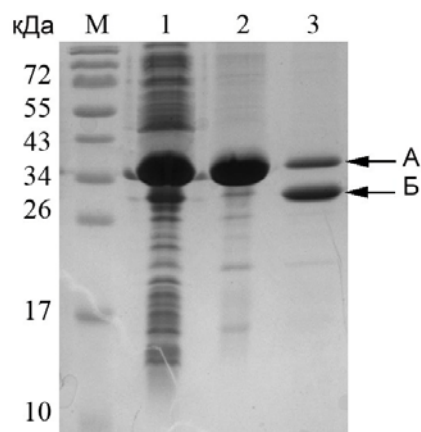


Рисунок 6. Биосинтез, очистка и расщепления гибридного белка SspDnaB-PEDF. Электрофорез в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. **М** – стандарты молекулярных масс; **1** – тотальный клеточный лизат штамма-продуцента ER2566/pTWIN-PEDF; **2** – экстракт телец включения; **3** – расщепление гибридного белка SspDnaB-PEDF (время реакции – 12 ч, температура - 25°C). А –

гибридный белок SspDnaB-PEDF, Б – лидерный полипептид (интеин SspDnaB и хитин-связывающий домен).

Очистка пептида PEDF-(44–77)

Очистку PEDF-(44–77) от интеина проводили методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембраны VivaFlow 50 10 000 MWCO RC (регенерированная целлюлоза). Фильтрат концентрировали в 20 раз на мембране VivaFlow 50 3000 MWCO PES (полиэфирсульфон), а затем ещё в 20 раз на системе Amicon (мембрана Ultracel YM-3, регенерированная целлюлоза).

На последней стадии PEDF-(44–77) очищали с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ (Рисунок 7А) Выход целевого продукта (чистота >98%) составил 5,4 мг с 1 г влажных клеток (65 мг с 1 л культуры) (Таблица 2). Пик в масс-спектре PEDF-(44–77) наблюдали при m/z 4044,03 (Рисунок 7Б), что соответствует теоретически рассчитанной массе пептида (4044,6 Да).

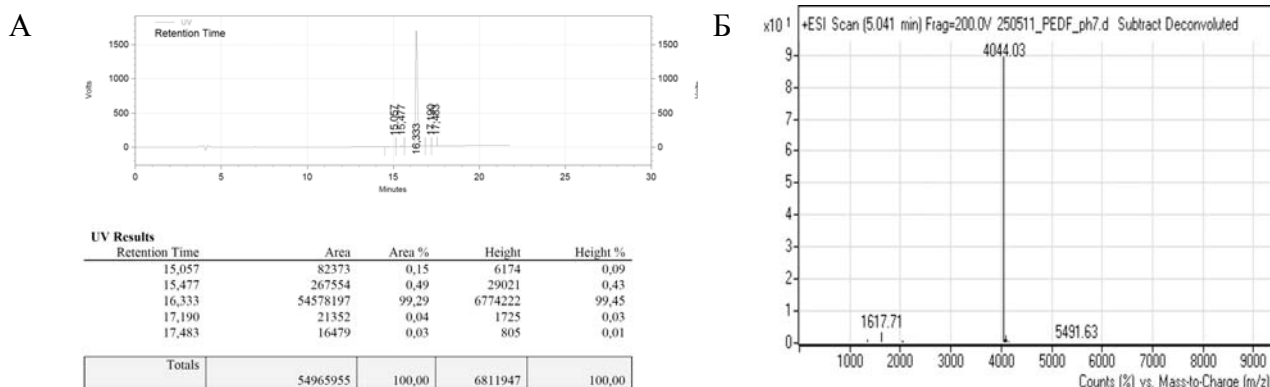


Рисунок 7. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ очищенного пептида PEDF-(44–77). А – хроматографический профиль пептида. ВЭЖХ на колонке с сорбентом Prosphere C-18 300 А 5 μ , градиент ацетонитрила (8 – 64 %) в 0,1 %TFA, скорость потока 0.75 мл/мин; Б – ESI-TOF масс-спектр PEDF-(44–77).

