

# Сравнительный анализ активности лактаптина, полученного в про- и эукариотических системах экспрессии

О.А. Коваль<sup>1,2</sup>, О.Ю. Волкова<sup>3</sup>, А.А. Горчаков<sup>2,3</sup>, С.В. Кулемзин<sup>3</sup>, А.В. Ткаченко<sup>1</sup>, А.А. Нуштаева<sup>1</sup>, Е.В. Кулигина<sup>1</sup>, В.А. Рихтер<sup>1</sup>, А.В. Таранин<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Несмотря на множество цитостатических противораковых агентов, имеющихся в арсенале онкологов в настоящее время, все эти препараты обладают значительными побочными эффектами, что может ограничивать их использование для некоторых пациентов. В связи с этим создание новых противораковых препаратов на основе селективных индукторов апоптоза, способных подавлять рост опухоли без повреждения здоровых клеток организма, – актуальная задача молекулярной медицины. Ранее было показано, что белок лактаптин, фрагмент частичного протеолиза каппа-казеина из молока человека, индуцирует гибель раковых клеток в культуре, а его генно-инженерный аналог (RL2), продуцируемый в клетках *E. coli*, вызывает торможение роста солидных опухолей. Так как лактаптин является фрагментом человеческого белка, он не иммуногенен и может применяться многократно без риска индукции специфического иммунного ответа, снижающего эффективность терапии. Мы обнаружили, что рекомбинантный аналог лактаптина в комбинации с циклофосфамидом оказывает аддитивный противоопухолевый эффект. Целью настоящей работы было создание рекомбинантного лактаптина с повышенной цитотоксической активностью за счет его продукции в эукариотических клетках. На основе лентивирусного вектора серии pCDH созданы конструкции pEL1 и pEL2, которые обеспечивают стабильную интеграцию кассет, кодирующих секреторируемые формы лактаптина EL1 и EL2, отличающиеся лидерными последовательностями. Продукция целевых белков подтверждена методом Вестерн-блота; количество продуцируемого белка оценивали методом иммуноферментного анализа. Цитотоксическая активность кондиционированной среды от клеток HEK293T, трансфицированных препаратом плазмиды pEL1, проанализирована в отношении панели опухолевых клеток человека: аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231, рака простаты PC3 и глиобластомы T98G. Обнаружено, что цитотоксическая активность рекомбинантного аналога лактаптина EL1 превышает цитотоксическую активность RL2 более чем в 100 раз. Таким образом, полученные данные позволяют переходить к использованию иммунных клеток в качестве доставщиков лактаптина к раковым клеткам для клеточной терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: лактаптин; проапоптотические белки; противоопухолевая терапия; лентивирусные конструкции.

## Comparative analysis of lactaptin activity when produced in bacterial or eukaryotic expression systems

O.A. Koval<sup>1,2</sup>, O.Y. Volkova<sup>3</sup>, A.A. Gorchakov<sup>2,3</sup>, S.V. Kulemzin<sup>3</sup>, A.V. Tkachenko<sup>1</sup>, A.A. Nushtaeva<sup>1</sup>, E.V. Kuligina<sup>1</sup>, V.A. Richter<sup>1</sup>, A.V. Taranin<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, Russia

Despite the multitude of anticancer cytostatic drugs available to oncologists today, most of such drugs have serious side effects that may preclude their use in some groups of patients. Hence, selective induction of apoptosis in cancer but not normal cells remains an attractive goal of molecular medicine. Lactaptin, a proteolytic fragment of the human milk kappa-casein, has been previously identified as a protein displaying potent killing of cancer cells *in vitro*. Its recombinant analog (RL2) produced in *E. coli* has been shown to delay solid tumor growth *in vivo*. Given that lactaptin is of human origin and is not immunogenic, it can be administered to patients multiple times without running the risk of immune response that could dampen the therapy efficacy. In the present study, we demonstrate that the combination of RL2 and cyclophosphamide treatments has an additive therapeutic effect against hepatoma tumor in immunocompetent mice. We asked whether production of lactaptin in human rather than bacterial cells would result in a protein with increased cytotoxic activity. Using lentiviral vector pCDH as a backbone, two constructs, pEL1 and pEL2, encoding secreted forms of lactaptin that differ in their signal sequences were created. Lactaptin expression in human cell lines was confirmed using Western-blot analysis, whereas ELISA was used for quantification of secreted lactaptin. Next, we measured the cytotoxic effects of the media conditioned by pEL1-transfected HEK293T cells, as assayed against the panel of three human cancer cell lines: MDA-MB-231 (adenocarcinoma), PC3 (prostate cancer), and T98G (glioblastoma). We show that EL1-derived lactaptin is at least 100-fold

