

*На правах рукописи*



НЕМУДРАЯ АННА АНДРЕЕВНА

**ОПУХОЛЬ-АДРЕСУЮЩИЕ ПЕПТИДЫ КАК СРЕДСТВО ПОВЫШЕНИЯ  
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ RL2**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научные руководители:

к.б.н. **Рихтер Владимир Александрович**

к.б.н. **Кулигина Елена Владимировна**

Официальные оппоненты:

д.б.н., доцент **Карпенко Лариса Ивановна**

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, зав. лабораторией

к.б.н., профессор **Попова Нэлли Александровна**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», с.н.с.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита состоится «23» декабря 2016 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
к.х.н., доцент



Коваль В.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В последние годы применение неспецифических цитостатических и цитотоксических средств существенно расширило возможности и повысило эффективность лечения рака. Однако, такой важный показатель эффективности терапии, как продолжительность жизни пациентов, увеличивается незначительно, и главной причиной последующей смертности остается метастатический рост опухолей. Кроме того, высокая общая токсичность большинства используемых химиопрепаратов значительно ограничивает возможности их применения.

При разработке современных противораковых лекарственных средств используют два подхода: избирательное воздействие на клеточные процессы и пути, отличающиеся у раковых и нормальных клеток, и адресную доставку цитотоксических средств в опухоль. Адресная доставка позволяет снизить дозу препарата, необходимую для получения терапевтического эффекта, и минимизировать побочные эффекты от его применения. Разработка средств таргетной терапии возможна благодаря множественным генетическим и эпигенетическим изменениям, происходящим при онкотрансформации и приводящим к изменениям протеомного профиля раковой клетки (Barollo et al., 2016, Inoue et al., 2016). Изменения типа, числа и расположения рецепторов приводит к образованию уникального топографического профиля поверхности клеток. Этот поверхностный профиль может являться молекулярным адресом для доставки биомолекул с помощью адресующих лигандов, в качестве которых могут выступать короткие опухоль-адресующие пептиды (Brown, 2010).

Нарушение регуляции такого ключевого процесса жизнедеятельности клетки, как апоптоз, является одной из причин развития в организме злокачественных новообразований. Поэтому в настоящее время индукторы и модуляторы апоптоза раковых клеток рассматривают в качестве потенциальных онкотерапевтических средств (Millimouno et al., 2014). Рекомбинантный аналог лактапина RL2 является индуктором апоптоза раковых клеток мыши и человека *in vitro*, а также вызывает торможение роста и метастазирования опухолей животных и человека *in vivo*. Механизм действия RL2, приводящий к гибели клеток, достаточно подробно изучен на клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7. В процессе гибели клеток наблюдается транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны клеток, диссипация трансмембранного потенциала митохондрий и активация инициаторных каспаз-8 и -9 и эффекторных каспаз-3 и -7. RL2 проникает в цитоплазму клеток и взаимодействует с белками цитоскелета  $\alpha$ ,  $\beta$ -тубулином и  $\alpha$ -актинином. Также показано, что RL2 индуцирует LC3-процессинг, который характерен для аутофагии (Koval et al., 2012, Koval et al., 2014).

В настоящее время успешно закончены доклинические испытания лекарственного средства «Лактаптин», созданного на основе RL2. Показана безопасность и противоопухолевая эффективность препарата. Однако «Лактаптин», как и другие белковые терапевтические препараты, равномерно распределяется по органам и тканям организма, что уменьшает его концентрацию

в опухоли и, соответственно, снижает эффективность противоопухолевого действия (Бондаренко и др., 2015). Для более полной реализации противоопухолевого потенциала «Лактапина» необходима разработка способов направленной доставки лекарственного средства в опухолевую ткань.

**Целью настоящей работы** являлось повышение противоопухолевой эффективности проапоптотического белка RL2 путем создания рекомбинантных слитых белков, состоящих из RL2 и опухоль-адресующих пептидов.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести отбор опухоль-адресующих пептидов в системе *in vitro* на культурах раковых клеток мыши и человека и *in vivo* на опухолевых моделях;
2. Сконструировать рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие синтез слитых белков, состоящих из RL2 и опухоль-адресующего пептида, в клетках штаммов-продуцентов *E.coli*. Провести выделение и очистку целевых рекомбинантных белков;
3. Исследовать цитотоксическую активность рекомбинантных слитых белков на культурах раковых клеток мыши и человека;
4. Исследовать тропность к опухолевой ткани и противоопухолевую активность рекомбинантных слитых белков.

**Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.**

В результате проведения скрининга фаговой пептидной библиотеки на культурах раковых клеток мыши и человека и на мышинных опухолевых моделях были получены последовательности пептидов, обеспечивающих специфическое накопление фаговых частиц в опухолевой ткани гепатокарциномы мыши ГА-1 (пептиды T1 и T2) и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (пептид T3) *in vivo*.

Впервые на основе последовательностей опухоль-адресующих пептидов и проапоптотического белка RL2 были созданы генетические конструкции, обеспечивающие синтез рекомбинантных слитых белков T1-RL2, T2-RL2, T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His в клетках штаммов-продуцентов *E.coli*.

Показано, что цитотоксическая активность слитых белков T1-RL2 и T2-RL2 по отношению к клеткам ГА-1 незначительно отличается от цитотоксической активности RL2, при этом тропность T1-RL2 и T2-RL2 к опухолевой ткани ГА-1 превышает тропность RL2 к этой опухоли.

Показано, что цитотоксическая активность белков T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His в отношении клеток MDA-MB-231 превышает цитотоксическую активность RL2. В экспериментах по изучению противоопухолевой активности белков T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His на опухоли MDA-MB-231 в модели ксенографтов наибольший противоопухолевый эффект продемонстрировал белок T3-RL2, индекс ТРО (торможение роста опухоли) которого составил 80% против 37% для RL2.

Таким образом, получены последовательности опухоль-адресующих пептидов, которые могут быть использованы в качестве адресующих агентов при создании средств доставки лекарственных препаратов в опухолевую ткань или средств визуализации злокачественных новообразований. Показана возможность

увеличения противоопухолевой активности препарата белковой природы при присоединении к нему короткого опухоль-адресующего пептида.

Полученные результаты являются основанием для дальнейших исследований по созданию эффективных противоопухолевых средств на основе аналогов RL2.

**Положения, выносимые на защиту.**

1) Пептиды, отобранные из фаговой пептидной библиотеки, обеспечивают накопление фаговых частиц в опухолевой ткани гепатокарциномы мыши ГА-1 (Т1 и Т2) и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (Т3);

2) Присоединение коротких опухоль-адресующих пептидов к N-концу или С-концу RL2 не снижает цитотоксическую активность препарата;

3) Присоединение опухоль-адресующих пептидов Т1 и Т2 к RL2 увеличивает тропность препарата к опухолевой ткани ГА-1;

4) Присоединение опухоль-адресующего пептида Т3 к RL2 значительно увеличивает терапевтическую эффективность препарата.

