



УДК 577.112.017

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ ФРАГМЕНТ 44–77 ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРЕПЯТСТВУЕТ РАЗВИТИЮ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЦЫ

© 2012 г. Р. С. Есипов<sup>\*\*</sup>, К. А. Бейрахова<sup>\*</sup>, Л. А. Чупова<sup>\*</sup>, В. Г. Лихванцева<sup>\*\*</sup>,  
Е. В. Степанова<sup>\*\*\*</sup>, А. И. Мирошников<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП-7 Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>\*\*</sup> Учреждение РАН Центральная клиническая больница РАН, Москва

<sup>\*\*\*</sup> Государственное учреждение Российский онкологический научный центр  
им. Н.Н. Блохина РАН, Москва

Поступила в редакцию 22.06.2011 г. Принята к печати 07.07.2011 г.

Фактор дифференцировки пигментного эпителия (pigment epithelium-derived factor, PEDF), секретируемый гликопротеин размером 50 кДа, входит в ряд сильнейших эндогенных ингибиторов ангиогенеза. Фрагмент PEDF-(44–77) обладает антиангиогенными свойствами полноразмерного белка и представляет собой потенциальный препарат для лечения заболеваний органов зрения, сопровождающихся патологической неоваскуляризацией.

В работе предложен эффективный масштабируемый биотехнологический способ получения фрагмента PEDF-(44–77) в составе гибридного белка с интеином *SspDnaB*. Гибридный белок получали в бактериальных клетках *E. coli* в виде телец включения, солюбилизировали и подвергали автокаталитическому расщеплению с образованием свободного фрагмента PEDF-(44–77) (выход реакции 77%). Целевой пептид отделяли от интеина с помощью тангенциальной ультрафильтрации. Окончательную очистку PEDF-(44–77) производили с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Выход целевого пептида (чистота 99%) составил 65 мг с 1 л культуры.

Антиангиогенная активность полученного пептида была подтверждена *in vitro* с использованием культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10. Выявлена способность препарата в концентрации 1 нМ подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток на 53%, а также ингибировать образование трубчочкоподобных структур эндотелиальными клетками. На экспериментальной модели неоваскуляризации роговицы кролика была показана способность полученного рекомбинантного фрагмента PEDF-(44–77) блокировать начальные этапы ангиогенеза.

*Ключевые слова:* PEDF, рекомбинантный белок, антиангиогенный пептид, неоваскуляризация.

### ВВЕДЕНИЕ

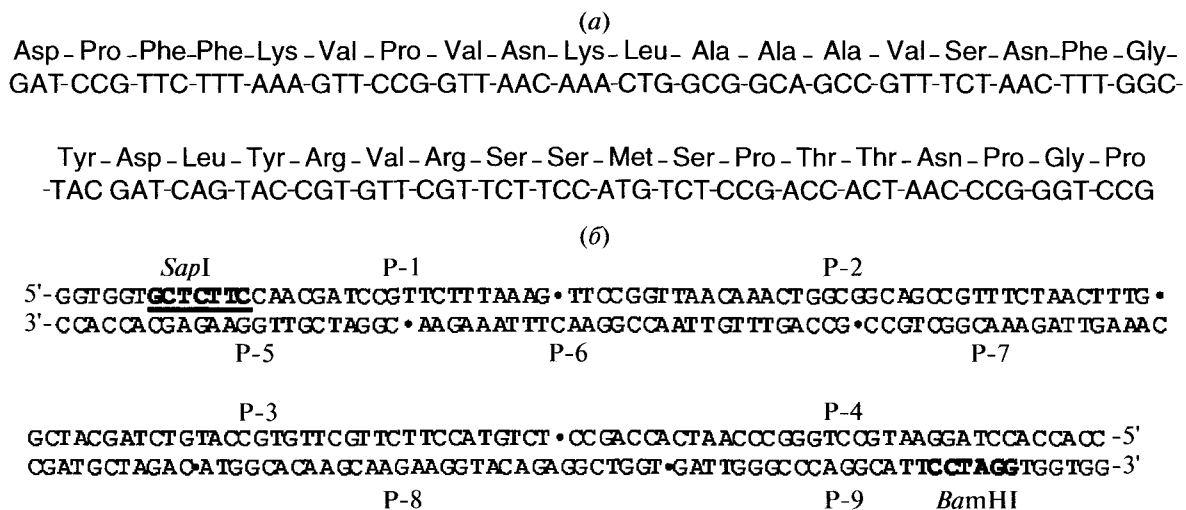
Фактор дифференцировки пигментного эпителия (pigment epithelium-derived factor, PEDF) — гликопротеин (молекулярная масса 50 кДа) из группы ингибиторов сериновых протеиназ, секретируемый клетками пигментного эпителия [1, 2]. PEDF стимулирует дифференцировку нейронов, обладает нейротрофическими, антиангиогенными, противоопухолевыми и противовоспалительными свойствами [1, 3–5]. PEDF яв-

ляется эффективным эндогенным ингибитором ангиогенеза: он препятствует миграции эндотелиальных клеток, блокирует патологический рост сосудов [6] и снижает экспрессию эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor), ключевого проангиогенного фактора [7]. Нарушение внутриглазного баланса VEGF и PEDF наблюдается при заболеваниях, сопровождающихся патологической неоваскуляризацией сетчатки [8–10]. Восстановление естественного уровня PEDF в тканях и жидкостях глаза является перспективной стратегией терапии пролиферативной диабетической ретинопатии и возрастной дегенерации сетчатки [11].