Received 18.10.2017

Accepted for publication 09.11.2017

© AUTHORS, 2017

O.A. Koval and O.Y. Volkova equal contribution to manuscript preparation.

e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

more cytotoxic than RL2. Taken together, our results provide an opportunity for developing armored immune cells as an “off-the-shelf” platform for targeted delivery of lactaptin to cancer cells.

Key words: lactaptin; proapoptotic proteins; antitumor therapy; lentiviral expression constructs.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Коваль О.А., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., Ткаченко А.В., Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Сравнительный анализ активности лактаптина, полученного в про- и эукариотических системах экспрессии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):764-769. DOI 10.18699/VJ17.292

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Koval O.A., Volkova O.Y., Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Tkachenko A.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Richter V.A., Taranin A.V. Comparative analysis of lactaptin activity when produced in bacterial or eukaryotic expression systems. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):764-769. DOI 10.18699/VJ17.292 (in Russian)

Многие цитостатические средства, используемые в терапии онкологических заболеваний, обладают очень широким диапазоном разрушающего действия, причем не только в отношении целевой опухоли, но и против здоровых тканей. Одним из возможных дополнений к высокотоксичным химиотерапевтическим препаратам, позволяющим снизить их эффективную дозу и, соответственно, общую токсичность без потери противоопухолевого эффекта, может быть использование апоптоз-индуцирующих белковых препаратов. Возможность индукции апоптоза раковых клеток белковыми факторами, специфичными к клеткам опухоли, положена в основу создания ряда современных противораковых фармакологических средств. Например, препараты на основе фактора некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ) и его лигандов – FasL и TNF-зависимого апоптоз-индуцирующего лиганда (TRAIL) – уже применяли в клинических исследованиях для терапии злокачественных опухолей человека (Nagane et al., 2001; Merino et al., 2007). На основе природного белка лактаптина, выделенного из молока человека и обладающего цитотоксической активностью в отношении ряда опухолевых клеток человека, сконструирован его рекомбинантный аналог RL2 для продукции в клетках *Escherichia coli*. При исследовании механизма цитотоксического действия RL2 показано, что гибель клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231, индуцируемая действием RL2, проходит по механизму апоптоза (Semenov et al., 2010). Исследование активности рекомбинантного лактаптина RL2 *in vivo* также свидетельствовало о его противоопухолевой активности в отношении опухолей мыши и человека (Koval et al., 2012, 2014). Тем не менее при системном введении RL2 животным трудно достичь его высокой концентрации в опухоли, поскольку время его полувыведения из кровотока составляет 0.26 ч (Бондаренко и др., 2015). Этот факт, безусловно, ограничивает возможности применения RL2 и требует развития подходов, позволяющих увеличить как его время полужизни, так и локальную концентрацию в опухоли. Возможным решением этой задачи может быть создание генно-инженерных конструкций, обеспечивающих продукцию лактаптина в эукариотических клетках, резистентных к его проапоптотическому действию. В перспективе такие конструкции можно будет использовать в иммунотерапии рака для «армирования» иммунных клеток человека с целью усиления их цитотоксической активности (Kakarla, Gottschalk, 2014; Song et al., 2016).

Противоопухолевые агенты на основе таких клеток сочетают в себе оптимизированное биораспределение и высокую цитотоксическую активность, что позволяет считать их достаточно универсальными для широких групп онкологических больных (Кулемзин, 2017а).