**Публикации и апробация результатов.** По результатам диссертации опубликовано 5 работ в рецензируемых журналах, получен патент РФ и подано две заявки на изобретение. Результаты работы представлены и обсуждены на следующих конференциях: международной конференции FEBS CONGRESS 2013 (Санкт-Петербург, 2013), международной конференции FEBS EMBO 2014 (Париж, Франция, 2014), 18-й международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2014), 53-й международной научной студенческой конференции МНСК-2015 (Новосибирск, 2015), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), медико-биологическом форуме «Биомедицина–2016» (Новосибирск, 2016), международной конференции «Химическая биология-2016» (Новосибирск, 2016).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 123 страницах, включает 24 рисунка, 12 таблиц и 5 приложений. Список литературы содержит 212 источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Одним из способов получения опухоль-адресующих пептидов является скрининг фаговых пептидных библиотек, который проводят в условиях *in vitro* на изолированных белках или клеточных культурах и в условиях *in vivo* на животных опухолевых моделях. Поскольку обе стратегии скрининга имеют свои преимущества и успешно применяются для отбора специфических пептидов, в рамках данной работы мы реализовали оба подхода.

В качестве объектов для скрининга фаговой пептидной библиотеки мы выбрали те онкотрансформированные клеточные культуры и опухолевые модели, которые по результатам ранее проведенных исследований показали наибольшую чувствительность к действию RL2 (Koval et al., 2012, Koval et al., 2014). Для экспериментов *in vitro* были выбраны клетки гепатомы мыши ГА-1 и клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231. Для экспериментов *in vivo* — мышьяная опухолевая модель ГА-1 и опухоль MDA-MB-231 в модели-ксенографтов.

### **1. Скрининг фаговой пептидной библиотеки *in vitro* на раковых клетках мыши ГА-1**

Отбор специфических к опухоли пептидов в системе *in vitro* проводили на раковых клетках ГА-1, используя библиотеку, «обедненную» на первичной культуре фибробластов мыши линии C57Bl/6. Было проведено три раунда биопэннинга, после чего были определены и проанализированы последовательности 53 отобранных экспонированных пептидов.

Исследуемая выборка отобранных пептидов, экспонированных бактериофагами, оказалась достаточно разнообразной без явного преобладания какого-либо пептида. Бактериофаги, экспонирующие пептиды SGVYKVAYDWQH (1.1), GLHTSATNLYLH (1.2), QWNWPVRSVANV (1.3) и GDGNSVLKPGNW (1.4), встретились более одного раза и частоты их встречаемости составили 18,9%, 9,4%, 5,7% и 3,8%, соответственно.

### **2. Скрининг фаговой пептидной библиотеки *in vivo* на мышях с трансплантированной опухолью ГА-1**

Было проведено 4 раунда скрининга *in vivo* на мышях линии A/Sn с подкожно трансплантированной опухолью ГА-1. После третьего и четвертого раундов скрининга были определены и проанализированы 37 и 38 отобранных экспонированных пептидов, соответственно.

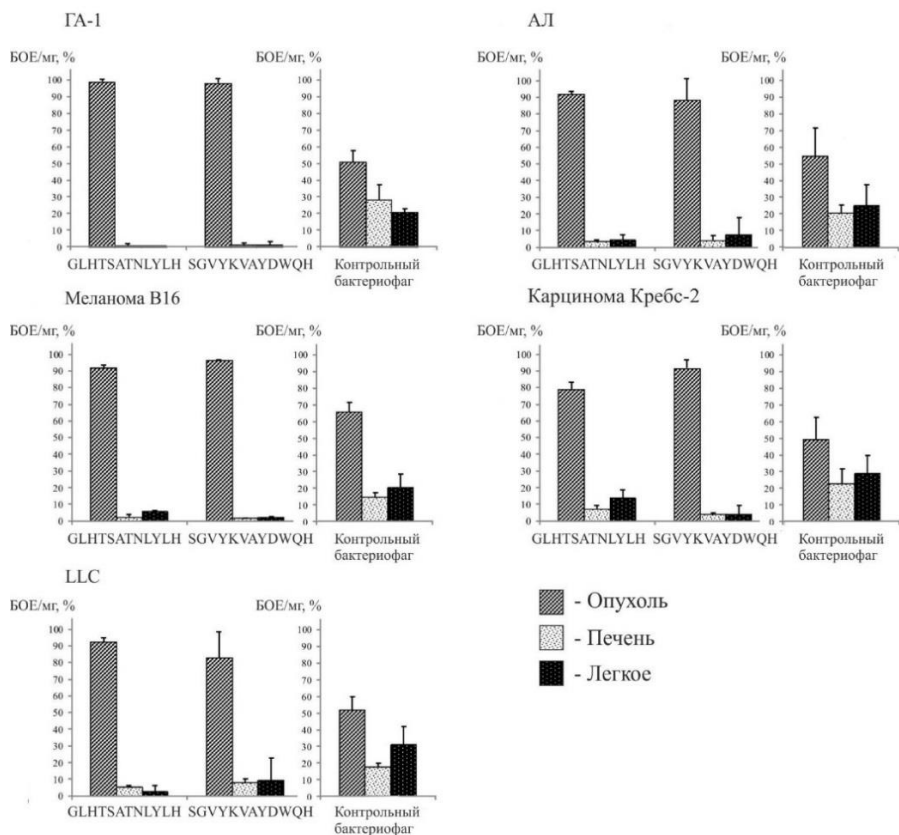
После третьего раунда скрининга *in vivo* на опухоли ГА-1 наибольшими частотами встречаемости обладали бактериофаги, экспонирующие пептиды GLHTSATNLYLH (2.1) и SGVYKVAYDWQH (2.2). Частота встречаемости бактериофага, экспонирующего пептид 2.1, составила 35,1%, а пептид 2.2 — 21,6%. Последовательности пептидов 2.1 и 2.2 совпали с последовательностями экспонированных пептидов 1.1 и 1.2, отобранных *in vitro* на раковых клетках ГА-1. После четвертого раунда скрининга *in vivo* частота встречаемости пептида 2.1 увеличилась до 63,2%, частота встречаемости пептида 2.2 не изменилась.

Поскольку экспонированные бактериофагами пептиды GLHTSATNLYLH и SGVYKVAYDWQH были отобраны после проведения двух

независимых скринингов, *in vitro* на асцитных клетках ГА-1 и *in vivo* на опухоли ГА-1, мы выбрали их для дальнейших экспериментов.

### 3. Специфическое накопление бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды, в опухолях мыши *in vivo*

Мы изучили способность бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды GLHTSATNLYLH и SGVYKVAYDWQH, специфически накапливаться как в опухоли ГА-1, на которой проводили скрининг фаговой пептидной библиотеки, так и в других типах мышиных опухолей: аденокарциноме легкого (АЛ), меланоме В16, карциноме Кребс-2, карциноме легких Льюис (LLC), карциноме Эрлиха и гепатоаденокарциноме-29 (ГА-29) (Рис. 1).