Ранее было показано, что фрагмент 44–77 PEDF обладает всем спектром антиангиогенных эффектов полноразмерного белка. Он блокирует миграцию и индуцирует апоптоз эндотелиальных кле-

Сокращения: CBD — хитинсвязывающий домен; ESI — ионизация распылением в электрическом поле; PEDF — фактор дифференцировки пигментного эпителия (pigment epithelium-derived factor); PMSF — фенилметилсульфонилфторид; TOF — времяпролетный масс-спектрометрический детектор.

<sup>#</sup> Автор для связи (+7 (495) 336-68-33; факс: +7 (495) 330-74-10; эл. почта: esipov@ibch.ru).



**Рис. 1.** Искусственный ген PEDF-(44–77). (а) – аминокислотная последовательность PEDF-(44–77) и соответствующая оптимизированная последовательность нуклеотидов; (б) – схема синтеза искусственного гена PEDF-(44–77) из олигонуклеотидов P-1–P-9. Точкой обозначен участок лигирования соседних нуклеотидов.

ток, подавляет неоваскуляризацию роговицы и сосудистой оболочки глаза [12, 13]. На модели неангиогенеза сосудистой оболочки глаза крысы было показано, что фрагмент PEDF-(44–77) обладает способностью подавлять патологическую неоваскуляризацию с такой же эффективностью, что и полноразмерный PEDF в эквивалентной концентрации [13].

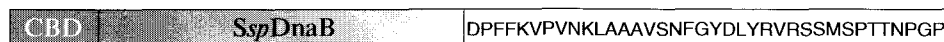
PEDF-(44–77) для биологических исследований преимущественно синтезируют химическим путем [13, 14]. Описан также способ получения рекомбинантного фрагмента PEDF-(44–77) в виде гибридного белка с глутатионтрансферазой, который после очистки на аффинном сорбенте подвергают протеолитическому расщеплению тромбином [15]. Выход целевого пептида при такой схеме получения составлял в среднем 10 мг с 1 л культуры. Использование дорогостоящих высокоспецифичных эндопептидаз часто является лимитирующим фактором при масштабировании подобных биотехнологических процессов. Применение систем очистки белков на основе автокаталитически расщепляющихся полипептидов, таких как интеины, позволяет оптимизировать стадию отделения целевого пептида от белка-носителя [16].

В данной работе мы предлагаем масштабируемую схему получения PEDF-(44-77)-фрагмента в составе слитного белка с модифицированным мини-интеином *SspDnaB* из цианобактерии *Synechocystis* sp.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Ген целевого пептида, оптимизированный по составу кодонов для экспрессии в *E. coli*, синтезировали из перекрывающихся олигонуклеотидов по схеме, приведенной на рис. 1. Помимо собственно последовательности фрагмента PEDF-(44–77) ген кодировал три дополнительные аминокислоты на С-конце пептида (Pro-Gly-Pro), добавленные для увеличения стабильности пептида *in vivo* [17] (рис. 1). Ген клонировали в векторе pGEM5zf(-) и подтверждали его последовательность секвенированием. Полученную плазмиду расщепляли рестриктазами *SapI* и *BamHI*, выделяли фрагмент, несущий целевой ген, и клонировали его в векторе pTWIN1, предварительно обработанном этими же рестриктазами. Коммерчески доступный экспрессионный вектор pTWIN1 несет гены интеина *SspDnaB* и хитин-связывающего домена под контролем промотора 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 индукции образуется гибридный белок *SspDnaB*-PEDF(44–77) (29.2 кДа), состоящий из хитинсвязывающего домена (CBD, 6.4 кДа) интеина *SspDnaB* (17.3 кДа) и целевого фрагмента PEDF-(44–77) (4 кДа) (рис. 2).



**Рис. 2.** Гибридный белок SspDnaB-PEDF(44–77). SspDnaB – интеин из цианобактерии *Synechocystis* sp., CBD – хитин-связывающий домен.

Использование мини-интеина из *Synechocystis* sp. в качестве белка-носителя при биотехнологическом получении пептидов медицинского назначения имеет ряд преимуществ: при расщеплении гибридного белка сохраняется нативная структура целевого пептида (*N*-концевая аминокислота пептида не модифицируется в результате реакции); расщепление гибридной конструкции стимулируется сдвигом pH и не требует применения дорогостоящих специфических протеиназ или реактивов [16].