В настоящей работе созданы генно-инженерные конструкции, обеспечивающие продукцию рекомбинантного лактаптина в клетках эукариот. Рекомбинантный лактаптин, секретируемый в среду трансфицированными клетками, обладал значительно большей цитотоксической активностью, чем лактаптин, полученный из клеток *E. coli*.

#### Материалы и методы

Рекомбинантный аналог лактаптина RL2 получен и очищен по методике, описанной ранее (Semenov et al., 2010).

**Линии клеток и животные.** Эксперименты на мышах проводили согласно рекомендациям по использованию лабораторных животных (ECC Directive 86/609/EEC). Самки мышей A/J (6–8 нед) получены из SPF-вивария ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск, Россия). Животных содержали в условиях естественного освещения, они имели свободный доступ к пище и воде.

Клетки MDA-MB-231 и T98G получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия); клетки линий PC3 и HEK293T приобретены в ATCC (США). Клетки гепатомы GA1 мыши любезно предоставлены сотрудником Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН В.И. Калединым.

**Трансплантация опухолевых клеток и лечение мышей.** Самкам мышей линии A/J интраперитонеально были трансплантированы клетки гепатомы A1 ( $2 \times 10^6$  клеток/мышь). Через 24 ч после трансплантации опухолевых клеток животным раз в два дня интраперитонеально вводили препарат RL2 (20 мг/кг) и/или внутривенно циклофосфамид (30 мг/кг) курсом из пяти инъекций. Экспериментальные и контрольная группы содержали по восемь животных в каждой группе.

**Создание конструкций для экспрессии секретируемой формы лактаптина в культуре клеток человека.** Последовательность ДНК, кодирующая фьюжн-белок лактаптин-6His (RL2), была заимствована из плазмиды pVGF-FR2-PE/L-Pat. С использованием праймеров lactap\_AgeF 5'-gcaccggtatgaaccagaacaaccagca-3' и U30R 5'-atgacgtgtagtgtttgggt-3' на матрице pVGF-FR2-PE/L-Pat проведена ПЦП; полученный продукт гидролизован по

сайтам *AgeI* и *EcoRI*, фланкирующим ORF RL2. Лигирование данного ДНК-фрагмента (~370 п. н.) с гидролизованной по этим же сайтам ДНК векторов pCDH-EF1a-GaussiaSP-MCS-IRES-copGFP и pCDH-EF1a-mIlgk-MCS-IRES-copGFP (Кулемзин, 2017б) позволило получить искомые лентивирусные конструкции pCDH-EF1a-GaussiaSP-lact-6His-IRES-copGFP и pCDH-EF1a-mIlgk-lact-6His-IRES-copGFP (далее pEL-1 и pEL-2 соответственно).

**Наработка лактаптина в линии клеток человека HEK293T при помощи транзитной трансфекции.** Клетки линии HEK293T культивировали в среде IMDM (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с 10 % фетальной сывороткой коров NuClone (GE Healthcare, США), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Клетки пересеивали один раз в два дня или за 16 ч перед проведением трансфекции.

Препарат плазмид pEL-1 и pEL-2 подготовлен с использованием наборов очистки плазмидной ДНК EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки линии HEK293T были трансфицированы препаратами плазмид при помощи кальций-фосфатной трансфекции (Kingston et al., 2003). Для трансфекции 5 млн клеток в чашке диаметром 10 см (производство TPP, #93100, Швеция) использовали 10 мкг ДНК. Через 6 ч после трансфекции среду в чашках заменяли на свежую и инкубировали клетки 48 ч. После этого кондиционированные среды фильтровали через 0.45 мкм PES-фильтры и использовали для дальнейшего анализа.