**Рис. 1.** Накопление бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды GLHTSATNLYLH и SGVYKVAYDWQH, и контрольного бактериофага, не экспонирующего пептид, в различных типах опухолей мыши по сравнению с контрольными органами (печень, легкое). Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение.

Наработанные индивидуальные фаговые клоны, экспонирующие отобранные пептиды, вводили мышам с трансплантированной опухолью в хвостовую вену. Через 24 часа после введения фаговых клонов опухоль и контрольные органы (легкое и печень) исследовали на содержание бактериофагов (БОЕ/мг ткани) путем титрования на культуре клеток *E. coli* ER2738.

Было показано, что бактериофаги, экспонирующие отобранные пептиды GLHTSATNLYLH и SGVYKVAYDWQH, специфически накапливаются в опухолевых тканях ГА-1, АЛ, меланомы В-16, карциномы Кребс-2 и LLC. Как и ожидалось, наибольшее накопление бактериофагов выявлено в опухоли ГА-1. Через 24 часа после внутривенного введения накопление в опухоли контрольного бактериофага без экспонированного пептида незначительно (всего в два-три раза выше, чем в печени и легком), что соответствует литературным данным, согласно которым бактериофаг дикого типа способен незначительно задерживаться и накапливаться в опухолевой ткани по причине недоразвитости сосудистой системы опухоли (Bakhshinejad et al., 2014). При этом специфического накопления бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды, в опухолях Эрлиха и ГА-29 не наблюдалось (данные не приведены). По-видимому, эти опухоли не имеют молекулярных структур, на которые прошла селекция фаговой пептидной библиотеки.

Таким образом, в результате проведения двух скринингов фаговой пептидной библиотеки (*in vitro* на раковых клетках ГА-1 и *in vivo* на опухоли ГА-1) в качестве потенциальных адресных агентов были отобраны два пептида GLHTSATNLYLH и SGVYKVAYDWQH.

В недавно опубликованной работе Diaz-Perlas C. с соавторами проводили скрининг фаговой пептидной библиотеки *in vitro* на модели гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) с целью отбора пептидов, способных проникать через ГЭБ. В результате скрининга был отобран пептид SGVYKVAYDWQH, названный SGV, последовательность которого совпадает с последовательностью одного из отобранного нами пептидов. Химически синтезированный пептид SGVYKVAYDWQH, амидированный по С-концу, обладал способностью проникать через ГЭБ в модели *in vitro*. Также авторами работы было показано, что пептид SGVYKVAYDWQH, амидированный по С-концу и меченный флуоресцентным красителем по N-концу, интернализовался в мышинные эндотелиальные клетки мозга bEnd.3, которые по многим характеристикам схожи с клетками ГЭБ, а также в человеческие эндотелиальные клетки, используемые в модели ГЭБ *in vitro* (Diaz-Perlas et al., 2016). Исходя из наших и литературных данных можно предположить, что отобранный пептид SGVYKVAYDWQH способен связываться с эндотелиальными клетками и проходить через сосудистый барьер, попадая в строму опухоли, где он накапливается, специфически связываясь с раковыми клетками или молекулами микроокружения опухоли.



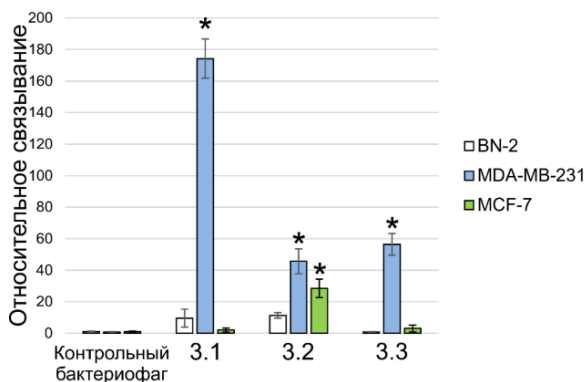
#### 4. Скрининг фаговой пептидной библиотеки на клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 *in vitro*

Перед проведением скрининга фаговой пептидной библиотеки *in vitro* на раковых клетках MDA-MB-231 был проведен негативный скрининг на первичной культуре клеток молочной железы человека BN-2. После третьего и четвертого раундов скрининга были определены и проанализированы последовательности экспонированных пептидов индивидуальных фаговых клонов (по 30 клонов).

Бактериофаги, экспонирующие пептиды YTYDPWLIFPAN (3.1), FIPFDPMSMRWE (3.2), SLPVYAPALTSR (3.3) и SLPPSLPRFIPW (3.5), встретились после обоих раундов скрининга на клетках MDA-MB-231. Частота встречаемости экспонированного пептида YTYDPWLIFPAN (3.1) увеличилась до 53,3% после 4 раунда (26,7% после третьего), а частота встречаемости экспонированного пептида FIPFDPMSMRWE (3.2) не изменилась (30%).

#### 5. Сравнительный анализ связываемости бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды, с раковыми клетками человека *in vitro*

Сравнительный анализ связываемости с клетками бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды YTYDPWLIFPAN (3.1), FIPFDPMSMRWE (3.2), SLPVYAPALTSR (3.3), а также контрольного бактериофага проводили на клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7 и на первичной культуре нетрансформированных клеток молочной железы человека BN-2 (отрицательный контроль) определением титра связавшихся с клетками бактериофагов и методом проточной цитофлуориметрии (Рис. 2, Таблица 1).



**Рис. 2.** Относительное связывание бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды YTYDPWLIFPAN (3.1), FIPFDPMSMRWE (3.2), SLPVYAPALTSR (3.3), и контрольного бактериофага с клетками MDA-MB-231, MCF-7 и BN-2. Связывание контрольного бактериофага использовали в качестве нормировочного значения. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера (Fisher LSD). Значение  $p < 0,05$  (\*) рассматривали как статистически значимое.

Согласно полученным данным бактериофаги, экспонирующие пептиды 3.1, 3.2 и 3.3, статистически значимо связываются с клетками MDA-MB-231 по сравнению с контрольным бактериофагом. Бактериофаг, экспонирующий пептид

3.1, обладает наибольшей степенью связываемости. Кроме того, бактериофаг, экспонирующий пептид 3.2, статистически значимо связывается с клетками MCF-7 по сравнению с контрольным бактериофагом. Стоит отметить, что отобранные фаговые клоны практически не связываются со здоровыми клетками первичной культуры молочной железы человека.

При анализе связывания с клетками бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды, методом проточной цитофлуориметрии (Таблица 1) показано увеличение популяции M13-положительных клеток при инкубации с бактериофагом, экспонирующим пептид 3.1, на 48,9% и на 45,1% - с бактериофагом, экспонирующим пептид 3.2, по сравнению с контрольным бактериофагом. В противоположность результатам титрования не выявлено связывания бактериофага, экспонирующего пептид 3.3, с клетками MDA-MB-231. При анализе связывания отобранных фаговых клонов с клетками MCF-7 показано увеличение популяции M13-положительных клеток при инкубации с бактериофагом, экспонирующим пептид 3.2, на 9,7% по сравнению с контрольным бактериофагом. Анализ связывания с клетками BN-2 не выявил достоверного связывания ни одного из бактериофагов.