Однако рекомбинантные конструкции на основе интеина SspDnaB склонны к преждевременному автокаталитическому расщеплению *in vivo* при биосинтезе в бактериальных клетках, что значительно снижает выход целевого продукта. Расщепление можно минимизировать, если культивировать клетки штамма-продуцента в условиях, способствующих агрегации гибридного белка в виде телец включения (индукция биосинтеза бел-

ка при температуре 37°C и последующий рост культуры в течение 3–4 ч) [18, 19].

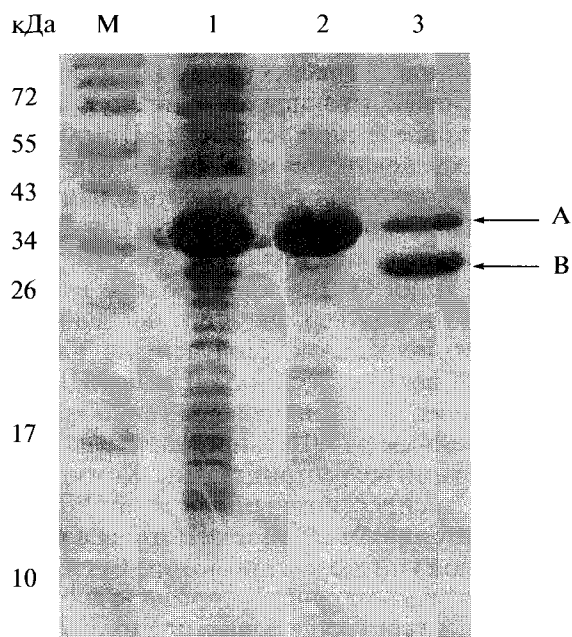
Ферментация продуцента *E. coli* ER2566/pTWIN-PEDF была произведена на участке экспериментальной ферментации отдела биологического производства (ОБП) ИБХ РАН. Уровень биосинтеза гибридной конструкции составил 43% от суммарного клеточного белка. Гибридный белок SspDnaB-PEDF(44–77) был получен в нерастворимой форме, автокаталитическое расщепление *in vivo* не превышало 5% (рис. 3).

#### Очистка гибридного белка SspDnaB-PEDF(44–77)

Биомассу штамма-продуцента разрушали с помощью ультразвука, тельца включения (ТВ), содержащие гибридный белок SspDnaB-PEDF(44–77), отделяли с помощью центрифугирования и отмывали сначала буфером для разрушения, а затем дистиллированной водой. Гибридный белок солибилизировали в щелочном буферном растворе (pH 9.0), содержащем 8 М мочевины.

Хитинсвязывающий домен в составе гибридного белка позволяет производить его очистку с помощью аффинной хроматографии на хитиновом сорбенте. Следует отметить, что хитиновый сорбент обладает низкой связывающей способностью по отношению к целевому белку (2 мг белка на 1 мл сорбента), выдерживает не более 5 циклов регенерации и не приспособлен для работы при средних и высоких скоростях элюции, что делает практически невозможным его использование в масштабировании стадии очистки белка.

Ранее мы показали, что если гибридный белок, содержащий интеин SspDnaB, получен в нерастворимой форме, для его очистки достаточно промыть тельца включения буферным раствором с детергентом Тритон X-100, и проведение аффинной хроматографии не требуется. Согласно разработанной нами ранее методике, раствор, содержащий солибализованный гибридный белок, разбавляют в 10 раз для снижения концентрации мочевины и снижают pH полученного раствора до значений, необходимых для расщепления гибридного белка [18, 20]. В случае с гибридным белком SspDnaB-PEDF(44–77) данная методика была несколько модифицирована в связи с тем, что изоточка этого белка составляет 7.39 и при закислении разбавленного раствора белка до pH 6.5–7.0, рекомендованного для расщепления гибридного белка, основная часть SspDnaB-



**Рис. 3.** 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, В – остаточный полипептид (интеин SspDnaB и хитин-связывающий домен).