**Детекция аналогов лактаптина в кондиционированных средах методом Вестерн-блота.** К аликвотам кондиционированной среды добавляли 1/4 часть (по объему) буфера состава 100 мМ Tris-HCl pH 6.8, 400 мМ β-меркаптоэтанол, 4 % SDS, 40 % глицерин, бромфеноловый голубой (300 нг/мл), ксилен цианоловый (300 нг/мл), и наносили на полиакриламидный гель (5 % концентрирующий и 15 % разделяющий). В качестве маркера молекулярного веса использовали готовый набор предокрашенных белков с молекулярной массой 10–260 кДа (Thermo Scientific Spectra Multicolor Broad range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Литва). По окончании электрофореза белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) путем влажного электропереноса при 150 В в течение 1 ч в буфере NuPAGE (Novex Life Technologies, США). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в буфере iBind Solution (Novex Life Technologies, США) на приборе iBind Western (Life Technologies) в течение 18 ч с добавлением антител к RL2, конъюгированных с пероксидазой хрена (клон F14, ООО «Биосан», Россия), разведение 1:1000. После этого мембрану инкубировали с хемилюминесцентным субстратом (Novex®ECL, Invitrogen, США) в течение 1 мин и визуализировали данные на люминесцентном сканере C-Digit (LI-COR, США). Данные обрабатывали с помощью программного пакета Image Studio Ver 4.0 digits (LI-COR, США).

**Оценка содержания рекомбинантного лактаптина в кондиционированных средах при помощи двухцентрового иммуноферментного анализа.** Специфические моноклональные антитела к лактаптину (100 мкл)

(клон F21, ООО «Биосан», РФ) в карбонат-бикарбонатном буфере (0.015 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.035 М NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) иммобилизовали на 96-луночные сорбционные планшеты для иммуноферментного анализа (ИФА) (Costar, США) и инкубировали последовательно 60 мин при 37 °С и далее 18 ч при 4 °С. Содержимое лунок удаляли, планшет дважды промывали промывочным буфером (150 мМ NaCl, 25 мМ Tris, 0.05 % Tween-20, pH 7.5), добавляли в лунки по 200 мкл блокировочного буфера (150 мМ NaCl, 25 мМ Tris-HCl pH 7.5, 0.05 % Tween-20, 0.9 % BSA) и инкубировали 1 ч при 37 °С. Лунки дважды промывали промывочным буфером и наносили в трех повторах образцы кондиционированной среды, разбавленной в 2, 5 и 10 раз. Для построения калибровочной кривой готовили образцы RL2 (30, 60, 90, 120, 300, 600 нг/мл) и помещали по 100 мкл в трех повторах в подготовленные ИФА планшеты. Планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего содержимое лунок удаляли и добавляли в каждую лунку по 100 мкл моноклональных антител к лактаптину F15 (ООО «Биосан», Россия), конъюгированных с пероксидазой хрена, и инкубировали 1 ч при 37 °С. Лунки промывали промывочным буфером, добавляли по 100 мкл субстрата (0.05 М цитратно-фосфатный буфер, 0.1 мг/мл ТМВ, 0.006 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pH 5.0) и инкубировали 20 мин в темноте при 24 °С. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на планшетном спектрофотометре Apollo LB 912 (Berthold Technologies, Германия) при λ = 450 нм, референсная волна λ = 620 нм. По полученным результатам строили калибровочную кривую и по линейному участку определяли содержание лактаптина.

**Анализ цитотоксической активности методом МТТ.** Анализ цитотоксической активности образцов кондиционированной среды от клеток HEK293T проводили методом МТТ, как описано ранее (Koval et al., 2012). Опухолевые клетки высаживали в 96-луночные планшеты в количестве 1.5 × 10<sup>3</sup> клеток/лунку в среду RPMI-1640, содержащую 20 % по объему фетальной сыворотки телят (Gibco, ThermoFisher Scientific, США) с добавлением раствора антибиотиков-антимикотиков состава: 100 ед./мл пенициллина G, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.25 мкг/мл амфотерицина (Gibco, ThermoFisher Scientific, США), и растили в течение 24 ч при температуре (37.0 ± 1.0) °С в атмосфере (5.0 ± 0.5) % CO<sub>2</sub>. К лункам добавляли исследуемые субстанции в объеме 100 мкл и продолжали культивирование в стандартных условиях. Через 48 ч среду из лунок удаляли и добавляли по 200 мкл питательной среды RPMI-1640, содержащей раствор 0.25 мг/мл МТТ ((3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолина бромид) (Sigma-Aldrich, США)) и продолжали инкубацию в течение 4 ч. Среду из лунок удаляли и растворяли оставшиеся кристаллы МТТ-формазана добавлением 150 мкл ДМСО (Sigma-Aldrich, США). Оптическую плотность раствора измеряли при λ = 570 нм.