**Таблица 1.** Данные проточной цитофлуориметрии клеток MDA-MB-231, MCF-7 и BN-2 при инкубации с бактериофагами, экспонирующими пептиды YTYDPWLIFPAN (3.1), FIPFDPMSMRWE (3.2), SLPVYAPALTSR (3.3), и с контрольным бактериофагом.

	<b>Популяция M-13 положительных клеток (%)</b>		
	<b>MDA-MB-231</b>	<b>MCF-7</b>	<b>BN-2</b>
Контрольный бактериофаг	5,6	12,0	1,7
3.1	54,5	14,0	0,6
3.2	50,7	21,7	2,5
3.3	5,3	10,5	1,6

Таким образом, на основе результатов, полученных двумя методами анализа, мы сделали вывод, что бактериофаг, экспонирующий пептид YTYDPWLIFPAN (3.1), обладает наилучшими показателями связываемости с клетками MDA-MB-231 по сравнению с бактериофагами, экспонирующими пептиды FIPFDPMSMRWE (3.2) и SLPVYAPALTSR (3.3). При этом бактериофаг, экспонирующий пептид 3.1, не связывается с раковыми клетками MCF-7 и со здоровыми клетками молочной железы человека, что указывает на его высокую специфичность к клеткам MDA-MB-231.

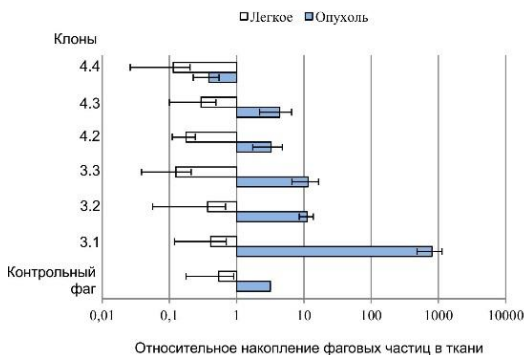
## 6. Скрининг фаговой пептидной библиотеки *in vivo* на опухоли MDA-MB-231 в модели ксенографтов

Для получения пептидов, специфически связывающихся с опухолевой тканью MDA-MB-231, было проведено 3 раунда скрининга фаговой пептидной библиотеки на мышах SCID с трансплантированной опухолью человека MDA-MB-231. После третьего раунда были определены и проанализированы последовательности 36 клонов бактериофагов.

Наибольшие частоты встречаемости выявлены для экспонированных бактериофагами пептидов SLPVYAPALTSR (4.1), GREPAASLLSHF (4.2), GTGLVTLPRLLTV (4.3) и DSQFNKYSIATV (4.4) и составили 19,4%, 16,6%, 13,8% и 13,8%, соответственно. При этом аминокислотная последовательность экспонированного бактериофагом пептида SLPVYAPALTSR (4.1) соответствует аминокислотной последовательности пептида 3.3, отобранного *in vitro* на линии раковых клеток человека MDA-MB-231.

## 7. Специфическое накопление бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды, в опухолевой ткани MDA-MB-231 в модели ксенографтов

Изучение специфического накопления в опухолевой ткани бактериофагов, экспонирующих пептиды 3.1 (YTYPDWLIFPAN), 3.2 (FIPFDPMSMRWE), 3.3 (SLPVYAPALTSR), отобранных *in vitro*, и бактериофагов, экспонирующих пептиды 4.1 (SLPVYAPALTSR), 4.2 (GREPAASLLSHF), 4.3 (GTGLVTLPRLLTV), 4.4 (DSQFNKYSIATV), отобранных *in vivo*, проводили путём определения титра бактериофага в опухолевой ткани MDA-MB-231, трансплантированной мышам-ксенографтам линии SCID, и в контрольных органах (легкое и печень) спустя 24 часа после внутривенного введения бактериофага исследуемым животным (Рис. 3).



**Рис. 3.** Специфическое накопление бактериофагов, экспонирующих отобранные пептиды, в опухолевой ткани MDA-MB-231. Мышам SCID с трансплантированной опухолью MDA-MB-231 внутривенно вводили клоны бактериофагов, экспонирующих пептиды 3.1, 3.2, 3.3 (4.1), 4.2, 4.3, 4.4 и контрольный бактериофаг. Нормированную связываемость с опухолью (легким) рассчитывали как соотношение между средним значениям титра (БОЕ/г), полученного из опухолевой ткани (легкого), и

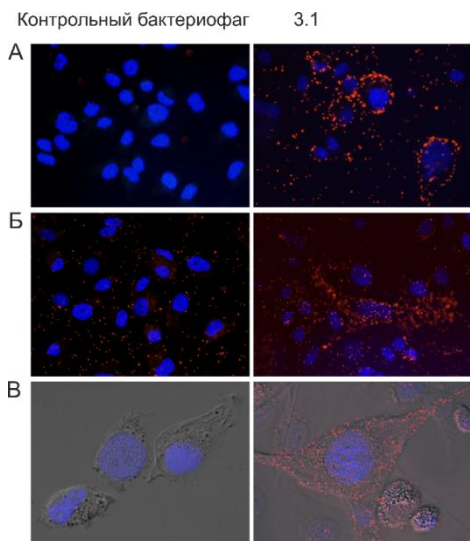
средним значением титра (БОЕ/г), полученного из печени. Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера (Fisher LSD). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего, значение  $p < 0,05$  (\*) рассматривали как статистически значимое.

Согласно полученным результатам наибольшей степенью накопления в опухолевой ткани MDA-MB-231 обладает бактериофаг, экспонирующий пептид УТΥDPWLIFPAN (3.1), отобранный при скрининге фаговой пептидной библиотеки *in vitro*.

### 8. Взаимодействие пептида УТΥDPWLIFPAN с клетками MDA-MB-231

Поскольку пептид УТΥDPWLIFPAN (3.1) обеспечивает наиболее высокую специфичность связывания фаговых частиц с клетками MDA-MB-231, а также значительное накопление фаговых частиц в опухолевой ткани MDA-MB-231 *in vivo*, мы выбрали его для изучения взаимодействия с клетками MDA-MB-231.

Инкубацию бактериофага, экспонирующего пептид 3.1, с клетками MDA-MB-231 проводили при 4°C – для подтверждения связывания фаговых частиц с клеточной поверхностью и при 37°C – для оценки проникновения фаговых частиц в клетку (Рис. 4).