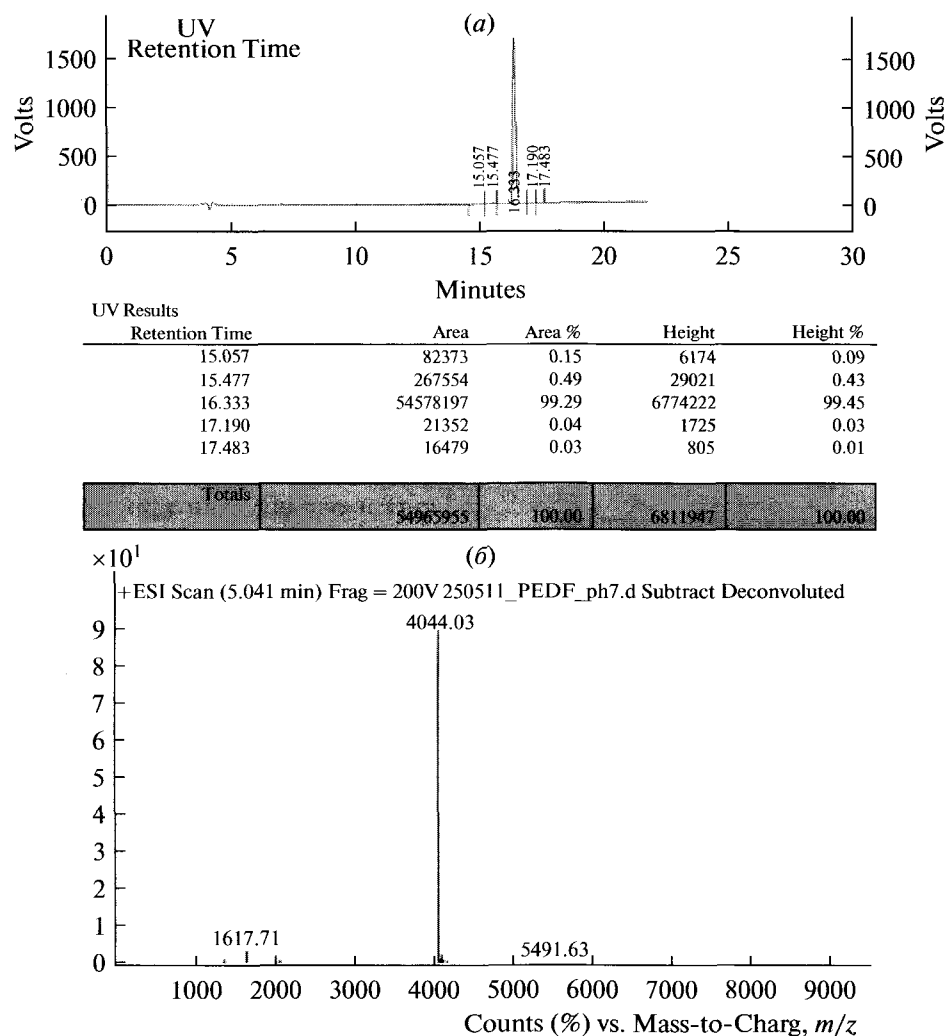


Рис. 4. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ очищенного пептида PEDF-(44–77). (а) Хроматографический профиль пептида. ВЭЖХ на колонке с сорбентом ProSphere C-18 300 А 5μ, градиент ацетонитрила (8–64%) в 0.1% TFA, скорость потока 0.75 мл/мин; (б) ESI-TOF-масс-спектр PEDF (44–77).

PEDF(44–77) выпадала в осадок. В связи с этим мы проводили снижение рН до необходимых значений (7.2–7.5) после экстрагирования гибридного белка буферным раствором, содержащим мочевины, но до разбавления полученного экстракта. Оптимизация условий расщепления позволила довести эффективность реакции до 77%. (Рис. 3).

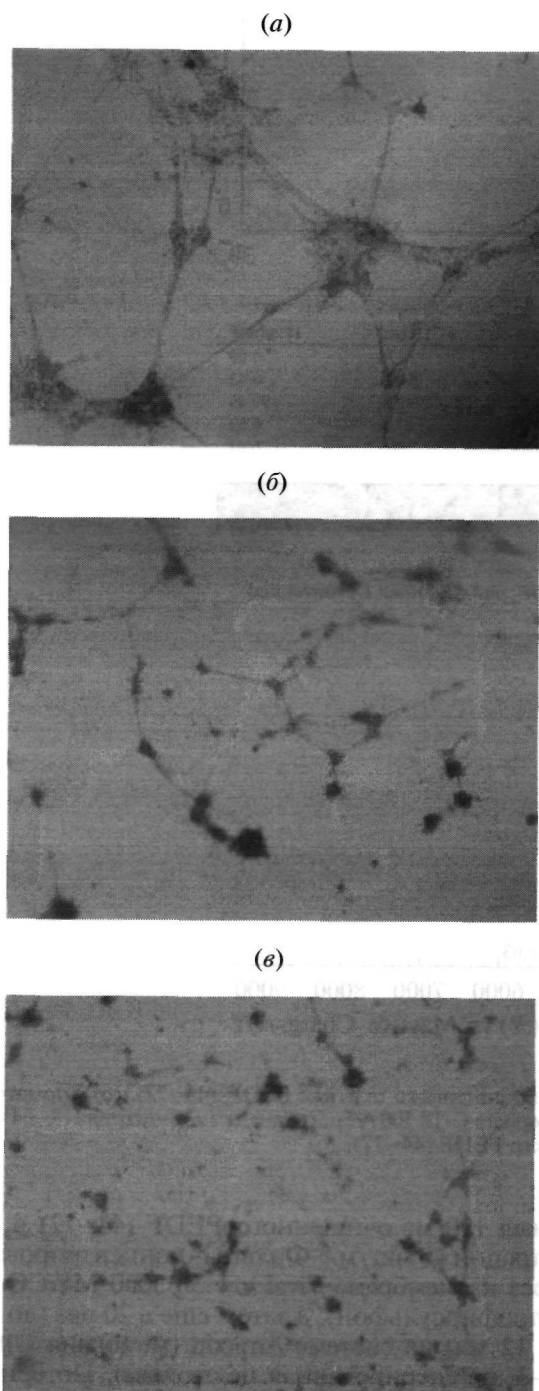
#### Очистка пептида PEDF-(44–77)