## Результаты и обсуждение

**Активность аналога лактаптина RL2 в отношении асцитной формы гепатомы ГА1 мыши.** Для сравнительной оценки противоопухолевого курса терапии RL2 была выбрана опухолевая линия гепатомы ГА1 мыши. Клетки

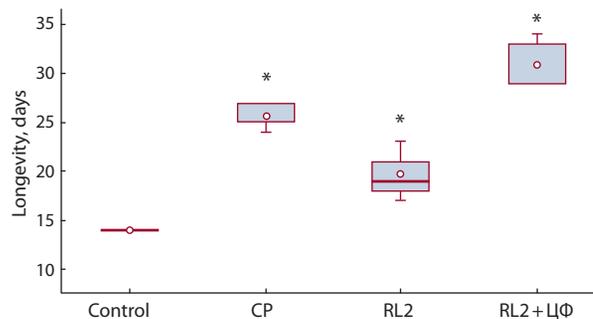
опухоли были трансплантированы интраперитонеально на мышей A/J, интраперитонеальное введение RL2 проводили через день, начиная со второго дня после трансплантации опухолевых клеток. Поскольку опухоль GA1 характеризуется чувствительностью к циклофосфамиду, он был выбран в качестве препарата сравнения, так и компонента для комбинированной терапии (Каледин и др., 2002). Мы обнаружили, что средняя продолжительность жизни животных, получавших инъекции RL2, была достоверно выше, чем у животных контрольной группы, получавших внутривнутрибрюшинные инъекции физиологического раствора, и составила 18 и 14 дней соответственно (рис. 1).

Инъекции циклофосфамида значительно увеличивали продолжительность жизни мышей-опухоленосителей (в среднем до 26 дней), а наибольшая продолжительность жизни отмечена в группе животных, получавших комбинированную терапию циклофосфамидом и RL2 (в среднем 31 день). Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что рекомбинантный аналог лактаптина RL2, получаемый из прокариотических клеток-продуцентов, наибольшую активность показывает в комбинации со стандартным компонентом химиотерапии, циклофосфамидом.

**Конструирование плазмид, экспрессирующих аналоги лактаптина EL1 и EL2, и трансфекция клеток HEK293T.** Для наработки секретлируемой формы лактаптина в эукариотической системе экспрессии мы использовали лентивирусные векторы, в состав которых входят лидерные последовательности люциферазы *Gaussia princeps* и легкой цепи Igк мыши под контролем сильного промотора гена человека *EF1a* (рис. 2).

Данные лидерные последовательности рутинно используются для поверхностной экспрессии или секреции целевых белков в клетках млекопитающих (Lo et al., 1998; Knappskog et al., 2007), однако *a priori* не было известно, обеспечат ли они эффективную секрецию лактаптина из клеток в среду. Структура лентивирусных конструкций предусматривает возможность позитивного отбора трансфицированных или трансдуцированных клеток, благодаря коэкспрессии сцепленного через IRES-элемент флуоресцентного репортера *copGFP Pontellina plumata* (Shagin et al., 2004). Соответствие нуклеотидной последовательности, ожидаемой в рEL-1 и рEL-2, подтверждали секвенированием.