Таблица 2. Выделение и очистка рекомбинантного пептида PEDF (44–77) (из 1 л культуральной среды)

Этап очистки	Общий белок (мг)	Содержание ГБ (%)	Содержание PEDF(44–77) (%)
Осветлённый клеточный лизат	1900,0	43	
Экстракт ТВ	987,5	85	
Автокаталитическое расщепление ГБ	987,5		10,6
Ультрафильтрация	95,0		89,0
Концентрирование	76,0		89,0
ОФ ВЭЖХ	65,0		98,0

4. Получение рекомбинантного фрагмента эндостатина (1-49)

Эндостатин (20 кДа) – С-концевой фрагмент коллагена XVIII, ингибирующий миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток. Эндостатин предотвращает миграцию эндотелиальных клеток, действуя через интегрин $\alpha 5\beta 1$, и таким образом ингибирует ангиогенез отличным от тумстатина путём.

Участок, отвечающий за антиангиогенные свойства эндостатина, локализован в N-концевой части полипептида. В литературе описаны два биологически активных фрагмента эндостатина, обладающих наиболее выраженными антиангиогенными свойствами: фрагмент 1-27, активность которого определяется остатками His1 и His3, связывающими ион цинка, а также фрагмент 6-49, содержащий антиангиогенный кластер R27-G28-A29-D30-R47-A48. При разработке рекомбинантного аналога антиангиогенного фрагмента эндостатина мы объединили структуры двух этих пептидов в одной молекуле эндостатина (1-49), активность которой не была ранее исследована.

Создание штамма-продуцента ГБ SspDnaB-Endo

Синтез искусственного гена эндостатина (1-49) осуществляли химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов. Ген эндостатина (1-49) клонировали в экспрессионный вектор pTWIN1 аналогично гену PEDF. Получили экспрессионную плазмиду pTWIN-Endo, при экспрессии которой в клетках *E. coli* образуется гибридный белок SspDnaB-Endo (30,5 кДа), содержащий на N-конце модифицированный интеин SspDnaB, включающий хитин-связывающий домен, а на С-конце — фрагмент эндостатина (1 – 49):



Плазмидой pTWIN-Endo трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* ER2566. Полученный штамм-продуцент *E. coli* ER2566/pTWIN-Endo культивировали в среде YT×2 при 37°C, биосинтез гибридного белка индуцировали добавлением ИПТГ. Получали 5 г влажных клеток с 1 литра культуры. ГБ был получен в виде телец включения и не претерпевал автокаталитического расщепления *in vivo*. Уровень биосинтеза гибридного белка составил 37% от суммарного клеточного белка (Рисунок 8).

ГБ SspDnaB-Endo очищали и солюбилизировали по методике, описанной для ГБ SspDnaB-PEDF(44–77).

Оптимизация условий расщепления ГБ *SspDnaB-Endo*

При проведении расщепления ГБ *SspDnaB-Endo* в условиях, подобранных для белка *SspDnaB-PEDF(44–77)*, эффективность реакции не превышала 20% из-за агрегации гибридного белка. Мы установили, что наличие в реакционной смеси соли NaCl (концентрация не ниже 0,2 М) препятствует агрегации ГБ. Степень расщепления ГБ в оптимизированных условиях (при pH 6,5, в присутствии 0,2 М NaCl) достигала 80% (Рисунок 8).

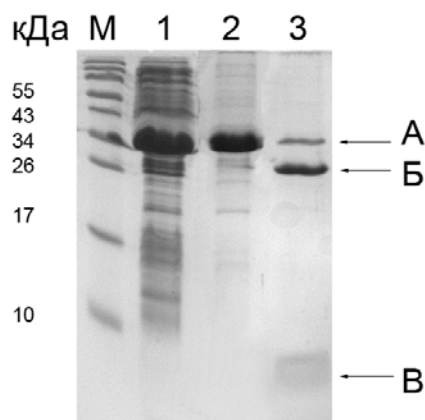


Рисунок 8. Биосинтез, очистка и расщепление гибридного белка *SspDnaB-Endo*. Электрофорез в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. **М** – стандарты молекулярных масс; **1** – тотальный клеточный лизат штамма-продуцента ER2566/pTWIN-Endo; **2** – экстракт телец включения; **3** – расщепление гибридного белка *SspDnaB-Endo*: pH 6,5, буфер с NaCl (0,2 М), время реакции 24 ч. **А** – гибридный белок *SspDnaB-Endo*, **Б** – лидерный полипептид (интеин *SspDnaB* и хитин-связывающий домен), **В** – пептид эндостатин (1-49).