После завершения реакции автокаталитического расщепления выпавший в осадок белок (нерасщепившийся SspDnaB-PEDF(44–77)) отделяли фильтрованием на складчатом фильтре. Очистку PEDF-(44–77) от интеина проводили методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембраны VivaFlow 50 10 000 MWCO RC (регенерированная целлюлоза). Фильтрат со-

держал 190 мг очищенного PEDF-(44–77) в концентрации 40 мкг/мл. Фильтрат концентрировали в 20 раз на мембране VivaFlow 50 3000 MWCO PES (полиэфирсульфон), а затем еще в 20 раз (до объема 12 мл) на системе Amicon (мембрана Ultracel YM-3, регенерированная целлюлоза). Потери при концентрировании достигали 20% за счет неспецифического связывания пептида с мембраной.

На последней стадии PEDF-(44–77) очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 4а). Фракции, содержащие пептид чистотой более 99%, объединяли и высушивали. Выход целевого продукта составил 5.4 мг с 1 г влажных клеток (65 мг с 1 л культуры).

Основной пик в масс-спектре PEDF-(44–77) наблюдали при  $m/z$  4044.03 (рис. 4б), что соответствует теоретически рассчитанной массе пептида (4044.6 Да).



**Рис. 5.** Микрофотографии трубочко-подобных структур, образованных эндотелиальными клетками SVEC-4-10, полученных при инкубации с различными дозами препарата PEDF-(44-77). (а) Контроль, 0.1% FCS; (б) PEDF-(44-77) 10 нМ; (в) PEDF-(44-77) 1 нМ.

#### Биологическая активность фрагмента PEDF-(44-77) *in vitro*

Антиангиогенные свойства PEDF-(44-77) были изучены в диапазоне концентраций от 20 до 0.1 нМ [21]. Для изучения цитотоксического дей-

ствия препарата определяли выживаемость эндотелиальных клеток мыши SVEC4-10 после инкубации с пептидом в течение 48 ч. Исследование показало, что пептид в указанном диапазоне концентраций не обладает выраженным цитотоксическим действием. Выживаемость клеток была дозозависимой и составляла  $84 \pm 3\%$  при концентрации PEDF в лунке 20 нМ и достигала  $93 \pm 3\%$  при концентрации 1–0.1 нМ.

Исследование ингибирования bFGF-стимулированной пролиферации культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10 проводили с использованием модифицированного митогенного теста и красителя Crystal Violet. Эндотелиальные клетки инкубировали с пептидом в течение 6 сут (среду и исследуемый пептид меняли каждые 3 сут) и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Максимальное ингибирование пролиферации клеток наблюдалось при концентрации 1 нМ (47% от контроля).

Ингибирование образования трубочкоподобных структур (ТПС) также носило дозозависимый характер (рис. 5). При концентрации PEDF-(44-77) в лунке, равной 20 и 10 нМ не наблюдалось значимого ингибирования образования ТПС. Пептид в концентрации 1 и 0.1 нМ ингибировал образование ТПС в течение 24 ч после инкубации с препаратом. Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым PEDF обладает антиангиогенными свойствами только в низких концентрациях, в то время как высокие концентрации, напротив, стимулируют неоангиогенез, а средние дозы препарата не оказывают эффекта [22].

#### Биологическая активность PEDF-(44-77) *in vivo*

Антиангиогенную активность PEDF-(44-77) исследовали на модели неоваскуляризации роговицы кролика. Модель формировали путем прошивания роговицы с лимба викриловыми швами (8-0) [23]. PEDF-(44-77) вводили начиная с первого дня (день прошивания роговицы) эксперимента ежедневно под конъюнктиву в дозе 7.2 нг. Дозу препарата рассчитывали с учетом оптимальной концентрации пептида для подавления неоангиогенеза, выявленной при исследованиях *in vitro* (1 нМ). Делали по 10 субконъюнктивальных инъекций в каждый подопытный глаз. Клинически значимый антиангиогенный эффект PEDF-(44-77) регистрировали после 7 инъекций препарата (рис. 6б).

Таким образом, в данной работе представлен способ получения рекомбинантного антиангиогенного пептида PEDF-(44-77) с выходом до 65 мг с 1 л культуры. Предложенная методика предполагает одну хроматографическую стадию очистки, обладает потенциалом для масштабиро-



вания и позволяет экономически выгодно получать PEDF-(44–77) в количествах, необходимых для дальнейших биологических и клинических испытаний препарата.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис (трис(гидроксиметил)аминометан), хлорид натрия, хлорид кальция, гидроксид натрия, соляную кислоту, уксусную кислоту, этанол, ацетонитрил, глицерин, мочевину отечественного производства марки “ос.ч.” и “х.ч.”; акриламид, *N,N'*-метиленабисакриламид, персульфат аммония (Merck), АТФ, dNTP, бромфеноловый синий, оранжевый G, агарозу (Sigma), агар, дрожжевой экстракт, бакто-триптон, бакто-агар (Difco); TEMED, глицин (Reanal), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad), бромистый этидий, Тритон X-100, додецилсульфат натрия, EDTA, PMSF (Sigma).

