

**ВАРИАНТЫ СИНТЕЗИРОВАННОГО В *Escherichia coli*  
РЕКОМБИНАНТНОГО ЭРИТРОПОЭТИНА ЧЕЛОВЕКА:  
ВЛИЯНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ  
НА АКТИВНОСТЬ *in vitro* И *in vivo*\***

© 2019 А.С. Карягина<sup>1,2,3\*\*</sup>, Т.М. Грунина<sup>1</sup>, А.М. Лящук<sup>1</sup>,  
Е.В. Воронина<sup>4</sup>, Р.А. Марыгин<sup>4</sup>, С.А. Черепушкин<sup>4</sup>, И.Н. Трусова<sup>4</sup>,  
А.В. Гришин<sup>1,2</sup>, М.С. Попонова<sup>1</sup>, П.А. Орлова<sup>1</sup>, В.Н. Манских<sup>1,3</sup>,  
Н.В. Струкова<sup>1</sup>, М.С. Генералова<sup>1</sup>, К.Е. Никитин<sup>1</sup>, Л.А. Соболева<sup>1</sup>,  
И.С. Бокша<sup>1,5</sup>, А.В. Громов<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия;  
электронная почта: akaryagina@gmail.com,  
alexander.v.gromov@gmail.com

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной  
биотехнологии, 127550 Москва, Россия

<sup>3</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский  
государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> Государственный научно-исследовательский институт генетики  
и селекции промышленных микроорганизмов, НИЦ «Курчатовский институт»,  
117545 Москва, Россия

<sup>5</sup> Научный центр психического здоровья, 115522 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.07.18

После доработки 14.09.18

Принята к публикации 14.09.18

Целью работы являлась сравнительная характеристика трех вариантов синтезированного в клетках *Escherichia coli* рекомбинантного эритропоэтина человека с дополнительными белковыми доменами: белка 6His-s-tag-ЕРО, несущего на N-конце s-tag – 15-звенный олигопептид из рибонуклеазы А поджелудочной железы быка, и белков НВД-ЕРО и ЕРО-НВД, содержащих, соответственно, в N- и C-концевых положениях дополнительный гепарин-связывающий домен (НВД) из костного морфогенетического белка BMP-2 *Danio rerio*. В качестве препарата сравнения был использован коммерческий препарат эпостим (ООО «Фарма-парк», Россия), полученный синтезом в клетках яиц китайского хомячка. Белок ЕРО-НВД – вариант синтезированного в *E. coli* рекомбинантного эритропоэтина с доменом НВД на C-конце, присоединенный к эритропоэтиновому домену жестким междоменным спейсером, – имеет лучшие характеристики по сравнению с белком НВД-ЕРО с обратной последовательностью соединения доменов. Белок ЕРО-НВД обладает повышенной в ~13 раз биологической активностью *in vitro*, заключающейся в способности вызывать пролиферацию клеток эритролейкемии человека TF-1, большей скоростью ассоциации с рецептором эритропоэтина EPOR, а также лучшими среди четырех исследованных белков параметрами связывания и пролонгированного выхода из носителя – деминерализованного костного матрикса (ДКМ). При подкожном введении ЕРО-НВД, иммобилизованного на ДКМ, наблюдается существенно более выраженная васкуляризация окружающих тканей, чем при введении ДКМ с другими белками и ДКМ без нанесенного белка. Таким образом, по всем изученным параметрам белок ЕРО-НВД обладает лучшими характеристиками в сравнении с другими исследованными вариантами ЕРО, и представляется перспективным изучение возможности его медицинского применения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эритропоэтин, гепарин-связывающий домен, пролиферация клеток эритролейкемии человека TF-1, васкуляризация тканей.

DOI: 10.1134/S032097251901007X

Принятые сокращения: ЕРО – эритропоэтин (ErythroPOietin); EPOR – рецептор эритропоэтина; НВД – гепарин-связывающий домен; BMP-2 – костный морфогенетический белок 2 (Bone Morphogenetic Protein-2); ДКМ – деминерализованный костный матрикс; 6His – шесть аминокислотных остатков гистидина; s-tag – 15-звенный олигопептид из рибонуклеазы А поджелудочной железы быка; ДТТ – дитиотреитол; а.о. – аминокислотный остаток.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM18-197, 12.11.2018.

\*\* Адресат для корреспонденции.