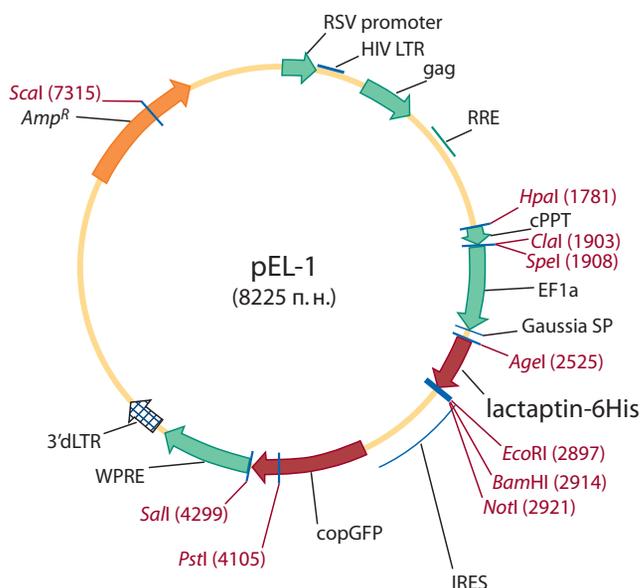
**Анализ продукции рекомбинантных аналогов лактаптина в клетках HEK293T.** Для исследования продукции аналогов лактаптина EL1 и EL2 клетками HEK293T, трансфицированными плазмидами рEL-1 и рEL-2, клетки растили до состояния монослоя и отбирали образцы среды. Для контроля проводили трансфекцию клеток HEK293T пустым вектором рCDH-EF1a-MCS-IRES-copGFP (System Biosciences, США). Образцы среды анализировали методом Вестерн-блота с применением моноклональных IgG мыши к лактаптину. Мы обнаружили, что в образцах кондиционированной ростовой среды от клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами рEL-1 и рEL-2, моноклональные антитела выявляют единственную полосу, которая соответствует расчетной массе рекомбинантных аналогов лактаптина EL1 и EL2 (рис. 3).



**Fig. 1.** Mean time to death of A/J mice with intraperitoneally grafted GA1 tumors.

Experimental animals were treated with the RL2 recombinant analog of lactaptin and/or cyclophosphamide (CP).

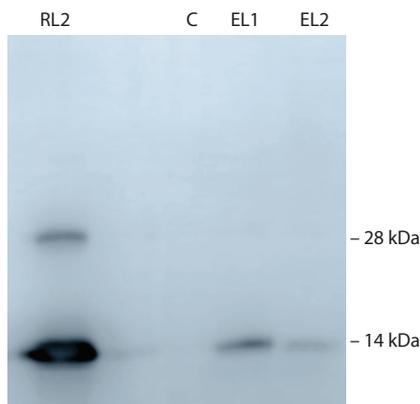
\*Difference between the experimental and control groups significant at  $p < 0.05$ .



**Fig. 2.** Lentiviral construct pEL-1 expressing the secreted lactaptin form.

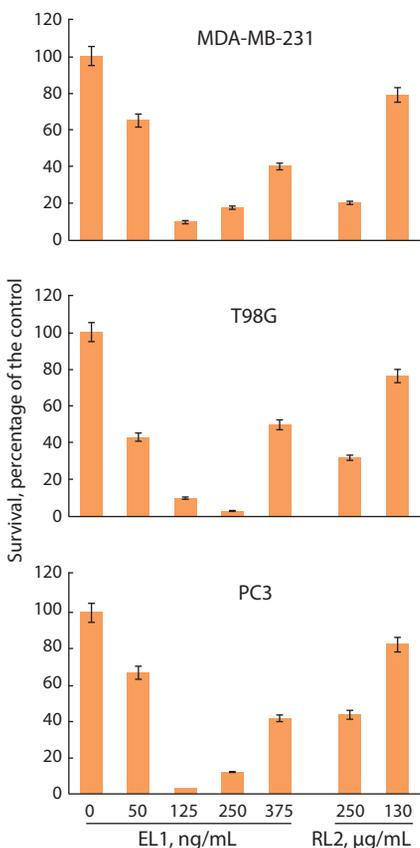
EF1a, promoter of the human *EF1a* gene; Gaussia SP, signal peptide of *Gaussia princeps* luciferase; IRES, internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus; copGFP, green fluorescent protein from the copepod *Pontellina plumata*; RSV, hybrid RSV promoter; HIV LTR, long terminal repeat of HIV-1; gag, truncated sequence of the HIV-1 gag gene; RRE, HIV-1 REV response element; WPRE, woodchuck virus posttranscriptional regulatory element; 3'dLTR, truncated long terminal repeat of HIV-1; *Amp<sup>R</sup>*, ampicillin resistance gene. The structure of the pEL-2 plasmid is nearly the same as pEL-1 except for the region encoding the signal peptide: METDTLLWVLLLVVPGSTG (pEL-2, mlgk) vs. MGVKVLFALICIAVAEAKPTG (pEL-1, GaussiaSP).