**Создание штамма-продуцента ER2566/pTWIN-PEDF.** Искусственный ген PEDF-(44–77), оптимизированный по составу кодонов для экспрессии в *E. coli*, синтезировали из перекрывающихся олигонуклеотидов (рис. 1) и клонировали в предварительно линейаризованном по сайту *EcoRV* векторе pGEM5zf(–) (Promega) в соответствии с руководством [24]. Полученную плазмиду обрабатывали рестриктазами *SapI* и *BamHI* (New England Biolabs), выделяли фрагмент, несущий целевой ген, и лигировали его с рекомбинантным вектором pTWIN1 (New England Biolabs), расщепленным по тем же сайтам рестрикции. В результате получили экспрессионную плазмиду pTWIN-PEDF. В качестве штамма-носителя был использован штамм *E. coli* ER2566 [ $F^-$ ,  $\lambda^-$ , *fhuA2* (*lon*), *ompT*, *lacZ*::T7, *genI gal sulA11 Δ (mcrC-mrr)114::IS10 R (mcr-73::mini Tn10) 2 R(zgb-210::Tn 10)1 (Tet<sup>S</sup>) endA1 (dcm)*].

**Выделение и солюбилизация гибридного белка SspDnaB-PEDF.** Биомассу штамма ER2566/pTWIN-PEDF (24 г) ресуспендировали в 240 мл буфера А (50 мМ Трис-НСl, 5 мМ EDTA, 0.2% Тритон X-100, 0.2 % PMSF, pH 9.0) и лизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic® P (Sartorius) (цикл – 0.5 с, амплитуда – 60%) во льду в течение 30 мин. После дезинтеграции гомогенат центрифугировали (центрифуга HERMLE Z383K, 15000 g, +4°C) в течение 30 мин. Супернатант отбрасывали, тельца включения отмывали 240 мл буфера А, а затем 240 мл дистиллированной воды. Отмытые тельца включения (8 г) растворяли в 480 мл буфера В (50 мМ Трис-НСl, 5 мМ EDTA, 8.0 М мочевина, pH 9.0), нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием.

**Автокаталитическое расщепление гибридного белка и очистка PEDF-(44–77) с помощью ультрафильтрации.** Кислотность белкового экстракта

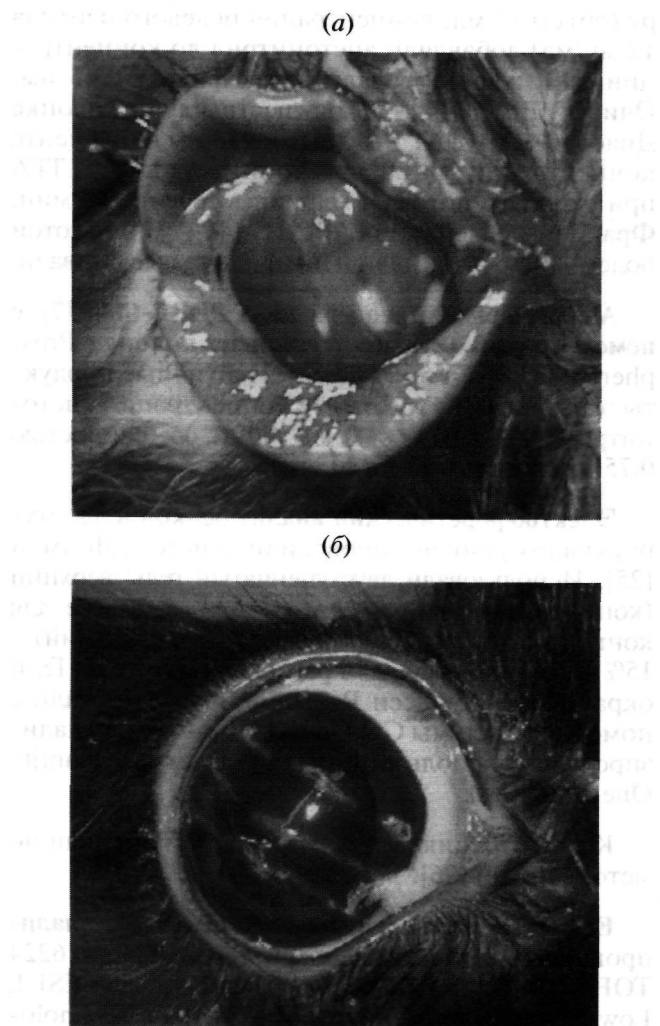


Рис. 6. Неоваскуляризация роговицы кролика, 7-й день. (а) Контрольный глаз; (б) глаз после 7 инъекций PEDF-(44–77).