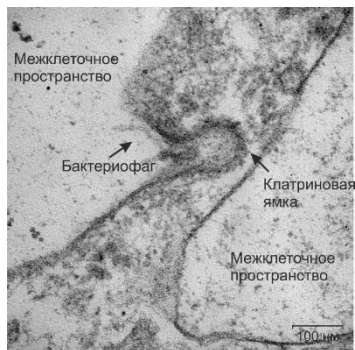


**Рис. 4.** Экспонированный пептид УТΥDPWLIFPAN (3.1) обеспечивает проникновение фаговой частицы внутрь клетки MDA-MB-231. (А) Флуоресцентная микроскопия (x40) клеток MDA-MB-231, инкубированных с бактериофагом, экспонирующим пептид 3.1, и контрольным бактериофагом при 4°C. (Б) Флуоресцентная микроскопия (x40) и (В) конфокальная флуоресцентная микроскопия (x100) клеток MDA-MB-231, инкубированных с бактериофагом, экспонирующим пептид 3.1, и контрольным бактериофагом при 37°C и с последующим проведением отмывок от связавшихся с клеточной поверхностью бактериофагов. Флуоресцентная микроскопия выполнена с помощью первичных антител anti-M13 и вторичных антител Alexa Fluor 488. Ядра клеток окрашены DAPI.

Из данных Рисунка 4 А видно, что при инкубации с клетками MDA-MB-231 при 4°C бактериофаг, экспонирующий пептид 3.1, способен связываться с поверхностными структурами клеток, в отличие от контрольного бактериофага. При инкубации с клетками MDA-MB-231 при 37°C (Рис. 4, Б, В) бактериофаг, экспонирующий пептид 3.1, остается связанным с клетками даже после проведения серии отмывок клеток от связавшихся с клеточной поверхностью фаговых частиц, что указывает на способность экспонированного пептида обеспечивать интернализацию фаговых частиц.

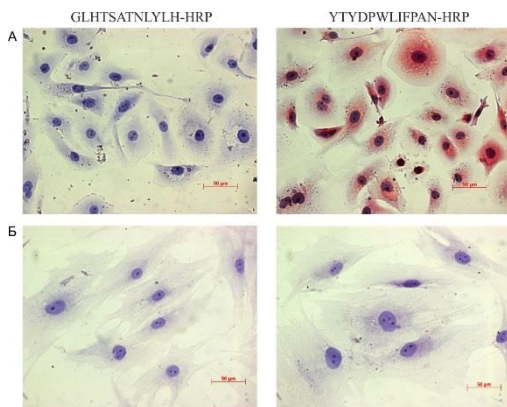
На ультратонких срезах осадков клеток MDA-MB-231 через 10 минут и 1 час инкубации с бактериофагом, экспонирующим пептид 3.1, фаговые частицы выявляются в межклеточном пространстве, в инвагинациях плазмоллемы и в

«опушенных» ямках, что говорит об интернализации фаговой частицы клетками с помощью фагоцитоза и клатрин-зависимого эндоцитоза (Рис. 5) (работа проведена Юнусовой А.Ю., ИХБФМ СО РАН).



**Рис. 5.** Бактериофаг, экспонирующий пептид YTYDPWLIFPAN (3.1), проникает в клетку MDA-MB-231 путем клатрин-зависимого эндоцитоза. Электронная микроскопия клетки MDA-MB-231 после 1 часа инкубации с бактериофагом, экспонирующим пептид 3.1, при 37°C. Ультратонкий срез.

Мы также исследовали способность химически синтезированного пептида YTYDPWLIFPAN, конъюгированного с HRP через остаток цистеина (YTYDPWLIFPANGGGSC-HRP), связываться с клетками MDA-MB-231 и BN-2 (Рис. 6). В качестве отрицательного контроля использовали конъюгат GLHTSATNLYLHGGGSC-HRP, поскольку бактериофаг, экспонирующий пептид GLHTSATNLYLH, не связывался с клетками MDA-MB-231 (данные не приведены).



**Рис. 6.** Связывание с клетками MDA-MB-231 (А) и BN-2 (Б) конъюгата пептида YTYDPWLIFPAN с HRP (световая микроскопия, x40). В качестве отрицательного контроля использовали конъюгат пептида GLHTSATNLYLH с HRP. Субстрат для HRP – 3-амино-9-этилкарбазол (АЕС), клетки окрашены гематоксилином Майера.

Из данных Рисунка 6 видно, что конъюгат пептида YTYDPWLIFPAN с HRP связывается с клетками MDA-MB-231, тогда как со здоровыми клетками молочной железы BN-2 связывание этого конъюгата не обнаружено. При инкубации клеток с конъюгатом контрольного пептида с HRP специфической окраски не наблюдается ни для MDA-MB-231, ни для BN-2, что указывает на

отсутствие связывания контрольного пептида как с раковыми, так и со здоровыми клетками.

Таким образом, по результатам проведения четырех скринингов фаговой пептидной библиотеки последовательности трех пептидов SGVYKVAYDWQH (1.1), GLHTSATNLYLH (1.2) и YTYDPWLIFPAN (3.1) были выбраны для создания слитых белков с рекомбинантным аналогом лактаптина RL2. Пептиды 1.1 и 1.2 отобраны к опухолевой ткани ГА-1, пептид 3.1 — к опухолевой ткани MDA-MB-231 (Таблица 2).

**Таблица 2.** Последовательности пептидов, выбранных для создания рекомбинантных слитых белков.

Последовательность экспонированного пептида	Специфичность связывания экспонированного пептида	Обозначение
GLHTSATNLYLH	Опухоль гепатомы мыши ГА-1	T1
SGVYKVAYDWQH	Опухоль гепатомы мыши ГА-1	T2
YTYDPWLIFPAN	Клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и опухоль MDA-MB-231 в модели-ксенографтов	T3

## 9. Конструирование рекомбинантных слитых белков, состоящих из отобранных пептидов T1, T2, T3 и RL2.

Для получения рекомбинантных слитых белков, состоящих из RL2 и отобранных из фаговой пептидной библиотеки опухоль-адресующих пептидов T1, T2 и T3, были созданы три генетические конструкции pET-15b\_T1-RL2 и pET-15b\_T2-RL2 и pET-15b\_T3-RL2, кодирующие слитые белки T1-RL2, T2-RL2 и T3-RL2, соответственно.

Последовательности, кодирующие слитые белки, были сконструированы таким образом, что продукты синтеза представляют собой полипептиды, у которых отобранный пептид располагается на N-конце, а RL2 - на C-конце. Отобранный пептид и RL2 разделены между собой глициновым линкером (Рис. 7). Глициновый линкер обеспечивает подвижность функциональных доменов целевого белка относительно друг друга.



**Рис. 7.** Схема строения последовательности ДНК, кодирующей слитый белок, состоящий из отобранного из фаговой пептидной библиотеки пептида и RL2.

Конструирование рекомбинантных плазмид осуществляли путем встраивания нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый белок, в векторную плазмиду pET-15b (5708 п.н.) (Novagen, США) под промотор РНК-полимеразы фага Т7.