Таким образом, подтверждена секреция белков EL1 и EL2 клетками HEK293T. Для того чтобы количественно оценить содержание целевых рекомбинантных белков в кондиционированной среде, был проведен двухцентровой иммуноферментный анализ. Образцы с известными концентрациями белка RL2 использовали для построения калибровочной кривой. Мы обнаружили, что концентрация рекомбинантного лактаптина в культуральной среде EL1 составляла 510 нг/мл, а EL2 – 420 нг/мл.



**Fig. 3.** Western blotting of recombinant lactaptins secreted into the culture medium of HEK293T cells.

RL2, the lactaptin analog used as positive control; C, conditioned medium of HEK293T cells transfected with pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP; EL1 and EL2, conditioned media of cells transfected with pEL-1 and pEL-2, respectively.



**Fig. 4.** Viability of human tumor cells treated with conditioned medium containing recombinant lactaptin EL1.

The recombinant lactaptin analog RL2 was used as positive control. Viability was normalized to the percentage of live cells in cultures treated with supernatants from HEK293T cells transfected with empty vector DNA pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP.

**Анализ цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей аналог лактаптина EL1.** Ранее нами показано, что IC50 RL2 для чувствительных опухолевых клеток в среднем составляет  $300 \pm 100$  мкг/мл (Koval et al., 2014, 2015). Полученные данные по содержанию белков EL1 и EL2 в кондиционированной среде свидетельствуют о том, что концентрация EL1 и EL2 приблизительно в 500 раз ниже значения IC50 RL2. Поэтому для оценки цитотоксической активности был использован аналог EL1, содержание которого в среде выше, чем EL2. Для анализа цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей аналог лактаптина EL1, были выбраны клетки опухолевых линий человека различного гистологического происхождения: аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231, рака простаты PC3 и глиобластомы T98G.

Поскольку к клеткам добавляли кондиционированную среду, а не выделенный белок, количество белка EL1, добавляемого в лунки, было ограничено объемом кондиционированной среды и не превышало 150 мкл. Вследствие этого максимальной исследуемой дозой EL1 была доза 375 нг/мл. Данные, представленные на гистограммах, свидетельствуют о выраженной цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей EL1 (рис. 4). Можно видеть, что сравнимое снижение жизнеспособности исследуемых клеток вызывало добавление среды с нанограммовым количеством белка EL1 и микрограммовое количество белка RL2.

Таким образом, мы показали, что кондиционированная среда от клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pEL1, содержала целевой белок EL1 и оказывала большее цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека, чем аналог лактаптина RL2, продуцируемый клетками *E. coli*. Учитывая продемонстрированную способность аналога лактаптина RL2 оказывать противоопухолевое действие *in vivo* и усиливать действие циклофосамида, можно предположить, что аналог EL1 будет также проявлять высокую противоопухолевую активность как в монорежиме, так и в комбинации с традиционными химиотерапевтическими препаратами. Кроме того, полученные плазмиды pEL1 и pEL2 могут быть использованы в дальнейшем для получения «усиленных» вариантов различных иммунных клеток человека для иммунотерапии опухолей. Возможно, такие клетки, помимо своей цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток-мишеней, смогут выполнять функцию доставщиков лактаптина в опухоль, обеспечивая его высокую локальную концентрацию и терапевтический эффект.

### Acknowledgments

This study was supported by the Russian Ministry of Education and Science, project 14.604.21.0169 (RFMEFI60417X0169).