доводили до значения pH 7.2 с помощью разбавленной HCl, затем экстракт разбавляли в 10 раз буфером Б (50 мМ Трис-НСl, 5 мМ EDTA, pH 7.2), и реакционную смесь инкубировали при 25°C в течение 12 ч. Выпавший в осадок белок отделяли фильтрованием на складчатом фильтре. Очистку PEDF-(44–77) от интеина осуществляли с помощью установки для тангенциальной ультрафильтрации (MasterFlex L/S (Cole Parmer), мембрана VivaFlow 50 10 000 MWCO RC). Фильтрат (4750 мл) содержал PEDF(44–77) в концентрации 40 мкг/мл.

**Концентрирование раствора, содержащего PEDF-(44–77), и очистка пептида с помощью ВЭЖХ.** Фильтрат, содержащий PEDF-(44–77), концентрировали в 20 раз на установке MasterFlex L/S с мембраной VivaFlow 50 3 000 PES, а затем еще в 20 раз на приборе для ультрафильтрации Amicon (мембрана YM-3). К полученному раство-

ру (объем 12 мл, концентрация целевого пептида 12 мг/мл) добавляли ацетонитрил до концентрации 10% и фильтровали через фильтр 0.45 мкм. Очистку PEDF-(44–77) осуществляли на колонке Диасорб-130-С16Т 7 мкм, 16 × 250 мм в градиенте концентрации 30–60% ацетонитрила в 0.1% TFA при скорости потока 4 мл/мин в течение 60 мин. Фракции, содержащие PEDF-(44–77) чистотой более 98%, объединяли и лиофильно высушивали.

**Анализ фракций, содержащих PEDF-(44–77), с помощью офВЭЖХ** проводили на колонке Prosphere C-18 300 А 5μ (Alltech). Пептидные продукты элюировали в градиенте концентрации ацетонитрила (8–64%) в 0.1% TFA со скоростью 0.75 мл/мин в течение 20 мин.

**Электрофоретический анализ** белков в денатурирующих условиях проводили в системе Леммли [25]. Использовали двухступенчатый гель: верхний (концентрирующий) – 3.5% ПААГ в буфере для концентрирующего геля, нижний (разделяющий) – 15% ПААГ в буфере для разделяющего геля. Гели окрашивали Кумасси R-250, фотографировали с помощью системы Gel Doc XR (Bio-Rad) и анализировали с использованием программы Quantity One (Bio-Rad).

Концентрацию белка в растворах измеряли по методу Лоури [26].

**ESI-TOF-масс-спектрометрический анализ** производили с помощью системы Agilent 6224 TOF LC/MS. Для калибровки использовали ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies), молекулярные массы определяли в режиме детектирования положительно заряженных ионов.

**Антиангиогенную активность *in vitro*** определяли с помощью стандартных тестов, описанных в работе [27]. Использовали клеточную культуру SVEC 4-10, полученную из регионарных лимфатических узлов мышей С3Н/HeJ (H-2<sup>k</sup>), трансформированных множественным инфицированием вирусом SV40 [28].