Очистка пептида эндостатин (1-49)

Очистку эндостатина (1-49) от интеина проводили методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембраны VivaFlow 50 10 000 MWCO RC. Фильтрат концентрировали на мембране VivaFlow 50 5000 MWCO PES (полиэфирсульфон).

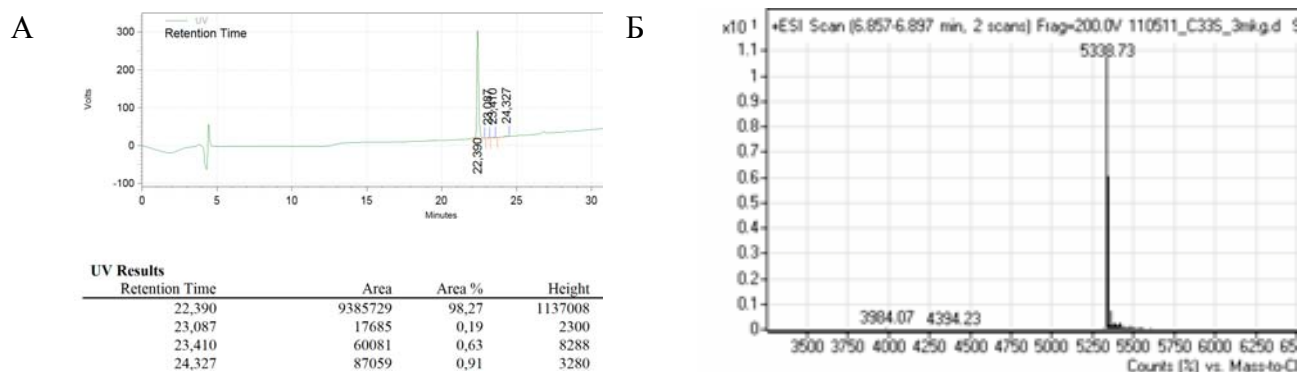


Рисунок 9. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ очищенного пептида эндостатин (1 – 49). **А** – хроматографический профиль пептида. ВЭЖХ на колонке с сорбентом Prosphere C-18 300 А 5μ, градиент ацетонитрила (8 – 64 %) в 0,1 %TFA, скорость потока 0.75 мл/мин; **Б** – ESI-TOF масс-спектр эндостатина (1 – 49).

Финальную очистку пептида осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ (Рисунок 9 А). Фракции, содержащие пептид чистотой более 98%, объединяли и высушивали. Выход целевого продукта составил 4,8 мг с 1 г влажных клеток (24 мг с 1 л культуры) (Таблица 3). Пик в масс-спектре эндостатина (1–49) наблюдали при m/z 5338,73 (Рисунок 9 Б), что соответствует теоретически рассчитанной массе пептида (5338,12 Да).

Таблица 3. Выделение и очистка рекомбинантного пептида эндостатин(1–49) (из 1 л культуральной среды)

Этап очистки	Общий белок (мг)	Содержание ГБ (%)	Содержание эндостатина(1–49) (%)
Осветлённый клеточный лизат	610	37	
Экстракт ТВ	311	86	
Автокаталитическое расщепление ГБ	311		14
Ультрафильтрация	41		85
Концентрирование	30		85
ОФ ВЭЖХ	24		98

С помощью разработанных методов были получены образцы субстанций рекомбинантных аналогов тумстатина (L69K-95) (200 мг), PEDF (44-77) (200 мг) и эндостатина (1-49) (30 мг). Препараты были исследованы на наличие остаточной ДНК штамма-продуцента, иммунореактивных белков *E. coli*, бактериальных эндотоксинов (Таблица 4).

