

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ *IN VIVO* ДЛЯ ПОИСКА ПЕПТИДОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С АДЕНОКАРЦИНОМОЙ ЛЁГКИХ

^{*,**}Боргоякова М.Б., ^{***}Каледин В.И., ^{***}Николин В.П.,

^{**,***}Попова Н.А., ^{**,**}Ильичев А.А.

^{*}630559, НСО, п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

^{**}630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2, Новосибирский государственный университет,

^{***}630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10, ИЦиГ СО РАН

Фаговые пептидные библиотеки (ФПБ) часто используются в качестве источников пептидов, связывающихся с опухолями. Мишенью для отбора пептидов могут выступать очищенные опухолевые антигены, культуры клеток или перевиваемые опухоли [3]. В настоящее время идентифицировано большое количество пептидов, имеющих повышенную тропность к раковым клеткам [1, 2, 3, 13, 17, 19, 21, 23, 24]. Было показано, что фаги, несущие такие пептиды в составе минорного белка рIII, при внутривенном введении скапливаются в опухоли. Исследования были проведены как на чисто мышиных моделях [4, 6], так и на моделях перевиваемых опухолей человека [1, 11] и даже на онкологических больных [8].

Практическое применение опухоль-адресованных пептидов, отобранных из комбинаторных фаговых библиотек, довольно разнообразно. Некоторые из них сами по себе проявляют противоопухолевое действие, например, пептид LuP-1, который оказался специфичен к опухолевой лимфатической системе и при введении мышам с опухолью молочной железы приводил к ингибированию её роста и сокращению числа лимфатических сосудов [10]. В ряде работ показано, что конъюгирование с пептидами химиотерапевтических агентов, таких как доксорубин, повышает их эффективность и снижает токсичность [1, 18]. При этом конъюгация может быть осуществлена непосредственно с агентом, или пептид может быть введен в состав наружной мембраны липосом и других наночастиц, транспортирующих терапевтическое средство к мишени [5, 9, 12, 14], а также в состав оболочки вирусного вектора, используемого для генной терапии [15]. Кроме того в целях диагностики можно конъюгировать опухоль-адресованные пептиды контрастирующими или флуоресцентными агентами, что позволяет локализовать опухоли и метастазы [16, 22, 24].

Таким образом, пептиды, отобранные из фаговых пептидных библиотек, связывающиеся с опухолями, являются перспективными кандидатами в адресные молекулы, способные повысить специфичность химиотерапевтических препаратов и диагностических агентов к опухоли. Цель данной работы заключалась в *in vivo* селекции пептидов, связывающихся с аденокарциномой лёгкого (или её стромой), а также в проверке способности специфичности отобранных пептидов адресно связываться с опухолью.

Материалы и методы.

Животные, опухоли. В работе использовали мышей линии A/Sn разведения Института цитологии и генетики СО РАН, а также опухоли аденокарциному лёгкого (AL) и гепатому (HA) [7]. Асцитные опухолевые клетки перевивали подкожно концентрацией $\sim 10^6$ клеток/мл, работа проводилась на животных, когда опухолевые узлы достигали 5-8 мм в диаметре.

Фаговая пептидная библиотека. В работе использовали штамм *Escherichia coli* ER2738 и фаговые пептидные библиотеки Ph.D.-12TM и Ph.D.-7TM фирмы New England Biolabs,

Inc. на основе нитчатых бактериофагов. Библиотеки содержали пептидные встройки длиной 12 и 7 аминокислотных остатков в составе минорного белка рIII. В качестве контрольного фага использовался фаг mp9 [25].