Основная функция эритропоэтина (ЕРО) заключается в стимуляции эритропоэза — процесса дифференцировки предшественников эритроцитов в костном мозге [1]. Также ЕРО влияет на заживление ран и восстановление поврежденных нервных клеток. В последние годы появились работы, описывающие участие ЕРО в процессах ремоделирования костной ткани [2–4]. Все исследования по изучению воздействия ЕРО, введенного в организм млекопитающего, на процессы регенерации костной ткани выполнены с использованием рекомбинантного ЕРО, синтезированного в эукариотических клетках [5–12]. При этом показана возможность получения активного рекомбинантного ЕРО человека в прокариотической системе экспрессии генов — в клетках *Escherichia coli* [13–18]. Такие варианты ЕРО могут быть наработаны в больших количествах, в более стандартизованном виде, с меньшими материальными и трудовыми затратами. Однако получаемые путем микробиологического синтеза варианты ЕРО не гликозилированы и, как следствие, менее растворимы и склонны к агрегации, а также имеют сниженную в ~1,5 раза по сравнению с гликозилированными формами молекулярную массу. Как следствие, белки, синтезированные в клетках прокариот, достаточно быстро выводятся из системного кровотока. Однако эти проблемы тем или иным способом можно преодолеть [13, 14, 16–18]. Белки, полученные в клетках *E. coli*, обладают биологической активностью [13–18], и представляется перспективной разработка подходов для практического применения таких белков, в частности, их использования для регенерации костной ткани.

В большинстве случаев в работах по изучению процессов репарации дефектов костной ткани применяли системный способ введения ЕРО, требующий многочисленных инъекций, однако местное введение также продемонстрировало очень хорошие результаты [12]. При системном введении больших доз ЕРО у пациента может повыситься уровень гематокрита и увеличиться вязкость крови, вследствие чего возможно развитие сердечно-сосудистых заболеваний [19] и тромбозов [20]. Поэтому местное применение ЕРО, характеризующееся использованием значительно меньших доз препарата и, тем самым, снижением вероятности развития побочных эффектов, а также существенно меньшей трудоемкостью, представляется перспективным для лечения костных патологий.

Для пролонгации действия препарата в месте введения необходимо тем или иным способом обеспечить поддержание его локальной концентрации, достаточной для проявления биологи-

ческой активности. В случае белковых препаратов этого можно достичь за счет введения в состав молекулы дополнительного домена, обеспечивающего удержание белка на определенном носителе с постепенным выходом в окружающие ткани. Таким доменом является, например, гепарин-связывающий домен (HBD) из костного морфогенетического белка 2 (BMP-2) *Danio rerio*. Этот положительно заряженный домен находится в N-концевой части BMP-2. Его элиминация или мутирование приводит к неспособности BMP-2 связываться с гепарином;  $K_d$ , измеренная с помощью биосенсора VIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB), составляет 20 нМ [21]. Этот домен обеспечивает возможность очистки BMP-2 на гепарин-сепарозе [21, 22]. HBD способствует удержанию BMP-2 в костной ткани за счет неспецифических ионных взаимодействий. Он прочно связывается с деминерализованным костным матриксом (ДКМ), получаемым из костной ткани [21, 23], — широко применяемым имплантируемым материалом, в составе которого присутствует ряд сульфатированных отрицательно заряженных глюкозаминогликанов. Можно получить слитную последовательность, в которой HBD из BMP-2 присоединен к ЕРО с образованием двухдоменного бифункционального белка, обладающего биологическими функциями ЕРО и способностью удерживаться на ДКМ и других гепарин-содержащих матрицах. Задача получения новых рекомбинантных вариантов ЕРО методами геной и белковой инженерии достаточно легко решается с помощью клонирования и экспрессии синтетических генов в клетках *E. coli*.

В предшествующих работах мы получили синтезированные в клетках *E. coli* варианты ЕРО, содержащие дополнительные белковые домены [17, 18]. В частности, был получен рекомбинантный ЕРО, несущий на N-конце s-tag — 15-звенный олигопептид из рибонуклеазы А поджелудочной железы быка [17]. Этот вариант белка обладал активностью *in vitro* в пролиферативном тесте на линии клеток эритролейкемии человека TF-1, всего на порядок уступающей активности рекомбинантного эпозтина бета — препарата эпостим (ООО «Фармапарк», Россия), гликозилированной формы ЕРО, получаемой синтезом в клетках яичников китайского хомячка. В другой работе был сконструирован белок HBD-ЕРО, молекула которого на N-конце несет HBD из BMP-2 [18]. Этот белок обладал биологической активностью *in vitro* в клеточном тесте и активностью *in vivo* в тесте по возрастанию количества ретикулоцитов в крови крыс после подкожного инъекционного введения белка. Величины обеих активностей были на ~2 поряд-

ка ниже по сравнению с эпостимом. При этом НВД-ЕРО проявлял значительно более выраженную, чем у эпостима, местную активность, заключающуюся в способности индуцировать васкуляризацию тканей при подкожной имплантации дисков из ДКМ, несущих эти белки в одинаковых дозах. Выраженная местная активность объясняется тем, что НВД-ЕРО, в отличие от эпостима, способен удерживаться на ДКМ, и это обеспечивает пролонгированное действие белка в месте имплантации [18]. Сниженная активность *in vitro* белка НВД-ЕРО, вероятно, является следствием дестабилизации эритропоэтинового домена близлежащим *N*-концевым доменом НВД. Мы предполагаем, что активность *in vitro* и, как следствие, другие виды биологической активности такого варианта ЕРО могут быть улучшены с помощью методов белковой инженерии, таких как перестановка доменов и их пространственное разобщение за счет вставки более длинного и более жесткого междоменного спейсера [24].