DNA sequencing was conducted at the shared access center “Molecular and Cell Biology”, Institute of Molecular and Cell Biology, Novosibirsk.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Bondarenko D.A., Richter V.A., Kuligina E.V., Koval O.A., Fomin A.S., Skoblov Y.S., Dyachenko I.A., Kravchenko I.N., Sadovnikova E.A., Semushina S.G., Novikova N.I., Turobov V.I., Murashev A.N. Toxicity studies and pharmacokinetics of Lactaptin. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Journal of Biopharmaceuticals*. 2015;7(2):40-47. (in Russian)
- Kakarla S., Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? *Cancer J*. 2014; 20(2):151-155. DOI 10.1097/PPO. 0000000000000032.
- Kaledin V.I., Nikolin V.P., Galyamova M.R., Vasil'eva E.D., Baymak T.Y., Popova N.A. High apoptosis-inducing and antitumor activities of the products of biological but not chemical cyclophosphamide activation. *Doklady RAN = Proceedings of the Russian Academy of Sciences*. 2002;386(5):705-708. (in Russian)
- Kingston R.E., Chen C.A., Rose J.K. Calcium phosphate transfection. *Curr. Protoc. Mol. Biol*. 2003;9. DOI 10.1002/0471142727.mb0901s63.
- Knappskog S., Ravneberg H., Gjerdrum C., Trösse C., Stern B., Pryme I.F. The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent

- on the choice of signal peptide. *J. Biotechnol.* 2007;128(4):705-715. DOI 10.1016/j.jbiotec.2006.11.026.
- Koval O.A., Fomin A.S., Kaledin V.I., Semenov D.V., Potapenko M.O., Kuligina E.V., Nikolin V.P., Nikitenko E.V., Richter V.A. A novel pro-apoptotic effector lactaplin inhibits tumor growth in mice models. *Biochimie.* 2012;94(12):2467-2474. DOI 10.1016/j.biochi.2012.08.017.
- Koval O., Sakaeva G., Fomin A., Nushtaeva A., Semenov D., Kuligina E., Gulyaeva L., Gerasimov A., Richter V. Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumour samples to new potential anticancer peptide lactaplin. *J. Cancer Res. Ther.* 2015;11(2):345-351. DOI 10.4103/0973-1482.157301.
- Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S., Semenov D.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Zavjalov E.L., Richter V.A. Lactaplin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts. *PLoS ONE.* 2014;9(4):e93921. DOI 10.1371/journal.pone.0093921.
- Kulemzin S.V., Chikaev N.A., Volkova O.Y., Kuznetsova V.V., Taranin A.V., Gorchakov A.A. Modular lentiviral vector system for chimeric antigen receptor design optimization. *Bioorganicheskaya khimiya = Journal of Bioorganic Chemistry.* 2017b;43(2):124-132. DOI 10.7868/S0132342317020117. (in Russian)
- Kulemzin S.V., Kuznetsova V.V., Mamonkin M., Taranin A.V., Gorchakov A.A. CAR T-cell therapy: Balance of efficacy and safety. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology (Moscow).* 2017a; 51(2):274-287. DOI 10.7868/S0026898417020148. (in Russian)
- Lo K.M., Sudo Y., Chen J., Li Y., Lan Y., Kong S.M., Chen L., An Q., Gillies S.D. High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng.* 1998;11(6):495-500. DOI 10.1093/protein/11.6.495.
- Merino D., Lalaoui N., Morizot A., Solary E., Micheau O. TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2007;11(10):1299-1314. DOI 10.1517/14728222.11.10.1299.
- Nagane M., Huang H.J., Cavenee W.K. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy. *Apoptosis.* 2001;6(3):191-197. DOI 10.1023/A:1011336726649.
- Semenov D.V., Fomin A.S., Kuligina E.V., Koval O.A., Matveeva V.A., Babkina I.N., Tikunova N.V., Richter V.A. Recombinant analogs of a novel milk pro-apoptotic peptide, lactaplin, and their effect on cultured human cells. *Protein J.* 2010;29(3):174-180. DOI 10.1007/s10930-010-9237-5.
- Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., Widder E.A., Lukyanov S.A., Matz M.V. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol.* 2004;21(5):841-850. DOI 10.1093/molbev/msh079.
- Song X., Hong S.H., Kwon W.T., Bailey L.M., Basse P., Bartlett D.L., Kwon Y.T., Lee Y.J. Secretory TRAIL-armed natural killer cell-based therapy: in vitro and in vivo colorectal peritoneal carcinomatosis xenograft. *Mol. Cancer Ther.* 2016;15(7):1591-1601. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-15-0937.