Аффинная селекция пептидов, специфически взаимодействующих с опухолью, проводилась с использованием метода селекции *in vivo*, описанного ранее [1] с модификациями. Фаговую пептидную библиотеку разводили до концентрации 10^{11} БОЕ/мл в физиологическом растворе и вводили мышам с солидными узлами AL в хвостовую вену в объёме 0,5 мл, после чего вводили животным наркоз. Через 5 минут вскрывали грудную клетку и перфузировали через сердце 10 мл охлажденного раствора Рингера. Опухоли извлекали, взвешивали и гомогенизировали в 1 мл физраствора, содержащего 1 мМ ингибитора протеаз фенилметилсульфонилфлюорида, трижды отмывали физраствором, содержащим 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Инкубировали 20 минут с 1 мл компетентной культуры ER2738 при температуре 37°C на термошейкере. Затем центрифугировали 5 минут при 10000 об/мин, супернатант добавляли в 20 мл компетентной культуры и инкубировали 4,5 часа при температуре 37°C на термошейкере. Полученную смесь фагов очищали и использовали для следующего раунда селекции. После третьего и четвертого раунда фаги не амплифицировали. Их высевали на чашки Петри, после чего выделяли индивидуальные фаговые клоны, ДНК которых была подготовлена к секвенированию, как описано в инструкции к набору фаговых пептидных библиотек.

Секвенирование проводили на автоматическом капиллярном секвенаторе в ЦКП СО РАН «Геномика». Обработка результатов секвенирования проводилась в программах ClustalW и EMBOSS Transeq.

Анализ распределения отобранных фагов по органам проводился после введения животным 0,5 мл фагового раствора концентрацией 10^9 БОЕ/мл и 24-часовой инкубации. Мышей забивали, извлекали опухоли и лёгкие, взвешивали, гомогенизировали, отмывали в БСА, инкубировали 5 минут с глициновым буфером (рН 2.2) для элюирования связавшихся фагов, нейтрализовали кислую среду 1М раствором триса (рН 9.1). После центрифугирования супернатант отбирали и определяли в нем концентрацию фагов методом агаровых слоев. Распределение каждого фагового клона было оценено после опыта на 3 мышах.

Анализ связывания отобранных фагов с асцитными клетками AL проводился в тех же условиях, что и анализ связывания с тканями. Количество опухолевых клеток при анализе было 10^6 . Инкубацию с 10^9 БОЕ проводили в течение 5 минут, а затем обрабатывали, как указано выше.

Результаты и обсуждение.

После трёх раундов аффинной селекции 12-мерной ФПБ из неамплифицированного элюата последнего раунда для секвенирования был отобран 31 фаговый клон, из числа которых два были выбраны для дальнейшего исследования: со встройками TAAPVPKGPVSP и MQAAUTPPLGSL (для простоты обозначим их 12-1 и 12-2, соответственно). После третьего и четвертого раундов аффинной селекции 7-мерной ФПБ были определены последовательности 90 фагов, из которых 5 были выбраны для дальнейшей работы: со встройками TPWPRLN, GNTPSRA, HAIYPRH, STASYTR, STPQTPR (7-1, 7-2, 7-3, 7-8, 7-9). Основным критерием выбора была частота встречаемости встройки среди фагов третьего и четвертого раундов, а также предварительный анализ распределения фагов по организму (данные не приведены).

Анализ распределения выбранных фагов в мышах-носителях AL показал спустя 24 часа после их введения, что разница в накоплении изучаемых фагов в опухоли и лёгких, взятых в качестве контрольного органа, составляет от нескольких десятков до нескольких сотен раз (рис. 1). Контрольный фаг без встройки показал разницу лишь в 4 раза.