Ранее нами был разработан достаточно просто реализуемый тест *in vivo*, позволяющий проводить оценку способности вариантов рекомбинантного эритропоэтина вызывать васкуляризацию тканей при местной имплантации [18]. На наш взгляд, этот тест может на первых этапах характеристики белков в определенной степени заменить выполнение трудоемких и длительных экспериментов по изучению влияния различных вариантов эритропоэтина на процесс регенерации дефектов костной ткани, заслуживающих проведения самостоятельного исследования. Возможность такой замены определяется рядом особенностей, перечисленных ниже.

Помимо основной гематопоэтической функции, эритропоэтин вызывает плеiotропные негематопоэтические эффекты, в частности, оказывает влияние на остеогенез, ангиогенез и васкуляризацию тканей. Эти свойства ЕРО обусловлены взаимодействием с гетеродимером рецепторов EPOR/CD131 на поверхности негематопоэтических клеток [25, 26]. При этом как ангиогенная, так и остеогенная активности ЕРО осуществляются за счет сигнальных путей mTOR, JAK2 и PI3K [26, 27].

ЕРО увеличивает число клеток-предшественников эндотелия, привлекая их к месту повреждения [28]. Кроме того, было показано положительное влияние ЕРО на экспрессию как VEGF, важнейшего ангиогенного фактора [29], так и BMP-2, одного из основных факторов роста и регенерации кости [2]. В работе Sun et al. [9] продемонстрировано значительное подавление ангиогенеза, индуцированного ЕРО, после бло-

кирования остеокластогенеза посредством бисфосфонатов или остеопротегерина (OPG), что свидетельствует о тесной взаимосвязи этих процессов. Другим механизмом участия эритропоэтина в процессах образования костной ткани является влияние на сигнальный путь EphrinB2/EphB4, отвечающий за взаимодействие остеобластов и остеокластов, которое играет определяющую роль в процессах ремоделирования, а также на поздних стадиях восстановления целостности костной ткани [30].

Таким образом, пути регуляции ангиогенеза и остеогенеза посредством ЕРО тесно связаны между собой, кроме того, оба процесса очень важны для регенерации костной ткани. Прорастание сосудов в новообразованную кость необходимо для ее правильного развития и функционирования. В процитированной выше работе Holstein et al. [29] показана взаимосвязь ЕРО-опосредованного остеогенеза с ангиогенезом, сопровождающимся повышенной экспрессией VEGF под действием ЕРО. Характеристика ангиогенной активности исследуемых вариантов белка важна как экспериментальное подтверждение наличия у полученных нами вариантов белков одной из негематопоэтических активностей эритропоэтина *in vivo*, а также свидетельство наличия у исследуемых белков активности, важной непосредственно для процесса регенерации костной ткани.

Целью настоящей работы являлось получение путем синтеза в клетках *E. coli* нового варианта рекомбинантного эритропоэтина с гепарин-связывающим доменом и проведение сравнительной характеристики нового варианта белка и двух ранее полученных вариантов рекомбинантного эритропоэтина.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали бактериальный штамм *E. coli* M15 [pREP4] ( $F^-$  Ф80ΔlacM15, *thi*, *lac*<sup>-</sup>, *mtl*<sup>-</sup>, *recA*<sup>+</sup>, Km<sup>R</sup>) и плазмидный вектор pQE6 («Qiagen», США).

**Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей ЕРО-НВД.** Полностью синтезированный ген *ЕРО-НВД*, кодирующий аминокислотную последовательность двухдоменного белка, который включал последовательность эритропоэтина человека, спейсера и НВД из BMP-2 *Danio rerio*, был фланкирован на 5'-конце сайтом NcoI, а на 3'-конце – сайтом KpnII. Оптимизацию кодонного состава синтетического гена, корректировку вторичной структуры транскрибируемой РНК, расчет молекулярной массы и теоретической изоэлектрической точки (pI) ко-

дируемого полипептида осуществляли с использованием стандартных подходов, как описано в работе Karyagina et al. [31]. Синтез гена проводили на фирме «Евроген» (Россия). Ген *EPO-HBD* встраивали в плазмиду pQE6 по сайтам NcoI и Kpn2I и клонировали в *E. coli* M15 [pREP4]. В результате был получен продуцент белка *EPO-HBD*, несущего на С-конце гепарин-связывающий домен (схема строения молекулы белка приведена в табл. 1). Для *EPO-HBD* расчетные значения молекулярной массы и *pI* составляют 21 736,55 Да и 10,07 соответственно.