Таблица 4. Характеристики субстанций рекомбинантных полипептидов тумстатин (L69K-95), PEDF (44-77) и эндостатин (1-49)

Показатель	Норма	Тумстатин (L69K-95)	PEDF (44-77)	Эндостатин(1-49)
Описание	Белый порошок	соответствует	соответствует	соответствует
Чистота (аналит. ОФ ВЭЖХ, детекция при $\lambda=210$ нм)	>98%	99%	99%	99%
Аномальная токсичность	Не токсичен	соответствует	соответствует	соответствует
Бактериальные эндотоксины	< 50 ЭЕ/мг	<0,03 ЭЕ/мг	<0,03 ЭЕ/мг	<0,03 ЭЕ/мг
Иммунореактивные белки <i>E. coli</i>	Не более 10 ppm	< 1 ppm	< 1 ppm	< 1 ppm
Остаточная ДНК штамма-продуцента	Не более 7 ppm	< 7ppm	< 7ppm	< 7ppm

Таким образом, полученные пептиды по чистоте и содержанию остаточных примесей штамма-производителя соответствуют требованиям к препаратам, подготовленным для биологических и предклинических испытаний.

5. Оценка биологической активности рекомбинантных антиангиогенных пептидов PEDF(44–77), эндостатина (1-49) и тумстатина (L69K-95) *in vitro*.

Исследования проводились совместно с сотрудниками лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для подтверждения антиангиогенной активности полученных пептидов был проведен стандартный комплекс тестов, позволяющий оценить биологическую активность пептидов на ранних этапах ангиогенеза (пролиферация эндотелиальных клеток и образование капилляроподобных структур). Антиангиогенные свойства пептидов PEDF(44–77), эндостатин (1-49) и тумстатин (L69K-95) были изучены в диапазоне концентраций от 20 нМ до 0,1 нМ. В работе использовали иммортализованную культуру эндотелиальных клеток (ЭК) мыши SVEC-4-10.

Цитотоксическое действие пептидов на эндотелиальные клетки.

Цитотоксичность препаратов исследовали с помощью стандартного МТТ-теста. МТТ-тест оценивает выживаемость клеток по их способности превращать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в нерастворимый формазан.

Для изучения цитотоксического действия препарата определяли выживаемость эндотелиальных клеток мыши SVEC4-10 после инкубации с пептидом в течение 48 часов.

Исследование показало, что эндостатин (1-49) в указанном диапазоне концентраций не обладает цитотоксическим действием. Фрагмент тумстатина оказывает слабый цитотоксический эффект: выживаемость ЭК при инкубации с фрагментом тумстатина составляет $90 \pm 1\%$ при максимальной концентрации пептида в лунке (20 нМ) и $101 \pm 4\%$ при минимальной концентрации (0,1 нМ). Выраженный цитотоксический эффект в указанном диапазоне концентраций наблюдался у фрагмента PEDF (44-77): выживаемость клеток была дозозависимой и составляла $84 \pm 3\%$ при концентрации пептида в лунке 20 нМ и $93 \pm 3\%$ - при концентрации 1-0,1 нМ.

Ингибирование пептидами пролиферации ЭК

Исследование ингибирования стимулированной основным фактором роста фибробластов пролиферации культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10 проводилось модифицированным митогенным тестом с использованием красителя Crystal Violet. Эндотелиальные клетки инкубировали с исследуемым пептидом в течение 6 дней и окрашива-

лись Crystal Violet. ИК₅₀ для фрагмента тумстатина составила 10 нМ. В эксперименте с фрагментом PEDF максимальное ингибирование пролиферации клеток наблюдалось при концентрации пептида 1 нМ (47% от контроля). При более высоких концентрациях пептида антипролиферативный эффект не был выражен.

