

Е.С.Калинина
аспирант,
Н.В.Позднякова*
научный сотрудник,
Д.А.Корженевский*
научный сотрудник,
Н.Б.Фельдман*
научный сотрудник,
С.В.Луценко*
зав. лабораторией,
В.И. Швец
академик РАМН
кафедра Биотехнологии
МИТХТ им. М.В. Ломоносова
*Московский НИИ медицинской экологии

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭНДОСТАТИНА

УДК 575.116.12

Разработана оригинальная методика выделения рекомбинантного эндостатина человека из культуры клеток штамма-продуцента *E. coli*. Получена липосомная форма эндостатина и исследована ее цитотоксическая активность *in vitro* и противоопухолевая активность *in vivo*

Введение

Более четверти века назад было постулировано, что рост раковых образований возможен только при условии возникновения в самой опухоли сети кровеносных сосудов [1]. На основе этого предположения возникло направление борьбы со злокачественным ростом, основанное на применении препаратов, способных специфически подавлять ангиогенез опухоли, и, как следствие, ее рост. Поиск таких антиангиогенных веществ привел к открытию в 1994 году первого эндогенного ингибитора ангиогенеза, названного ангиостатином [2]. Вскоре были выделены эндостатин [3], фрагменты 1 и 2 протромбина [4], расщепленный антитромбин III [5], фрагменты фибрина/фибриногена [6] и многие другие фрагменты физиологических полипептидов, также способные ингибировать ангиогенез.

Эндостатин, впервые выделенный из супернатанта клеточной линии гемангиоэндотелиомы мышей, представляет собой С-концевой фрагмент

коллагена XVIII с молекулярной массой 20 kDa.. Эндостатин был клонирован и экспрессирован как в прокариотической системе *E. coli*, так и в эукариотической дрожжевой системе [3, 7]. Исследования на животных показали, что рекомбинантный эндостатин способен подавлять рост различных мышечных и трансплантированных мышам человеческих опухолей [8,9]. Однако получение рекомбинантного эндостатина в растворимой форме, пригодной для использования в клинической практике, представляет собой трудно разрешимую проблему. Целью настоящей работы являлась разработка протокола выделения растворимой формы эндостатина из биомассы продуцента *Escherichia coli*, а также получение липосомной формы данного белка и исследование ее биологической активности.

Материалы и методы

Получение телец включения из биомассы штамма-продуцента *E. coli*. Осадок клеток продуцента был получен центрифугированием культуры при 2500 g и 4°C в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в буфере для обработки ультразвуком [0,1 М Tris-HCl, pH 8.0], затем прибавляли лизоцим до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Суспензию подвергали обработке

ультразвуком в присутствии 0,1% натрия деоксихолата, затем центрифугировали при 10 g в течение 10 мин. Процедуру обработки препарата ультразвуком повторяли еще дважды. Полученные в результате тельца включения хранились при -20°C и использовались для дальнейших манипуляций.

Солюбилизация телец включения и ренатурация эндостатина. Осадок телец включения растворяли в буфере [0,1 М Tris -HCl, pH 8.0, 6 М мочевины] и инкубировали 30 мин при 4°C, после чего центрифугировали при 13 400 g и 7°C в течение 15 мин. Супернатант разводили в буфере [0,1 М Tris-HCl, pH 8.0, 6 М мочевины, 1% D-маннитол] до концентрации эндостатина около 0,02 мг/мл и диализовали против 200 объемов буфера [0,1 М Tris-HCl, pH 8.0, 1 М мочевины, 1% D-маннитол, 1 mM GSSG, 5 mM GSH] в течение суток. Центрифугировали диализат при 13 400 g и 7°C в течение 15 мин. Супернатант диализовали против 200 объемов буфера [0,1 М Tris-HCl, pH 8.0] в течение суток. Центрифугировали диализат при 13 400 g и 7°C в течение 15 мин. Супернатант анализировали при помощи SDS-PAGE с использованием стандартного протокола [10]. Определение содержания свободных SH- групп проводили по методу Элмана с использованием стандартного протокола [10].

Получение липосомной формы эндостатина осуществляли с использованием стандартного протокола [11].

Исследование цитотоксической активности (ЦТА) эндостатина in vitro проводили, определяя выживаемость клеток после их инкубации с исследуемым препаратом в течение 72 ч с помощью МТТ-теста по методике [12].

Исследование противоопухолевой активности эндостатина и его липосомной формы проводили на мышах линии C57BL/6 с привитыми опухолями мышинной меланомы B16. Опухолевые клетки трансплантировали подкожно в область спины животных (2×10^5 клеток в 0,1 мл физиологического раствора). Препараты эндостатина вводили животным начиная с 10-го дня после прививки опухоли. Терапию осуществляли в течение двух

недель, вводя препараты через день в дозе 90 мг/кг веса животного. Размер солидных опухолей измеряли один раз в 2-3 дня. Объем опухоли вычисляли по формуле

$$V = a^2 \cdot b \cdot \frac{\pi}{6}, \text{ где } a - \text{короткий, } b - \text{длинный}$$

диаметр опухоли. Торможение роста опухолей (ТРО) определяли по формуле:

$$TPO = \left(1 - \frac{P_{on}}{P_k}\right) \cdot 100\%, \text{ где } P_{on} - \text{средний}$$

размер опухолей в опытной группе, P_k – средний размер опухолей у контрольных животных. Увеличение средней продолжительности жизни (УСПЖ) леченых животных относительно контрольных определяли по формуле:

$$УСПЖ = \left(\frac{T}{C} - 1\right) \cdot 100\%, \text{ где } T - \text{средняя}$$

продолжительность жизни (СПЖ) леченых животных, дни, C – СПЖ контрольных животных, дни.