**Выделение и очистка *EPO-HBD*.** Выращивание трансформированных клеток *E. coli*, их разрушение, выделение телец включения, хроматографическая очистка белка на сорбенте WorkBeads 40 S («Bio-Works», Швеция), рефолдинг белка и колоночная хроматография на Heparin Sepharose CL-6B («Amersham Pharmacia Biotech», Швеция) детально описаны в работе Karyagina et al. [18].

Выделение и очистку белка *EPO-HBD* проводили следующим образом. Отмытые тельца включения массой 0,18 г растворяли в 8 М растворе мочевины в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и центрифугировали при 9000 g в течение 30 мин, полученный супернатант подвергали колоночной хроматографии на сорбенте WorkBeads 40 S (5 мл), уравновешенном 8 М раствором мочевины в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), со скоростью 1 мл/мин, промывали со скоростью 2 мл/мин до выхода снижения поглощения на плато, с той же скоростью проводили элюцию раствором NaCl (линейным градиентом концентрации 0–1 М в объеме 50 мл) в том же буферном растворе; элюат с колонки собирали фракциями по 2 мл. Фрак-

ции, соответствующие максимальному поглощению при 280 нм, объединяли, анализировали с помощью ПААГ-электрофореза, измеряли концентрацию белка.

Для рефолдинга раствор белка после этапа хроматографии на WorkBeads 40 S разбавляли буфером, содержащим 6 М гуанидина гидрохлорида, 0,1 М дитиотреитола (ДТТ), 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), до конечной концентрации белка ~0,1 мг/мл и инкубировали в течение 24 ч при 4 °С. Далее раствор денатурированного белка диализовали против 10 объемов буфера, содержавшего 1 М гуанидина гидрохлорида и 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), в течение 24 ч с трехкратной сменой диализного буфера и центрифугировали в течение 30 мин при 9000 g. Полученный раствор разбавляли буфером для рефолдинга, содержавшим 1 М L-аргинина, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,5), в соотношении 1 : 1, до конечной концентрации белка ~0,05 мг/мл и инкубировали в течение 24 ч при 4 °С. Раствор рефолдированного белка диализовали против 10 объемов буфера, содержавшего 4 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl (pH 6,8), в течение 24 ч и центрифугировали в течение 30 мин при 9000 g.

Полученный раствор белка после диализа наносили на колонку с 5 мл сорбента Heparin Sepharose CL-6B, уравновешенного раствором 4 М мочевины в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 6,8), связывание белка и промывание колонки проводили в том же буфере, все операции – со скоростью 1 мл/мин. Белок элюировали градиентом концентрации NaCl 0–1 М в растворе 4 М мочевины в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 6,8) в объеме 50 мл со скоростью 1 мл/мин. В результате элюции собирали четыре фракции по 2 мл,

**Таблица 1.** Используемые в работе варианты эритропоэтина: строение молекулы белка и характеристика активности *in vitro* и *in vivo* в различных тестах

Название белка	Схема строения/особенности молекулы белка	Активность <i>in vitro</i> , нг/мл	Аффинность к EPOR, ранги	Параметры связывания и выхода из ДКМ, ранги	Площадь сосудов, мкм <sup>2</sup> (нижний и верхний квартили, медиана)
Эпостим	гликозилированный EPO	0,68	1	2	220–952 (401)
6His-s-tag-EPO	6His-s-tag-DDDDK-EPO	4,34	2	4	419–1264 (744)
EPO-HBD	EPO-(AP) <sub>8</sub> -HBD	24,15	3	1	876–4410 (2217)
HBD-EPO	HBD-(GS) <sub>3</sub> -EPO	319,40	4	3	643–1859 (1098)

Примечание. DDDDK – сайт гидролиза энтерокиназы, (AP)<sub>8</sub> – аланин-пролиновый линкер, (GS)<sub>3</sub> – глицин-сериновый линкер. Активность *in vitro* определяли в пролиферативном тесте на культуре клеток эритролейкемии человека линии TF-1; аффинность к EPOR характеризовали в рамках сравнительной оценки аффинности к EPOR вариантов эритропоэтина методом биослойной интерферометрии; параметры связывания и выхода из ДКМ определяли в экспериментах по кинетике выхода вариантов эритропоэтина из ДКМ; степень васкуляризации оценивали по площади сосудов на гистологических срезах в экспериментах по изучению местной ангиогенной активности белков при подкожном введении крысам имплантатов из ДКМ с нанесенными на них белками (см. «Методы исследования»). Нижний и верхний квартили площади сосудов для ДКМ (группа сравнения) составляют 209–742 мкм<sup>2</sup> (медиана 459 мкм<sup>2</sup>). В сравнительных тестах белок, демонстрирующий лучшую среди всех белков активность, имеет ранг 1, худшую – 4.