Ингибирование образования трубчочко-подобных структур (ТПС)

Все три пептида ингибировали образование трубчочко-подобных структур (ТПС). Тумстатин (69-95) и эндостатин (1 – 49) в концентрациях 20 и 10 нМ ингибировали образование ТПС в течение 24 часов после инкубации с препаратом. Антиангиогенный эффект PEDF (44-77) в данном тесте проявлялся при более низких концентрациях - 1 и 10 нМ (Рисунок 10, Рисунок 11).

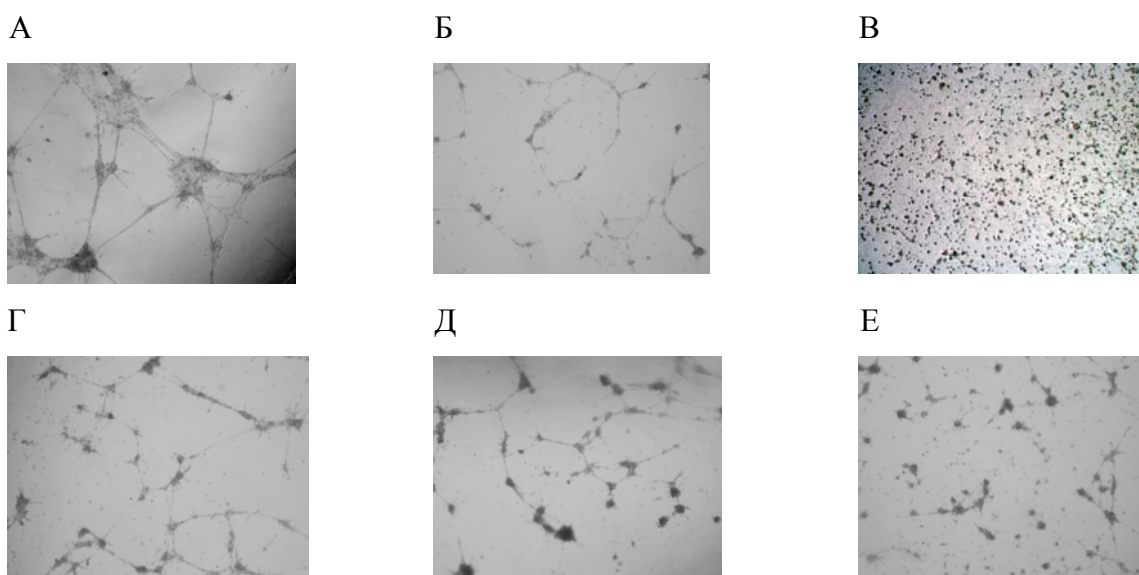


Рисунок 10. Микрофотографии трубчочко-подобных структур, образованных эндотелиальными клетками SVEC-4-10 при инкубации с пептидами тумстатин (L69K-95), эндостатин (1-49) и PEDF (44-77). А – контроль, 0,1% ЭТС; Б – тумстатин (L69K-95) в концентрации 10 нМ; В – тумстатин (L69K-95) в концентрации 20 нМ; Г- эндостатин (1-49) в концентрации 10 нМ; Д – PEDF (44-77) в концентрации 10 нМ; Е – PEDF (44-77) в концентрации 1 нМ.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым PEDF обладает антиангиогенными свойствами исключительно в низких концентрациях, в то время как высокие концентрации, напротив, стимулируют неоангиогенез, а средние дозы пептида не оказывают эффекта.

Таким образом, в исследованиях *in vitro* все три пептида продемонстрировали способность подавлять начальные этапы ангиогенеза. Были определены эффективные концентрации препаратов для дальнейших испытаний *in vivo*: 10 нМ для эндостатина (1-49) и тумстатина (69-95), 1 нМ для PEDF (44-77).