### 10. Конструирование слитых белков, состоящих из iRGD-пептида и RL2.

Из литературных данных известно, что RGD-мотив в составе iRGD-пептида (CRGDKGPDC) узнает и связывается с  $\alpha_v\beta_3/5$ ,  $\alpha_5\beta_1$  интегринами рецепторами, повышенная экспрессия которых имеет место на клетках эндотелия опухоли и раковых клетках (Ruoslahti, 2012, Weis et al., 2011). В частности, показано, что  $\alpha_v$  интегринами рецепторы экспрессируются на поверхности клеток MDA-MB-231 в количестве достаточном для специфического узнавания их RGD-мотивом (Wong et al., 1998, Yang et al., 2006). После связывания с  $\alpha_v$  интегринами рецепторами iRGD-пептид подвергается разрезанию с высвобождением С-конца CRGDK-мотива. Полагают, что после протеолитического разрезания пептид теряет аффинность к  $\alpha_v$  интегринами рецепторам и приобретает способность связываться с NRP-рецепторами, что обеспечивает запуск NRP-зависимого эндоцитоза (Sugahara et al., 2015).

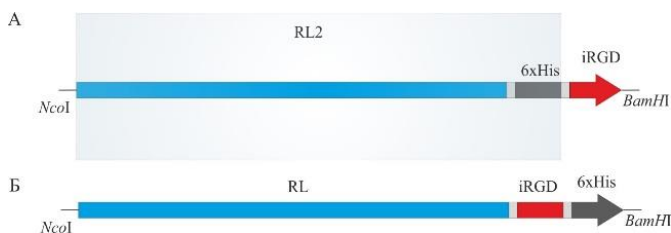
Поэтому мы решили наряду с пептидами, отобранными из фаговой пептидной библиотеки, использовать iRGD-пептид в качестве возможного адресующего агента для RL2.

Для получения генетических конструкций, обеспечивающих продукцию рекомбинантных слитых белков RL2-iRGD и RL-iRGD-His, были сконструированы две ДНК-последовательности, кодирующие слитые белки (Рис. 8).

Первая последовательность (RL\_H\_RGD) кодирует полипептид, у которого RL2 располагается на N-конце, а адресный пептид iRGD - на С-конце. Таким образом, iRGD-пептид N-концом присоединен к белку. Такая структура аналогична структуре iRGD-пептида, экспонированного бактериофагом Т7, на основе которого была выполнена фаговая пептидная библиотека, использованная для его отбора (Рис. 8 А).

Вторая последовательность (RL\_RGD\_H) сконструирована таким образом, что последовательность iRGD-пептида разделяет последовательность, кодирующую фрагмент к-казеина человека (RL) и гистидиновый тракт (6xHis). Такая последовательность сконструирована с целью возможного

протеолитического высвобождения гистидинового тракта при взаимодействии iRGD-пептида в составе слитого белка с интегриновыми рецепторами (Рис. 8 Б).



**Рис. 8.** Схема строения последовательностей ДНК RL\_H\_RGD (А) и RL\_RGD\_H (Б), кодирующих слитые белки RL2-iRGD и RL-iRGD-His, соответственно. Серыми прямоугольниками обозначены глициновые спейсеры.

Конструирование рекомбинантных плазмид pET-15b\_RL2-iRGD и pET-15b\_RL-iRGD-His осуществляли путем встраивания нуклеотидных последовательностей, кодирующих слитые белки, в векторную плазмиду pET-15b под промотор РНК-полимеразы фага Т7.

### 11. Биосинтез рекомбинантных слитых белков клетками штаммов-продуцентов *E.coli*

Все рекомбинантные штаммы-продуценты *E.coli* были получены на основе реципиентного штамма *E.coli* BL21(DE3) методом временной доминантной селекции с использованием в качестве маркера гена устойчивости к ампициллину. Трансформацию компетентных клеток *E.coli* BL21(DE3) проводили сконструированными плазмидами pET-15b\_T1-RL2, pET-15b\_T2-RL2, pET-15b\_T3-RL2, pET-15b\_RL2-iRGD и pET-15b\_RL-iRGD-His.

Для наработки рекомбинантных слитых белков использовали биореактор с механическим перемешиванием BIOSTAT® Aplus. Для каждого из штаммов-продуцентов было выполнено по 2 ферментации на биореакторе.

Выход целевого белка на 4 ч с момента проведения индукции составлял не менее 40% для всех штаммов-продуцентов. Для всех штаммов-продуцентов, кроме *E. coli* BL21(DE3)/pET-15b\_T2-RL2, выход целевого белка находился в диапазоне от 52,0 до 63,7% от общего белкового пула *E.coli*.

### 12. Получение рекомбинантных слитых белков T1-RL2, T2-RL2, T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His.

Выделение рекомбинантных слитых белков из клеток штаммов-продуцентов и их очистку проводили согласно лабораторному регламенту получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного аналога лактапина RL2, разработанной в 2013 г. Анализ чистоты выделенных рекомбинантных слитых белков проводили методами электрофореза в 13% ПААГ по Лэммли в денатурирующих и не денатурирующих условиях и ВЭЖХ.



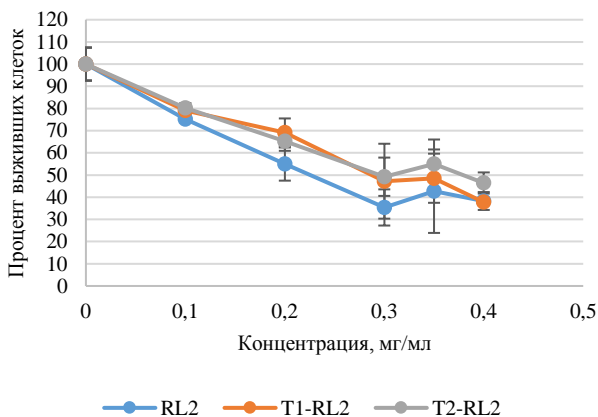
Подлинность рекомбинантных слитых белков подтверждали методами Вестерн-блот анализа и MALDI TOF масс-спектрометрии. Кроме того, препараты рекомбинантных слитых белков были проанализированы на содержание бактериальных эндотоксинов с помощью ЛАЛ-теста и на содержание бактериальных белков с помощью коммерческого набора «Western Blot Kit for the detection of *E.coli* Host Cell Proteins».

Таким образом, были получены образцы рекомбинантных слитых белков, соответствующие требованиям ГФ №XIII РФ для инъекционных препаратов. Полученные белковые препараты были использованы для проведения последующих экспериментов.

### 13. Сравнительный анализ цитотоксического действия RL2, T1-RL2 и T2-RL2 на раковые клетки мыши ГА-1

Сравнение цитотоксической активности RL2 и рекомбинантных слитых белков T1-RL2, T2-RL2 проводили на культуре клеток ГА-1, поскольку, пептиды T1 и T2 были отобраны к опухоли ГА-1. Изменение жизнеспособности клеток, инкубированных с различными концентрациями белков, относительно контрольных не обработанных клеток оценивали с помощью МТТ-теста (Рис. 9).