**Антиангиогенную активность *in vivo*** определяли с использованием модели неоваскуляризации роговицы кролика [29]. Модель формировали на двух глазах трех кроликов (6 глаз) породы шиншилла (половозрелые самцы, весом 2.5–3 кг). В качестве контроля служили правые глаза животных (3 глаза), опытным был левый глаз (3 глаза). Животных в эксперименте лечили в соответствии с Резолюцией ARVO “По использованию животных в экспериментальных исследованиях”, “Принципами лечения лабораторных животных” (публикация № 86-23 в NIH от 1985 года) и действующими правилами GMP (Good Medical Practice).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tombran-Tink J., Chader G.G., Johnson L.V. // Exp. Eye Res. 1991. V. 53. P. 411–414.
2. Filleur S., Nelius T., de Riese W., Kennedy R.C. // J. Cell Biochem. 2009. V. 106. P. 769–775.
3. Zhang S.X., Wang J.J., Gao G., Shao C., Mott R., Ma J.X. // FASEB J. 2006. V. 20. P. 323–325.
4. Ek E.T., Dass C.R., Choong P.F. // Trends Mol. Med. 2006. V. 12. P. 497–502.
5. Stellmach V., Crawford S.E., Zhou W., Bouck N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 2593–2597.
6. Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., Crawford S.E., Xu H., Benedict W., Bouck, N.P. // Science. 1999. V. 285. P. 245–248.
7. Zhang S.X., Wang J.J., Gao G., Parke K., Ma J.X. // J. Mol. Endocrinol. 2006. V. 37. P. 1–12.
8. Patel J.I., Tombran-Tink J., Hykin P.G., Gregor Z.J., Cree I.A. // Exp. Eye Res. 2006. V. 82. P. 798–806.
9. Spranger J., Osterhoff M., Reimann M., Mohlig M., Ristow M., Francis M.K., Cristofalo V., Hammes H.P., Smith G., Boulton M., Pfeiffer A.F. // Diabetes. 2001. V. 50. P. 2641–2645.
10. Boehm B.O., Lang G., Volpert O., Jehle P.M., Kurkhaus A., Rosinger S., Lang G.K., Bouck N. // Diabetologia. 2003. V. 46. P. 394–400.
11. Campochiaro P.A., Nguyen Q.D., Shah S.M., Klein M.L., Holz E., Frank R.N., Saperstein D.A., Gupta A., Stout J.T., Macko J., DiBartolomeo R., Wei L.L. // Hum. Gene Ther. 2006. V. 17. P. 167–176.
12. Filleur S., Volz K., Nelius T., Mirochnik Y., Huang H., Zaichuk T.A., Aymerich M.S., Becerra S.P., Yap R., Veliceasa D., Shroff E.H., Volpert O.V. // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 5144–5152.
13. Amaral J., Becerra S.P. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2010. V. 51. P. 1318–1326.
14. Alberdi E., Aymerich M.S., Becerra S.P. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 31605–31612.
15. Gong Q., Yang X., Cai W., Gao G., Yang Z. // Protein J. 2010. V. 29. P. 167–173.
16. Fong B.A., Wu W.Y., Wood D.W. // Trends Biotechnol. 2010. V. 28. P. 272–279.
17. Walker J.R., Altman R.K., Warren J.W., Altman E. // J. Peptide Res. 2003. V. 62. P. 214–226.
18. Esipov R.S., Stepanenko V.N., Gurevich A.I., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. // Protein Pept. Lett. 2006. V. 13. P. 343–347.
19. Esipov R.S., Stepanenko V.N., Chupova L.A., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Miroshnikov A.I. // Protein Expr. Purif. 2008. V. 61. P. 1–6.
20. Stepanenko V.N., Esipov R.S., Gurevich A.I., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. // Bioorg. Khim. 2007. V. 33. P. 245–250.
21. Мирошников А.И., Лухванцева В.Г., Степанова Е.В., Арутюнян Е.В., Осипов Р.А., Бейрахова К.А., Степаненко В.Н., Белоус О.В. // Офтальмохирургия. 2011. № 1. С. 76–82.
22. Apte R.S., Barreiro R.A., Duh E., Volpert O., Ferguson T.A. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004. V. 45. P. 4491–4497.

23. Montezuma S.R., Vavvas D., Miller J.W. // *Semin. Ophthalmol.* 2009. V. 24. P. 52–61.
24. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory Manual. Second Ed.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
25. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
26. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.
27. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Личиницер М.Р., Барышников А.Ю. // *Рос. биотер. журн.* 2007. Т. 6. С. 3–7.
28. O'Connell K., Edidin M. // *J. Immunol.* 1990. V. 144. P. 521–525.
29. Копеева В.Г., Андреев Ю.В., Ронкина Т.И., Кишкина В.Я., Качалина Г.Ф., Васин В.И., Пономарев Г.В., Кирилова Г.Н., Ковтун В.Ю. // *Офтальмохирургия.* 1993. № 3. С. 50–57.

## Recombinant Fragment of Pigment Epithelium–Derived Factor (44–77) Prevents Pathological Corneal Neovascularization

R. S. Esipov<sup>##</sup>, K. A. Beyrakhova<sup>\*</sup>, L. A. Chupova<sup>\*</sup>, V. G. Likhvantseva<sup>\*\*</sup>,  
E. V. Stepanova<sup>\*\*\*</sup>, and A. I. Miroshnikov<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 336-68-33; fax: +7 (495) 330-74-10; e-mail: esipov@ibch.ru

<sup>\*</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*</sup>Central Clinical Hospital, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>\*\*\*</sup>Blokhin Russian Cancer Research Center of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Pigment epithelium-derived factor (PEDF), a 50 kDa secreted glycoprotein, is among the most potent endogenous inhibitors of angiogenesis. PEDF-derived fragment (44–77) possesses antiangiogenic properties of the full-sized protein and is a potential drug candidate for the treatment of ocular neovascular diseases.

In this study we propose an efficient scalable biotechnological method for the production of PEDF (44–77) as part of a fusion protein with *SspDnaB* intein. The fusion protein was obtained in bacterial *E. coli* cells in the form of inclusion bodies, solubilized and subjected to autocatalytic cleavage with the release of PEDF (44–77) (yield, 77%). The target peptide was separated from the intein using tangential ultrafiltration. The final purification of PEDF (44–77) was performed by reversed-phase HPLC. The yield of the target peptide (purity, 99%) was 65 mg per 1 liter of culture.

Antiangiogenic activity of the obtained peptide was studied *in vitro* using murine endothelial cells SVEC-4-10. PEDF (44–77) suppressed proliferation of endothelial cells by 53% and inhibited endothelial cell tube formation at the concentration of 1 nM. The ability of the recombinant PEDF (44–77) to block initial stages of angiogenesis was demonstrated using the model of rabbit corneal neovascularization.

**Keywords:** PEDF, recombinant protein, anti-angiogenic peptide, neovascularization.