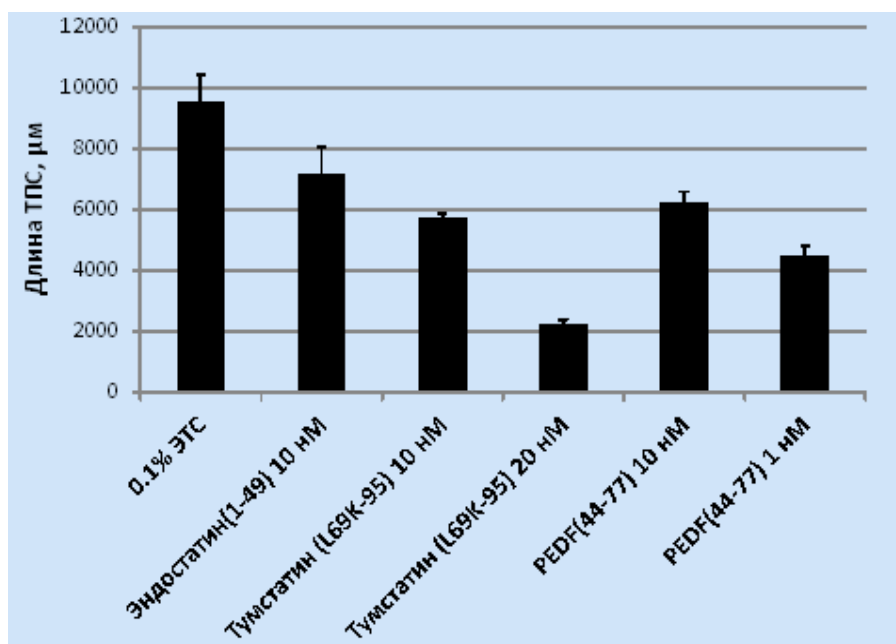


Рисунок 11. Ингибирование образования трубчико-подобных структур ЭК SVEC-4-10 в присутствии рекомбинантных антиангиогенных пептидов. ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка (контроль).

6. Биологическая активность рекомбинантных антиангиогенных пептидов *in vivo*.

Исследования проводились совместно с сотрудниками отделения офтальмологии ЦКБ РАН. В работе использовали две модели неоваскуляризации роговицы кролика для оценки антиангиогенной активности тестируемых пептидов на разных стадиях развития патологического процесса. С помощью первой модели анализировали способность препаратов предупреждать развитие патологической неоваскуляризации: пептиды вводили в глаза животных одновременно с индукцией ангиогенеза. Вторая модель позволяла выявить аваскулогенный эффект пептидов, т. е. их способность резорбировать вновь образованные сосуды, и оценить эффективность препаратов на более поздних стадиях развития заболевания. В этом эксперименте пептид вводили субконъюнктивально через 8 дней после индукции ангиогенеза, когда сосудистая сеть частично была сформирована.

6.1. Оценка антиангиогенной активности пептидов на модели неоваскуляризации роговицы кролика.

Антиангиогенную активность пептидов исследовали на модели неоваскуляризации роговицы кролика. Модель формировали на двух глазах 6 кроликов (12 глаз) путем прошивания роговицы с лимба викриловыми швами (8-0). Препараты вводили, начиная с первого дня эксперимента (день прошивания роговицы) ежедневно под конъюнктиву в следующих дозах: 7,2 нг PEDF (44-77); 70,2 нг тумстатина (69-95) и 95,4 нг эндостатина (1-

49). Дозу препарата рассчитывали с учётом оптимальной концентрации пептида для подавления неоангиогенеза, выявленной при исследованиях *in vitro* (1 нМ для PEDF (44-77) и 10 нМ для фрагментов эндостатина и тумстатина). Делали по 10 субконъюнктивальных инъекций в каждый опытный глаз.

Оценку клинической эффективности проводили с помощью биомикроскопии на щелевой лампе. Все 3 антиангиогенных пептида оказывали сопоставимый, клинически значимый антиангиогенный эффект, проявляющийся в том, что сосуды, несмотря на нанесенную травму и внесение индуктора ангиогенеза (шовный материал), в роговицу не вросли. Помимо антиангиогенной активности пептиды оказывали противоотечный эффект. Наиболее выраженными противоотечными свойствами обладал фрагмент PEDF: площадь отека роговицы в соответствующем опытном глазу не превышала 10%, в то время как аналогичный показатель для фрагмента тумстатина составил 42%, а эндостатина – 82% (Рисунок 12).

6.2. Оценка аваскулогенной активности пептидов на модели щелочного ожога роговицы.