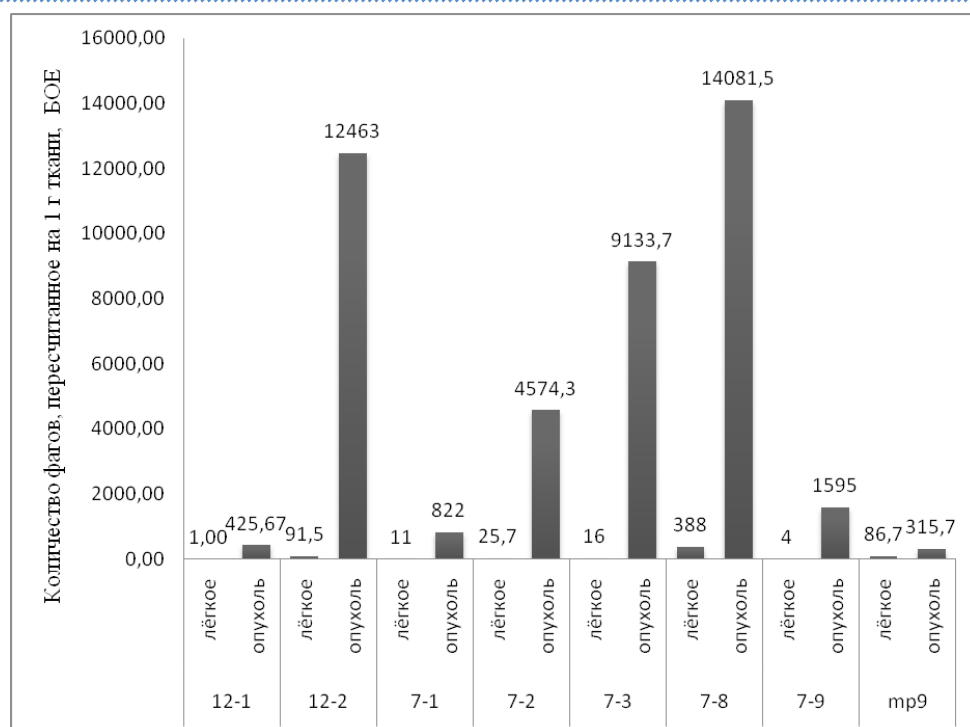


Рис. 1 - График, отражающий распределение фаговых клонов по тканям и органам спустя 24 часа после введения их в организм мыши-носителя AL.

Считается, что 5-минутная экспозиция фаговых библиотек в организме приводит к отбору фагов, связывающихся с растущими сосудами опухоли, которые значительно отличаются по морфологическим и антигенным характеристикам от сформированных сосудов взрослого человека [20]. Мы исследовали также способность некоторых фагов связываться с другой солидной опухолью – гепатомой. В данном эксперименте мышам перевивали сразу две опухоли (AL и HA) – под кожу правого и левого бёдер. Результат представлен на рис. 2. Из графика видно, что в опухолях происходит гораздо большее скапливание исследуемых фагов по сравнению с контрольным (соотношение такое же, как и при введении фагов мышам с одной перевитой опухолью).

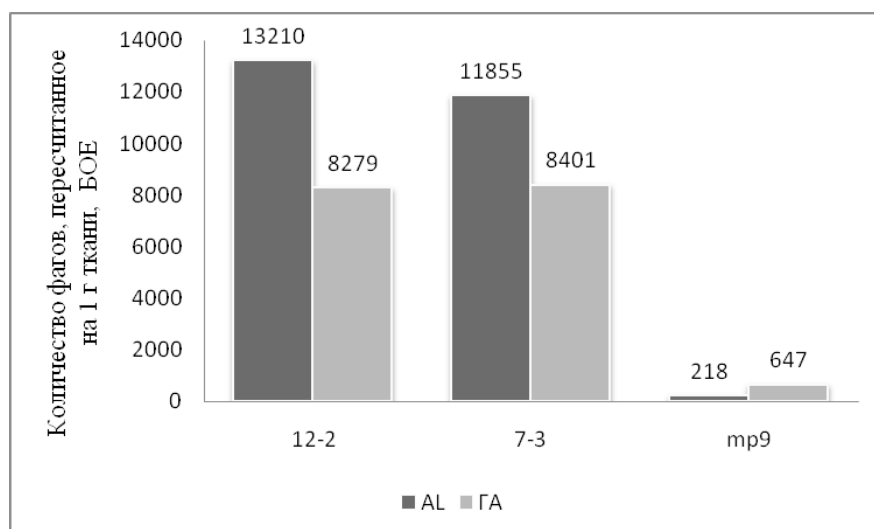


Рис. 2 - График, отражающий связывание фагов 12-2, 7-3 и контрольного фага с разными солидными опухолями: AL и HA.