полученные фракции анализировали методом ПААГ-электрофореза, для оценки степени агрегации к пробам добавляли буфер для образцов по Лэммли без восстановителя. Мономерный белок содержался в первых трех фракциях элюции, в последней фракции на электрофореграмме наблюдалось небольшое количество агрегатов. Три фракции общим объемом 6 мл объединяли и диализовали против 10 объемов 20 мМ ацетата аммония (рН 4,5) в течение 24 ч при 4 °С с трехкратной сменой буфера. Концентрация полученного препарата белка составляла 0,141 мг/мл. Белок лиофильно высушивали и использовали для дальнейших исследований. Высушенные препараты белка хорошо растворялись в физиологическом растворе.

#### **Оценка биологической активности белков *in vitro*.**

Биологическую активность препаратов эритропоэтина оценивали *in vitro* в пролиферативном тесте на линии клеток эритролейкемии человека TF-1 (ATCC CRL-2003), руководствуясь Европейской фармакопеей 9-й редакции, как описано в работе Grunina et al. [17].

**Оценка эффективности связывания белков с рекомбинантным рецептором человека EPOR.** Исследования осуществляли методом биослойной интерферометрии в формате анализа профиля кинетики связывания исследуемых белков в растворе с иммобилизованным на биосенсоре Protein A рецептором человека EPOR/Fc («Sino-Biological», Китай) с использованием системы Octet K2 (Fortebio/Pall, США) в режиме реального времени [32].

Готовили 96-луночный планшет для интерферометрии с рабочими разведениями рецептора человека EPOR/Fc в концентрации 0,5 мкг/мл и исследуемых белков по 20 нМ каждого в 1× буфере для определения кинетики ассоциации, рекомендованном производителем («Fortebio», США). Время иммобилизации рецептора EPOR/Fc программировали функцией threshold 0,85 нм. Этапы ассоциации и диссоциации устанавливали длительностью 600 с. Анализ проводили при 30 °С и скорости перемешивания 1000 об/мин. Отрицательным контролем служил 1× буфер для определения кинетики ассоциации, указанный выше. Для каждой реакции ассоциации исследуемых образцов использовали индивидуальный оптоволоконный биосенсор Protein A в паре с контрольным биосенсором.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Fortebio Data Analysis 9.0 («Fortebio», США).

**Оценка кинетики выхода вариантов эритропоэтина из ДКМ.** Мембраны из ДКМ толщиной 3–4 мм из диафизов бедренных костей крупного

рогатого скота получали по ранее разработанному методу [33] с модификациями [23]. Из мембран вырезали диски диаметром 4 мм. Для нанесения белков использовали диски массой  $10 \pm 1$  мг.

Для иммобилизации белков каждый диск помещали в 100 мкл раствора, содержавшего 10 мкг белка в 25 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 5,5), инкубировали с покачиванием на орбитальном шейкере S-3 («Elmi Ltd.», Латвия) со скоростью 10 об/мин и углом наклона платформы 5° в течение 5 ч под вакуумом, а затем проводили трехкратную отмывку по 20 мин тем же буфером (1 мл). Далее диски замораживали и лиофильно высушивали.

Для оценки выхода белков лиофилизированные диски с нанесенными белками помещали в полипропиленовые пробирки с крышками и добавляли по 1 мл буфера для инкубации, содержавшего 25 мМ фосфата натрия (рН 5,5), 1% BSA и 0,2% азида натрия. Пробирки инкубировали при комнатной температуре с покачиванием на шейкере со скоростью 300 об/мин. Через 1, 5, 24 и 48 ч, а также 3, 7, 14, 21 и 28 сут отбирали весь объем пробы, добавляя каждый раз по 1 мл буфера для инкубации. Отобранные пробы замораживали. По окончании эксперимента в пробах измеряли концентрацию белков с помощью разработанной нами ранее ИФА-тест-системы [18].

**Оценка местной ангиогенной активности белков.** Оценка местной ангиогенной активности HBD-ЕРО проводили в эксперименте по подкожному введению фрагментов ДКМ с нанесенными на них белками с последующей гистологической оценкой степени васкуляризации прилегающих тканей согласно методике, описанной в работе Karyagina et al. [18], с небольшими модификациями. В эксперименте использовали 15 самцов крыс линии Sprague Dawley массой 270–280 г. Крысы были разделены на пять групп по три особи в каждой группе. Каждой крысе под наркозом (Золетил 100 (15 мг/кг) внутривенно и Рометар (5 мг/кг) интраперитонеально) вводили два имплантата (диска ДКМ) с одним и тем же белком подкожно в височную область – симметрично с обеих сторон. Четырем опытным группам вводили диски из ДКМ с нанесенными на них по 1 мкг белками HBD-ЕРО, ЕРО-HBD, bHis-s-tag-ЕРО и эпостимом, пятой группе (контрольной) – диски из ДКМ без нанесенного белка. Для нанесения белков накануне операции диски помещали в пластиковые пробирки на 1,5 мл с крышками, наносили на них по 1 мкг белка в 20 мкл 25 мМ фосфатного буфера (рН 5,5), инкубировали в течение ночи при 10 °С и без предварительной лиофилизации использовали для имплантации.