В качестве второй модели ангиогенеза использовали химический ожог роговицы на глазах 8 экспериментальных животных (половозрелые кролики породы Шиншилла, самцы, весом 3-3,5 кг). В качестве контроля служили глаза животных без введения препаратов (2 глаза, кролики № 1 и № 8). Антиангиогенные пептиды начинали вводить в опытные глаза кроликам № 2, 4 и 6 с 8 дня под конъюнктиву в дозах 95,4 нг для эндостатина (1-49), 70,2 нг для тумстатина Т8 и 7,2 нг для PEDF (24 – 57) соответственно. Инъекции препаратов делались ежедневно. Делали по 10 инъекций в каждый опытный глаз. Кроликам № 3, 5 и 7 дозы вводимых препаратов увеличивали в 10 раз. Оценку клинической эффективности тестируемых препаратов проводили с помощью биомикроскопии на щелевой лампе.

Мониторинг опытных глаз, в которые вводились антиангиогенные пептиды, показал, что аваскулогенный эффект присутствует только у фрагмента тумстатина. Аваскулогенный эффект был дозозависимым: он был выше на глазах с более высокой (10-кратной) дозой фрагмента тумстатина (Рисунок 13).

Недавние исследования показали, что полноразмерный тумстатин подавляет неоваскуляризацию роговицы при введении через 12 часов после стимуляции ангиогенеза. Однако способность тумстатина или его фрагментов резорбировать уже сформированные сосуды не была доказана. На модели ожога роговицы кролика мы продемонстрировали клинически значимый дозозависимый аваскулогенный эффект рекомбинантного фрагмента тумстатина (L69K-95). Теоретически можно предполагать, что взаимодействие данного пептида с интегринами на поверхности эндотелиальных клеток может приводить к нарушению контактов этих клеток с базальной мембраной и вызывать апоптоз эндотелиальных клеток.

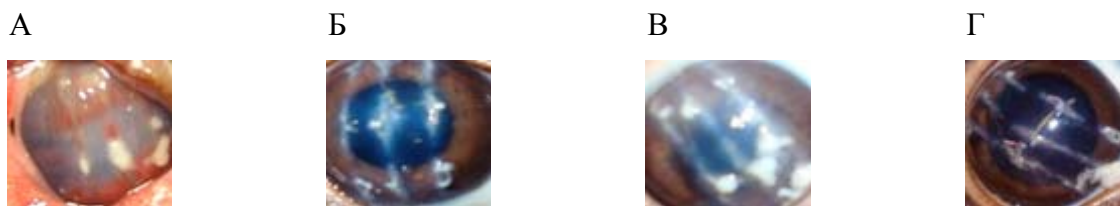


Рисунок 12. Неоваскуляризация роговицы кролика, день 7. А – контрольный глаз; Б – глаз после 7 инъекций тумстатина (L69K-95); В – глаз после 7 инъекций эндостатина (1-49); Г – глаз после 7 инъекций PEDF(44-77).



Рисунок 13. Аваскулогенная активность фрагмента тумстатина Т8. Модель щелочного ожога роговицы кролика. А – фотография глаза кролика № 3 до лечения. 8-е сутки после ожоговой травмы. Формируется сосудистая сеть; Б – фотография глаза кролика № 3 после 5 инъекций тумстатина (10-кратная доза); В – фотография глаза кролика № 3 после 10 инъекций тумстатина (10-кратная доза). Стрелками обозначены участки наиболее выраженной регрессии сосудов.

Выводы:

1. Получены рекомбинантные аналоги функциональных фрагментов природных ингибиторов ангиогенеза, подавляющие различные этапы неоангиогенеза.

2. Получены высокоэффективные штаммы-продуценты, обеспечивающие суперэкспрессию (свыше 35% от суммарного белка клетки) гибридных белков, содержащих в своём составе фрагменты тумстатина, PEDF и эндостатина.