Анализ взаимодействия отобранных фаговых клонов с асцитными клетками AL показал, что связывание клонов не специфическое и не зависит от наличия встройки (рис. 3). Для удобства сравнения приведены десятичные логарифмы данных. На графике видно, что ни один фаг не связывается с клетками больше, чем в 6 раз, по сравнению с контрольным фагом.

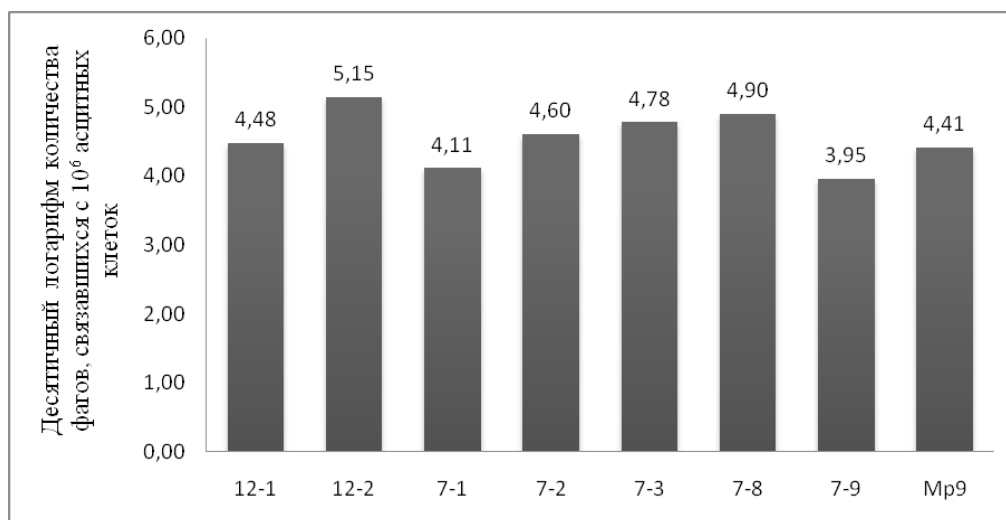


Рис. 3 - График, отражающий связывание фаговых клонов с асцитными клетками AL.

Таким образом, из 12-мерной и 7-мерной фаговых пептидных библиотек с помощью *in vivo* селекции были отобраны фаговые клоны, которые при внутривенном введении мышам-опухоленосителям накапливались в опухоли в несколько десятков и сотен раз больше, чем в контрольных органах. Отсутствие специфического связывания фагов с клетками опухоли *in vitro*, а также наличие связывания с разными опухолями *in vivo* позволяют предположить, что исследуемые фаги отобраны, скорее всего, на новообразующиеся кровеносные сосуды.

Библиографический список

1. Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model // Science. – 1998. – Vol. 279, N 5349. – P. 377-80.
2. Beck S., Jin X., Yin J., et al. Identification of peptide that interacts with Nestin protein expressed in brain cancer stem cells // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, N 33. – P. 8518-28.
3. Brown K.C. Peptidic tumor targeting agents: the road from phage display peptide selections to clinical applications // Curr Pharm Des. – 2010. – Vol. 16, N 9. – P. 1040-54.
4. Eriksson F., Culp W., Massey R., et al. Tumor specific phage particles promote tumor regression in a mouse melanoma model // Cancer Immunol Immunother. – 2007. – Vol. 56, N 5. – P. 677-87.
5. Holig P., Bach M., Volkel T., et al. Novel RGD lipopeptides for the targeting of liposomes to integrin-expressing endothelial and melanoma cells // Protein Eng Des Sel. – 2004. – Vol. 17, N 5. – P. 433-41.
6. Joyce J., Laakkonen P., Bernasconi M., et al. Stage-specific vascular markers revealed by phage display in a mouse model of pancreatic islet tumorigenesis // Cancer Cell. – 2003. – Vol. 4, N 5. – P.393-403.
7. Kaledin V.I., Matienko N.A., Nikolin V.P., et al. Intralymphatic administration of liposome-encapsulated drugs to mice: possibility for suppression of the growth of tumor metastases in the lymph nodes // J Natl Cancer Inst. – 1981. – Vol. 66, N 5. – P. 881-7.