Через пять дней проводили эвтаназию животных ингаляцией диоксида углерода и извлекали диски с прилегающим участком ткани. Срезы (толщиной 4 мкм) из фиксированных формалином и залитых в парафин дисков окрашивали гематоксилин-эозином, а также азаном по Гейденгайну [34] и проводили гистологический анализ. Степень выраженности васкуляризации оценивали с помощью сравнительного количественного анализа площади сосудов на полученных срезах. Статистический анализ проводили с применением критерия Краскела–Уоллиса ( $p < 0,01$ ) с помощью программного обеспечения Statistica 12.0 («Statsoft», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе был получен двухдоменный рекомбинантный белок EPO-HBD, включающий аминокислотную последовательность эритропоэтина человека, спейсера и гепарин-связывающего домена из BMP-2 *Danio rerio*. Схемы строения молекул полученных ранее белков HBD-EPO [18] и 6His-s-tag-EPO [16], а также полученного в данной работе белка EPO-HBD, которые использовали для сравнительной характеристики вариантов EPO, приведены в табл. 1.

Для выделения и очистки EPO-HBD применяли схему (см. «Методы исследования»), которая практически полностью соответствует ранее разработанной схеме выделения белка HBD-EPO [18]. Общее количество выделенного белка EPO-HBD составляло 0,85 мг. Данные по эффективности очистки и выходу белка EPO-HBD на различных стадиях приведены в табл. 2.

Электрофореграмма разделения в 12%-ном ПААГ препаратов окисленных и восстановленных форм очищенных белков 6His-s-tag-EPO, HBD-EPO и EPO-HBD приведена на рис. 1. Полученные белки электрофоретически гомогенны, в препаратах не идентифицируются высокомолекулярные агрегаты и более низкомолекулярные белки. Электрофоретическая подвижность окисленных форм всех трех белков (рис. 1, дорожки 1, 3 и 5) выше по сравнению с подвижностью восстановленных форм, получаемых при обработке ДТТ (рис. 1, дорожки 2, 4 и 6).

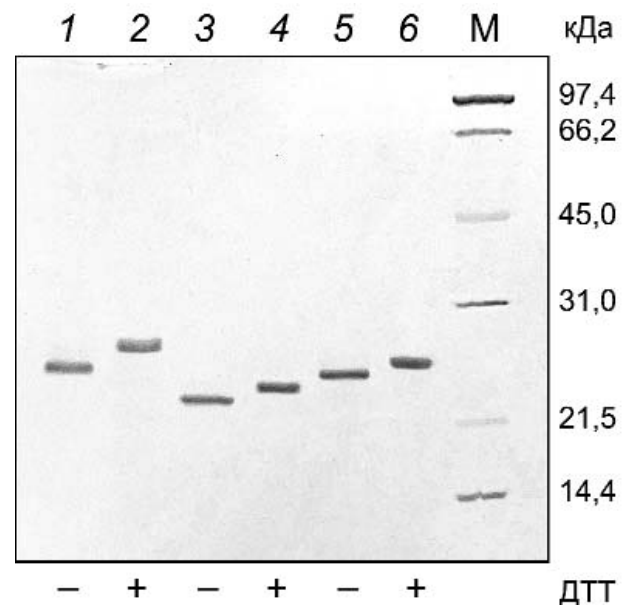
Очищенный белок EPO-HBD, а также белки 6His-s-tag-EPO, HBD-EPO и эпостим, полученный синтезом в эукариотических клетках, использовали для измерения активности *in vitro* на культуре клеток эритролейкемии человека линии TF-1 в ходе одного и того же эксперимента. Результаты измерения активности приведены на рис. 2.

**Таблица 2.** Выход целевого белка в процессе очистки EPO-HBD

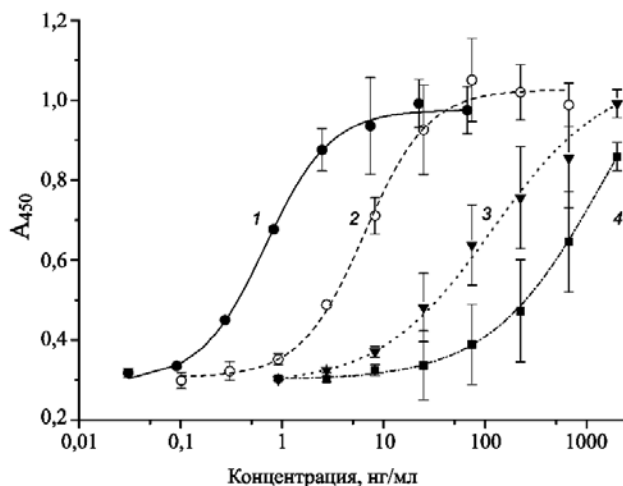
Стадии очистки	Количество белка, мг на 1 г сырой биомассы	Содержание HBD-EPO, %
Биомасса (после индукции экспрессии гена)	23,8	42,7
Тельца включения	18,3	90,2
Хроматография на WorkBeads 40 S	5,4	95,3
Рефолдинг и хроматография на Heparin Sepharose CL-6B	0,85	99,5

EC<sub>50</sub> для контрольного эукариотического белка эпостим составляла 0,68 нг/мл (среднее по результатам трех повторов), для прокариотических белков 6His-s-tag-EPO, EPO-HBD и HBD-EPO – 4,34, 24,15 и 319,40 нг/мл соответственно (табл. 1).