4. Разработаны эффективные схемы выделения и очистки рекомбинантных аналогов фрагментов тумстатина (L69K-95), PEDF (44-77), эндостатина (1-49). Получены целевые полипептиды чистотой более 99% для биологических испытаний. Применение интеиновой системы для биотехнологического синтеза PEDF (44-77) и эндостатина (1-49) позволило исключить стадии хроматографической очистки и энзиматического расщепления гибридного белка.

5. Продемонстрирована антиангиогенная активность фрагмента тумстатина (L69K-95), фрагмента PEDF (44-77) и фрагмента эндостатина (1-49) на разных этапах развития ангиогенеза на моделях *in vitro*: PEDF (44-77) оказывал цитостатический и антипролиферативный эффект на эндотелиальные клетки, тумстатин (L69K-95) подавлял пролиферацию, все три пептида ингибировали образование трубочко-подобных структур в пределах изученных концентраций (0,1 – 20 нМ).

6. Продемонстрирована *in vivo* эффективность аналогов тумстатина (L69K-95), PEDF (44-77) и эндостатина (1-49) в терапии заболеваний глаз, сопровождающихся ангиогенезом (на экспериментальной модели неоваскуляризации роговицы). При одновременном введении с индукторами ангиогенеза каждый из пептидов блокировал вращание сосудов (ранние этапы ангиогенеза). Рекомбинантный аналог тумстатина (L69K-95) продемонстрировал способность резорбировать новообразованные сосуды (поздние этапы ангиогенеза).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в научных журналах:

1. Мирошников А.И., Лихванцева В.Г., Степанова Е.В., Арутюнян Е.В., Есипов Р.С., Бейрахова К.А., Степаненко В.Н., Белоус О.В. Изучение *in vitro* антиангиогенной активности природных ингибиторов ангиогенеза: эндостатина, тумстатина и PEDF // Офтальмохирургия. 2011. № 1. С. 76-81.

2. Лихванцева В.Г., Кузьмин К.А., Арутюнян Е.В., Салихов А.Ю., Андреев Ю.В., Белоус О.В., Мирошников А.И., Есипов Р.С., Бейрахова К.А., Степаненко В.Н. Антиангиогенные эффекты природных ингибиторов ангиогенеза тумстатина, эндостатина и PEDF на экспериментальной модели васкуляризации роговицы по результатам морфологических исследований // Офтальмохирургия. 2011. № 4. С. 65-69.

3. Есипов Р.С., Бейрахова К. А., Чупова Л. А., Лихванцева В. Г., Степанова Е. В., Мирошников А.И. Рекомбинантный фрагмент 44–77 фактора дифференцировки пигментного эпителия препятствует развитию патологической неоваскуляризации роговицы // Биоорганическая химия. 2012. Т.38. № 1. С. 78-85.

Опубликованные материалы российских и международных научных конференций:

1. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Костромина, Бейрахова К.А., Мирошников А.И. Перспективы использования в биотехнологическом производстве гибридных саморасщепляющихся белков для получения рекомбинантных полипептидов // Тезисы докладов и стендовых сообщений на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск. 2008. С. 358.

2. Бейрахова К.А., Чупова Л.А., Лихванцева В.Г., Степанова Е.В., Есипов Р.С. Рекомбинантный фрагмент фактора дифференцировки пигментного эпителия (44-77) препятствует развитию патологической неоваскуляризации роговицы // Материалы V Российского симпозиума "Белки и пептиды". Петрозаводск. 2011. С. 8.

3. Бейрахова К.А., Лихванцева В.Г., Степанова Е.В., Есипов Р.С. Биотехнологический синтез тумстатина (69-95) и эндостатина (1-49), потенциальных препаратов для комплексной антиангиогенной терапии // Материалы научно-практической конференции

"Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения". Новый Свет, Украина. 2011.С. 26.

Публикации, находящиеся в печати:

Esipov R.S., Beyrakhova K.A., Likhvantseva V.G., Stepanova E.V., Stepanenko V.N., Kostromina M.A., Abramchik Yu.A., Miroshnikov A.I. Antiangiogenic and antivasular effects of a recombinant tumstatin-derived peptide in a corneal neovascularization model // Biochimie. 2012. V. 29. doi: 10.1016/j.biochi.2012.03.007 [в печати].