Результаты и их обсуждение

Согласно протоколу, представленному в данной работе, выход растворимого рекомбинантного эндостатина составил около 15 мг из 1 л культуры. Конечный диализат не содержал видимых частиц и стабильно хранился при 4°C, не меняя своих свойств после замораживания при -20°C или лиофильного высушивания. Преципитат агрегированного белка не образовывался при удалении редокс-пары глутатиона в ходе эксперимента, что также говорит о стабильности полученного препарата эндостатина. Препарат проверяли на наличие высокомолекулярных агрегатов с помощью сравнительного SDS-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (в присутствии и без β-меркаптоэтанола) (рис. 1). Генетическая конструкция, использованная в данной работе, позволяет достичь высокого уровня экспрессии эндостатина. Однако, как и многие другие рекомбинантные белки, эндостатин в прокариотической системе *E. coli* синтезируется в виде агрегатов, которые формируют тельца включения. Правильно свернутый эндостатин имеет компактную глобулярную структуру, стабилизированную двумя дисульфидными связями [13].

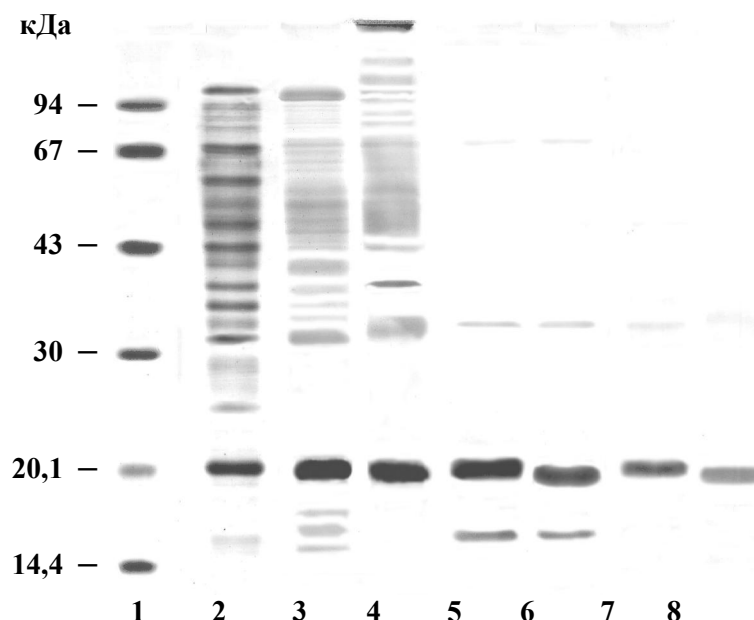


Рис. 1. Электрофорез препаратов эндостатина на различных стадиях выделения. 1 – стандарты молекулярной массы; 2 – биомасса штамма-продуцента; 3, 4 – препарат телец включения; 5, 6 – препарат эндостатина после стадии ренатурации; 7, 8 – конечный препарат эндостатина. Дорожки 2, 3, 5, 7 – в присутствии β-меркаптоэтанола; 4, 6, 8 – в отсутствии β-меркаптоэтанола

Анализ по методу Элмана показал, что в тельцах включения после их солюбилизации содержится 98% свободных SH-групп, в то время как свободные SH-группы в конечном диализате практически отсутствуют. Эти результаты, а также стабильность полученного раствора эндостатина, позволяют сделать вывод о правильной ренатурации белка в условиях используемого протокола. Чистота полученного препарата эндостатина составляла > 98% по данным электрофореза (рис. 1, дорожка 8). Стабильность препарата позволяет использовать его для дальнейших лабораторных исследований, а также дает

возможность получения препарата растворимого эндостатина в больших количествах.

Исследование специфической биологической активности эндостатина *in vitro* проводили на культурах эндотелиальных клеток аорты быка АВАЕ, эндотелиальных клеток лимфатических сосудов мыши SVEC4-10, а также на первичной культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Результаты исследования приведены на рис. 2. Как видно на рис. 2, эндостатин оказывал дозозависимое цитотоксическое действие на все три типа исследованных эндотелиальных клеток.