Полученные результаты по активности *in vitro* на культуре клеток эритролейкемии были



**Рис. 1.** Электрофореграмма в 12%-ном ПААГ очищенных белков 6His-s-tag-EPO (1 и 2, расчетная молекулярная масса 23,8 кДа), HBD-EPO (3 и 4, расчетная молекулярная масса 20,5 кДа) и EPO-HBD (5 и 6, расчетная молекулярная масса 21,7 кДа); 1, 3 и 5 – окисленные формы белков, 2, 4, 6 – восстановленные формы белков. М – белковые маркеры молекулярных масс 14–97 кДа («Bio-Rad», США). Все препараты белка перед нанесением на гель обрабатывали буфером для образцов с добавлением или без добавления ДТТ. Присутствие (+) или отсутствие (–) ДТТ в буфере для образцов указано под соответствующими дорожками

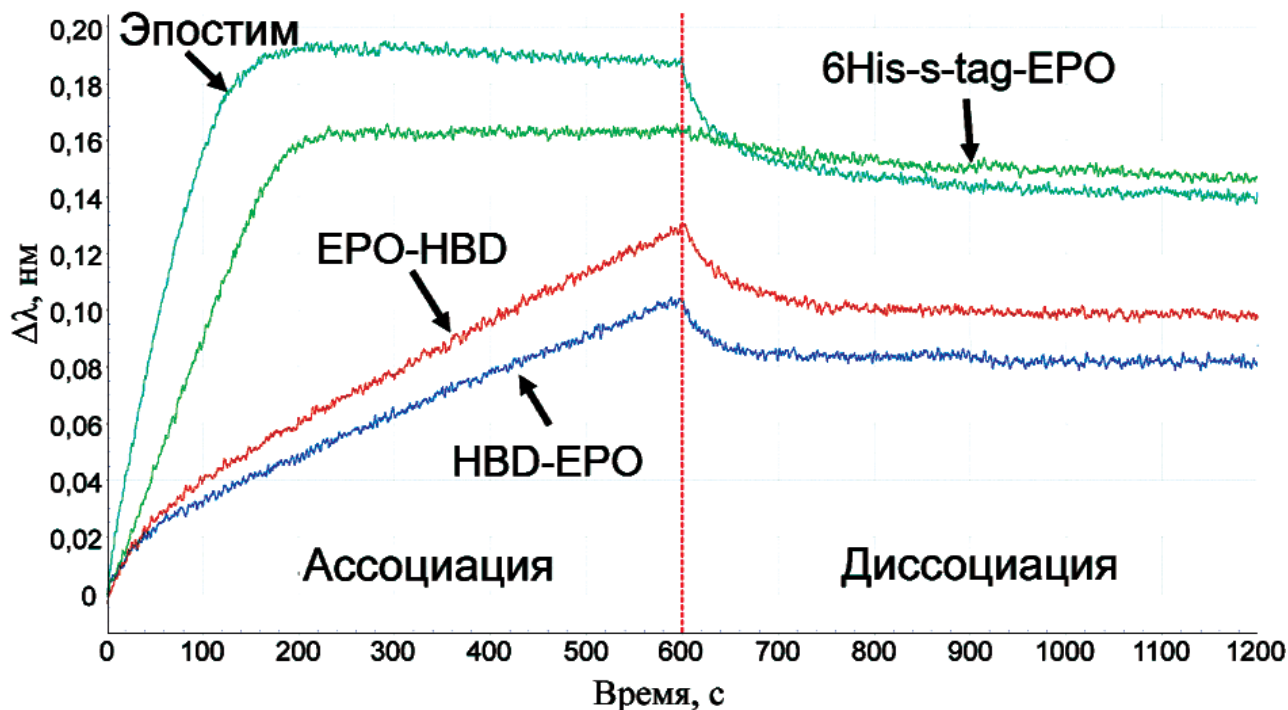


**Рис. 2.** График зависимости оптической плотности в лунке от концентрации образца при определении активности различных вариантов EPO *in vitro* на культуре клеток эритролейкемии человека линии TF-1: 1 – значения среднего и график аппроксимирующей функции для эпостима, 2 – для 6His-s-tag-EPO, 3 – для EPO-HBD, 4 – для HBD-EPO. Отрезки снизу и сверху от значков, обозначающих значение среднего, соответствуют стандартному отклонению по измерениям в трехкратной повторности для всех белков

подтверждены методом биослойной интерферометрии в рамках сравнительной оценки степени аффинности к EPOR (рецептору эритропоэтина) изучаемых вариантов эритропоэтина (рис. 3).