8. Krag D.N., Shukla G.S., Shen G.P., et al. Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, N 15. – P. 7724-33.
9. Krumpel L.R., Mori T. The use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs // *Int J Pept Res Ther.* – 2006. – Vol. 12, N 1. – P. 79-91.
10. Laakkonen P., Akerman M.E., Biliran H., et al. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. – Vol. 101, N 25. – P. 9381-6.
11. Lee T.Y., Lin C.T., Kuo S.Y., et al. Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67, N 22. – P. 10958-65.
12. Lee T.Y., Wu H.C., Tseng Y.L., Lin C.T. A Novel Peptide Specifically Binding to Nasopharyngeal Carcinoma For Targeted Drug Delivery // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, N 21. – P. 8002-8.
13. Liu J., Chen H.C., Rao Z.Z., et al. Identification of heptapeptides interacting with IFN- α -sensitive CML cells // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2011. – Vol. 20, N 12. – P. 1583-9.
14. Loi M., Marchio S., Becherini P., et al. Combined targeting of perivascular and endothelial tumor cells enhances anti-tumor efficacy of liposomal chemotherapy in neuroblastoma // *J Control Release.* – 2010. – Vol. 145, N 1. – P. 66-73.
15. Michelfelder S., Trepel M. Adeno-associated viral vectors and their redirection to cell-type specific receptors // *Adv Genet.* – 2009. – Vol. 67. – P. 29-60.
16. Miller S.J., Joshi B.P., Feng Y., et al. In vivo fluorescence-based endoscopic detection of colon dysplasia in the mouse using a novel peptide probe // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, N 3, e17384.
17. Pasqualini R., Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries // *Nature.* – 1996. – Vol. 380, N 6572. – P. 364-6.
18. Passarella R.J., Spratt D.E., van der Ende A.E., et al. Targeted nanoparticles that deliver a sustained, specific release of Paclitaxel to irradiated tumors // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70, N 11. – P. 4550-9.
19. Rivinoja A., Laakkonen P. Identification of homing peptides using the in vivo phage display technology // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 683. – P. 401-15.
20. Ruoslahti E. Specialization of tumor vasculature // *Nat Rev Cancer.* – Vol. 2, N 2. – P. 83-90.
21. Tu X., Zhuang J., Wang W., et al. Screening and identification of a renal carcinoma specific peptide from a phage display peptide library // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2011. – Vol. 30. – P. 105-10.
22. Wu C.C., Lin E.H., Lee Y.C., et al. Identification of a new peptide for fibrosarcoma tumor targeting and imaging in vivo // *J Biomed Biotechnol.* – 2010. – Vol. 2010. Id 167045.
23. Zhang W.J., Sui Y.X., Budha A., et al. Affinity peptide developed by phage display selection for targeting gastric cancer // *World J Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 18, N 17. – P. 2053-60.
24. Zitzmann S., Mier W., Schad A., et al. A New Prostate Carcinoma Binding Peptide (DUP-1) for Tumor Imaging and Therapy // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, N 1. – P. 139-46.
25. Петренко В.А., Семенова Л.Н., Киприянов С.М. и др. Производные ДНК фага М13, содержащие фрагмент гена β -галактозидазы, - удобная мутационная система для исследования направленного олигонуклеотидами мутагенеза // *Биоорганическая химия.* – 1986. – Т. 12, № 12. – Стр. 1612-24.