Из данных Рисунка 9 видно, что рекомбинантные слитые белки T1-RL2 и T2-RL2, как и RL2, дозозависимо снижают жизнеспособность клеток ГА-1. ИК50 (концентрация препарата, вызывающая торможение роста клеток на 50%) RL2, T1-RL2 и T2-RL2 составили 0,23, 0,3 и 0,3 мг/мл, соответственно

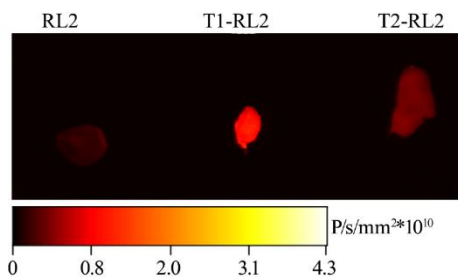


**Рис. 9.** Изменение жизнеспособности клеток ГА-1 при инкубации с различными концентрациями RL2 и рекомбинантных слитых белков T1-RL2 и T2-RL2 в культуральной среде. Время инкубации составило 48 ч. Жизнеспособность клеток определяли относительно жизнеспособности контрольных клеток, инкубированных в отсутствие белков. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

Таким образом, присоединение коротких специфических пептидов T1 и T2 к N-концу RL2 не повлияло на цитотоксическую активность RL2 по отношению к клеткам ГА-1.

#### 14. Изучение тропности рекомбинантных слитых белков T1-RL2 и T2-RL2 к опухолевой ткани ГА-1

По данным фармакокинетики время полувыведения лекарственного средства «Лактаптин» из кровотока составляет 15,6 мин. «Лактаптин» достаточно равномерно распределяется по органам и тканям с некоторым преимущественным накоплением в печени и почках (Бондаренко и др., 2015). Накопление рекомбинантных слитых белков в опухолевой ткани оценивали на мышинной опухолевой модели ГА-1. Мышам с подкожно трансплантированной опухолью внутривенно (в хвостовую вену) вводили конъюгаты RL2-Су5, T1-RL2-Су5 и T2-RL2-Су5. Опухоль извлекали через 10 минут циркуляции меченых конъюгатов в организме животного. Интенсивность флуоресценции исследуемых опухолей измеряли на приборе KODAK *In vivo* FX Professional Imaging System (Рис. 10).



**Рис. 10.** Накопление RL2 и рекомбинантных слитых белков T1-RL2 и T2-RL2, меченных флуоресцентным красителем Су5, в опухоли ГА-1. Интенсивность флуоресценции измеряли количеством фотонов в секунду на см<sup>2</sup> (p/s/cm<sup>2</sup>) (среднее значение ± стандартное отклонение).

Согласно данным Рисунка 10 через 10 минут циркуляции рекомбинантных белков самый высокий уровень флуоресцентного сигнала в опухоли был зарегистрирован для белка T1-RL2. Его интенсивность в  $5,08 \pm 1,15$  раз превышала интенсивность сигнала опухоли с RL2. Интенсивность флуоресцентного сигнала опухоли с T2-RL2 оказалась всего в  $2,81 \pm 1,48$  раза выше по сравнению с интенсивностью сигнала опухоли с RL2.

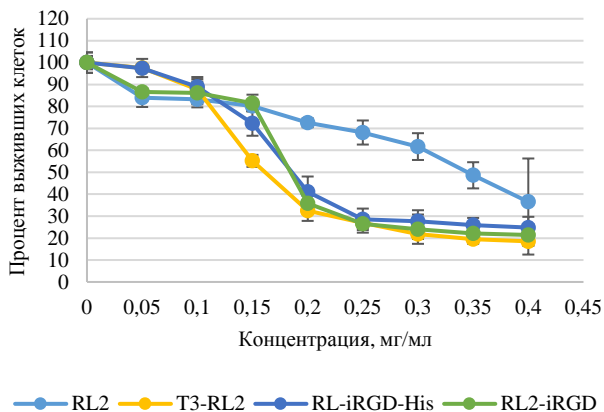
Таким образом, показана принципиальная возможность увеличения концентрации RL2 в опухоли путем присоединения к нему короткого адресующего пептида.

#### 15. Сравнительный анализ цитотоксического действия RL2, T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His на раковые клетки человека MDA-MB-231

Сравнительный анализ цитотоксического действия RL2 и рекомбинантных слитых белков T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His проводили на культуре клеток MDA-MB-231, поскольку пептид T3 был отобран к клеткам и опухоли MDA-MB-231, и согласно литературным данным опухоль-адресующий пептид iRGD способен связываться с данной линией клеток. Клетки инкубировали с различными концентрациями белков в культуральной среде в течение 48 ч, и оценивали изменение их жизнеспособности относительно контрольных не обработанных клеток с использованием МТТ-теста.

Было показано, что рекомбинантные слитые белки T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His, как и RL2, дозозависимо снижают жизнеспособность клеток MDA-

MB-231 (Рис. 11). Цитотоксическая активность белков Т3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His оказалась приблизительно одинаковой и превышала цитотоксическую активность RL2. ИК<sub>50</sub> (концентрация препарата, вызывающая торможение роста клеток на 50%) для белков Т3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His составила 0,15-0,20 мг/мл, в то время как ИК<sub>50</sub> для RL2 оказалось равной 0,35-0,4 мг/мл.

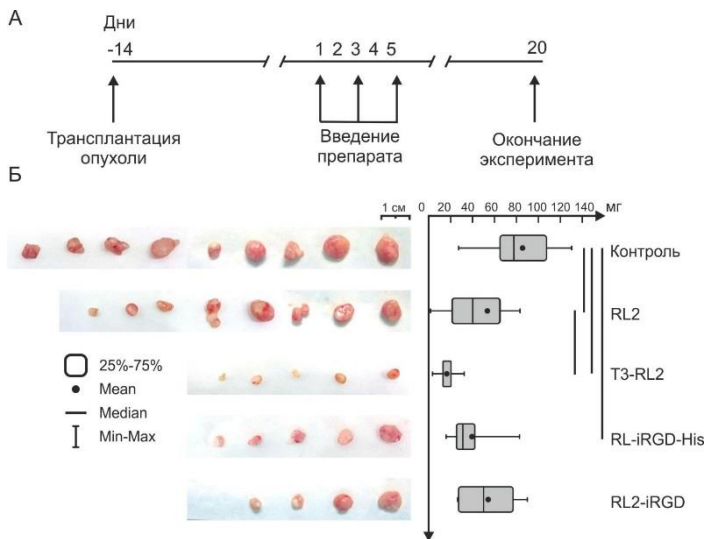


**Рис. 11.** Изменение жизнеспособности клеток MDA-MB-231 при инкубации с различными концентрациями RL2 и рекомбинантных слитых белков Т3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His в культуральной среде. Жизнеспособность клеток определяли относительно жизнеспособности контрольных клеток, инкубированных в отсутствие белков. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

Таким образом, полученные рекомбинантные слитые белки Т3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His не отличаются между собой по цитотоксической активности, но обладают большей цитотоксической активностью чем RL2. То есть присоединение короткого пептида как к N-концу (Т3-RL2), так и С-концу (RL2-iRGD и RL-iRGD-His) RL2 не уменьшило его цитотоксической активности.