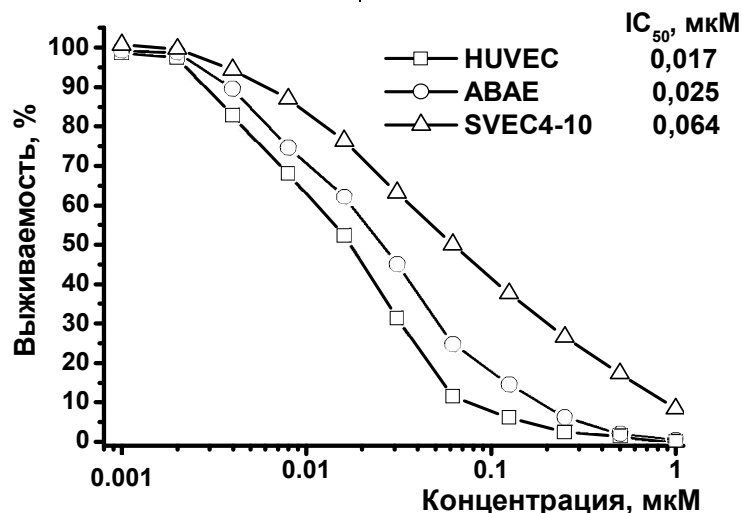


Рис. 2. ЦТЭ эндостатина в отношении эндотелиальных клеток линий HUVEC, АВАЕ и SVEC4-10.

При этом наибольший цитотоксический эффект достигался в отношении линии эндотелиоцитов пупочной вены человека HUVEC ($IC_{50} = 0,017$ мкМ). Очень близкую ЦТА эндостатин проявлял в отношении клеточной линии АВАЕ ($IC_{50} = 0,025$ мкМ). Таким образом, полученный белок проявляет выраженную антиангиогенную активность в отношении различных линий эндотелиальных клеток, что характеризует его в качестве эффективного антиангиогенного агента.

Для получения липосомной формы эндостатина применяли метод экструзии. Липосомы получали ультразвуковой обработкой дисперсии оволецитин-холестерин-белок с последующим многократным продавливанием через ядерный поликарбонатный фильтр. Размер полученных липосом был строго фиксированным и составлял 100 нм. Поскольку капилляры, образовавшиеся в результате опухолевого неоангиогенеза, характеризуются наличием в слое эндотелия большого количества пор размером до 800 нм, липосомы при циркуляции в кровотоке будут проникать преимущественно в солидные опухоли [14], обеспечивая направленный транспорт антиангиогенного препарата. Липосомный и гомогенный эндостатин вводили парентерально мышам с опухолями меланомы В16 один раз в неделю, при том, что курсовая противоопухолевая терапия эндостатином в обоих случаях

предполагает значительно более частые инъекции препаратов: каждые 12 или 24 часа в течение ряда недель [15,16]. Однако применение липосомных форм полипептидных препаратов позволяет значительно увеличить время их полужизни в организме и повысить терапевтическую эффективность. В нашем исследовании это подтверждается значительно большим ТРО у мышей, получавших липосомную форму эндостатина (68,6%, данные на 35 день после прививки опухоли) по сравнению с мышами, которым вводили водный раствор белка (41,0%). Терапия липосомной формой эндостатина также приводила к двукратному УСПЖ по сравнению с терапией нелипосомным препаратом (24,6% vs. 47,3%).

Исследование противоопухолевого эффекта липосомного эндостатина при его комбинированном применении с доксорубицином показало, что введение препарата в режиме сочетанной терапии с доксорубицином приводило к значительному подавлению роста опухолей (на 72,6%) и увеличению продолжительности жизни животных на 55,2%. При этом значения ТРО и УСПЖ превышали таковые от монотерапии липосомным эндостатином. Таким образом, введение в терапевтическую схему доксорубицина позволяет существенно повысить эффективность терапии липосомным эндостатином.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971, 285, 1182-1186.
2. O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y. et al. *Cell* 1994, 79, 315-328.
3. O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y. et al. *Cell* 1997, 88, 277-285.
4. Rhim T.Y., Park C.S., Kim E., Kim S.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 252, 513-516.
5. O'Reilly M.S., Pirie-Shepherd S., Lane W.S., Folkman J. *Science* 1999, 285, 1926-1928.
6. Broun N.J., Staton C.A., Rodgers G.R. et al. *Br. J. Cancer* 2002, 86, 1813-1816.
7. Dhanabal M., Ramchandran R., Volk R. et al. *Cancer Res.* 1999, 59, 189-197.
8. Sim B.K.L. *Angiogenesis* 1998, 2, 37-48.
9. Boehm T., Folkman J., Browder T., O'Reilly M.S. *Nature (Lond.)* 1997, 390, 404-407.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., and Manniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
11. MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.P. et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991, 1061(2), 297-303.
12. Mosmann T. *J. Immunol. Meth.* 1983, 65 (1-2), 55-63.
13. Hohenester E., Sasaki T., Olsen B.R. and Timpl R. *EMBO J.* 1998, 17, 1656-1664.
14. Allen T.M., Cullis P.R. *Science* 2004, 303, 1818-1822.
15. Scappaticci F. A. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20, 3906.
16. Cao Y., Xue L. *Semin. Thromb. Hemostas.* 2004, 30(1), 83.