### 16. Сравнение противоопухолевой активности RL2 и рекомбинантных слитых белков Т3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His на опухоли MDA-MB-231

Сравнение противоопухолевой активности RL2 и рекомбинантных слитых белков Т3-RL2, RL2-iRGD, RL-iRGD-His проводили на мышах SCID с трансплантированной опухолью человека MDA-MB-231. Клетки MDA-MB-231 с добавлением матригеля (50% по объему) подкожно прививали мышам для формирования опухолевых узлов. Для эксперимента использовали животных, размер опухолевых узлов которых достигал 20±10 мм<sup>3</sup>. Белковые препараты в дозе 40 мг/кг вводили в физиологическом растворе курсом из трех внутривенных инъекций через день. Контрольной группе мышей вводили физиологический раствор в режиме введения препаратов. На 20 день после начала эксперимента мышей забивали, опухоли извлекали и взвешивали (Рис. 12 А, Б).



**Рис. 12.** **А** – Схема эксперимента; **Б** - Противоопухолевая активность RL2 и рекомбинантных слитых белков T3-RL2, RL2-iRGD, RL-iRGD-His. Мышам SCID с подкожно трансплантированными опухолями MDA-MB-231 проводили лечение белковыми препаратами (RL2, T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His). Результаты измерения веса опухолей после окончания эксперимента представлены в виде диаграммы типа «ящик с усами». Ящик отражает 25-й, 50-й и 75-й перцентили. Планки отражают максимум/минимум. Черная точка означает среднее значение. Статистический анализ был проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием наименьшей значимости Фишера (Fisher LSD). Значение  $p < 0,05$  рассматривали как статически значимыми.

Как видно из данных Рисунка 12 размеры опухолей в контрольной группе мышей больше, чем в группах, которым проводили лечение RL2 и рекомбинантными слитыми белками. Средний вес опухолей в контрольной группе и группе, получавшей лечение RL2, составили 83,3 мг и 52,6 мг, соответственно. Таким образом, индекс торможения роста опухоли при лечении RL2 составил 37%, что согласуется с ранее опубликованными данными, в которых индекс торможения роста опухоли (ТРО) для RL2 составил 43% (Koval et al., 2014). Средний вес опухолей в группах мышей, получавших лечение рекомбинантными слитыми белками RL2-iRGD и RL-iRGD-His достоверно не отличался от среднего веса опухолей в группе, получавшей лечение RL2. Наиболее сильный ингибирующий эффект на рост опухоли оказал слитый белок T3-RL2. Средний вес опухолей в группе, получавшей лечение T3-RL2 составил 16,4 мг, а индекс ТРО составил 80%.

Таким образом, мы показали возможность повышения терапевтической эффективности цитотоксического агента белковой природы при присоединении к нему короткого опухолевь-адресующего пептида. В частности, конъюгирование

к нему короткого опухоль-адресующего пептида. В частности, конъюгирование специфического пептида YTYDPWLIFPAN к N-концу RL2 через глициновый спейсер значительно увеличило противоопухольевую активность RL2.

## ВЫВОДЫ

1. Из комбинаторной фаговой пептидной библиотеки методом аффинной селекции отобраны фаговые клоны, экспонирующие опухоль-адресующие пептиды T1 (GLHTSATNLYLH), T2 (SGVYKVAYDWQH) и T3 (YTYDPWLIFPAN). Пептиды T1 и T2 обеспечивают накопление фаговых частиц в мышинных опухолях различного гистогенеза. Пептид T3 обеспечивает специфическое связывание фаговых частиц с клетками аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и их накопление в опухоли MDA-MB-231 в модели ксенографтов.
2. Получены генетические конструкции, обеспечивающие наработку рекомбинантных слитых белков опухоль-адресующий пептид-RL2 в клетках штаммов-продуцентов *E.coli*. Проведена наработка и очистка рекомбинантных слитых белков T1-RL2, T2-RL2, T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His.
3. Показано, что рекомбинантные слитые белки T1-RL2, T2-RL2, T3-RL2, RL2-iRGD и RL-iRGD-His, как и RL2, дозозависимо снижают жизнеспособность раковых клеток мыши и человека в культуре. Присоединение коротких опухоль-адресующих пептидов к N-концу или C-концу RL2 не снижает его цитотоксической активности.
4. Показано, что тропность к опухоли рекомбинантных слитых белков T1-RL2 и T2-RL2 превосходит тропность RL2 в 5 и 2,8 раза, соответственно.
5. Показано, что противоопухольевая эффективность белка T3-RL2 в отношении опухоли аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 значительно превосходит эффективность RL2. Индекс торможения роста опухоли для T3-RL2 составил 80 % против 37% для RL2.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В РАБОТАХ

- 1) Richter V. A., Vaskova A. A., Koval O. A., Kuligina, E. V. Antitumor Potential of Lactaptin // *Biology and Medicine*. –2015. –S. 2. –doi:10.4172/0974-8369.S2-004.
- 2) Немудрая А. А., Рихтер В. А., Кулигина Е. В. Фаговые пептидные библиотеки как источник адресующих лигандов // *Acta Naturae*. –2016. –V. 8. –P. 52–63.
- 3) Savelyeva A. V., Nemudraya A. A., Podgornyi V. F., Laburkina N. V., Ramazanov Y. A., Repkov A. P., Kuligina E. V., Richter V. A. Analysis of the efficiency of recombinant E. coli strain cultivation in a gas-vortex bioreactor // *Biotechnol. Appl. Biochem.* –2016. –doi: 10.1002/bab.1527.
- 4) Nemudraya A. A., Makartsova A. A., Fomin A. S., Nushtaeva A. A., Koval O. A., Richter V. A., Kuligina E. V. Tumor-Specific Peptide, Selected from a Phage Peptide Library, Enhances Antitumor Activity of Lactaptin // *PLoS One*. –2016. –V. 11. e0160980.
- 5) Nemudraya A. A., Kuligina E. V., Ilyichev A. A., Fomin A. S., Stepanov G. A., Savelyeva A. V., Koval O. A., Richter V. A. Selection of antitumor displayed peptides for the specific delivery of the anticancer drug lactaptin // *Oncol. Lett.* –2016. –doi: 10.3892/ol.2016.5266.
- 6) Васькова А. А., Кулигина Е. В., Макарецова А. А., Коваль О. А., Рихтер В. А. Опухоль-специфический пептид для адресной химиотерапии опухолей молочной железы человека. Патент РФ № 2595404. Приоритет от 4.08.2015. Опубликовано 27.08.2016, бюлл. 24.