По степени снижения скорости ассоциации с EPOR белки располагаются в следующем порядке: эпостим (максимальная скорость ассоциации) → 6His-s-tag-EPO → EPO-HBD → HBD-EPO. Меньшей скорости ассоциации соответствует более низкий наклон кривой на первом участке интерферометрического профиля (рис. 3). Для удобства восприятия данные по аффинности различных вариантов EPO к EPOR представлены в табл. 1 в виде рангов, где эпостиму, характеризующемуся максимальной аффинностью, присвоен ранг 1, а HBD-EPO, имеющему минимальную аффинность, – ранг 4.

Представлялось также интересным оценить способность исследуемых белков к связыванию и удержанию на носителе – ДКМ, которая, как предполагалось, должна коррелировать с присутствием в белках домена HBD и его интактностью. Для оценки связывания были проведены эксперименты по исследованию кинетики выхода белков из дисков ДКМ. Белки в количестве 10 мкг наносили на диски массой  $10 \pm 1$  мг и лиофилизировали. Диски с нанесенными белками инкубировали в 1 мл буфера для инкубации, полностью отбирали весь объем буфера и замещали его новым через 1, 5 и 24 ч, а затем через 2, 3, 7, 14, 21 и 28 сут. Измерение концентрации вышедшего в буфер белка проводили с помощью сэндвич-ИФА. Кумулятивные кривые



**Рис. 3.** Интерферометрические профили ассоциации/диссоциации исследуемых белков 6His-s-tag-EPO, HBD-EPO, EPO-HBD и эпостима в растворе с иммобилизованным EPOR/Fc на биосенсоре Protein A.

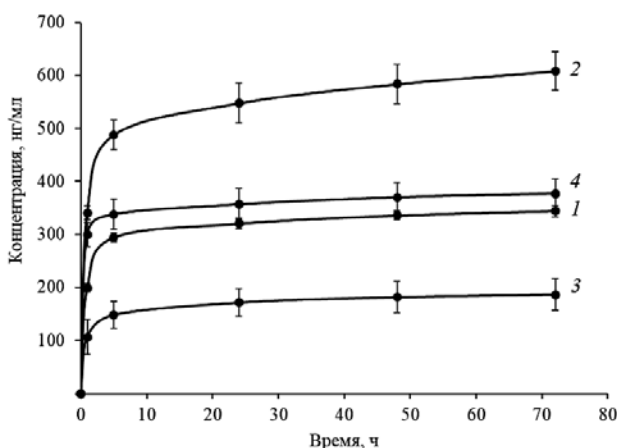
С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)



выхода белков на протяжении первых трех суток показаны на рис. 4. Ранжированные по эффективности связывания с ДКМ белки, когда самому эффективному связыванию соответствует ранг 1, а наименее эффективному – ранг 4, представлены в табл. 1.

Как видно на рис. 4, максимальное количество белка связалось с ДКМ в случае ЕРО-НВД. Для этого белка характерен постепенный выход из носителя на отрезке времени 5–72 ч (в среднем ~30 нг за сутки), что в ~3 раза превышает соответствующий выход у остальных белков: это хорошо заметно по большему по сравнению с другими графиками наклону кривой ЕРО-НВД на этом участке. В промежутке между 21 и 28 сут этот белок все еще демонстрировал выход в количестве 1,5 нг/сут, в то время как выход остальных белков в этом временном интервале уже не детектировался с помощью ИФА. Наименьшее связывание и самый низкий выход из ДКМ продемонстрировал белок 6-His-s-tag-ЕРО, в составе которого отсутствует гепарин-связывающий домен.

С целью проведения сравнительной характеристики исследуемых вариантов эритропоэтина по активности *in vivo*, проявляющейся в васкуляризации окружающих тканей, проводили опыт по подкожному введению ДКМ с нанесенными на него белками (каждый белок – в количестве 1 мкг) с последующей гистологической оценкой. В качестве контроля использовали диски из ДКМ без нанесенного белка. Диски с прилегающими тканями извлекали через пять



**Рис. 4.** Кумулятивные кривые выхода исследуемых вариантов эритропоэтина из образцов ДКМ: 1 – кривая выхода белка НВД-ЕРО, 2 – ЕРО-НВД, 3 – 6His-s-tag-ЕРО, 4 – эпостима. Опыт проводили на трех образцах ДКМ с каждым из белков. Кружки и отрезки снизу и сверху от них соответствуют средним значениям и их стандартным отклонениям. Измерения концентрации белков в пробах проводили с помощью разработанной нами ранее ИФА-тест-системы [18]

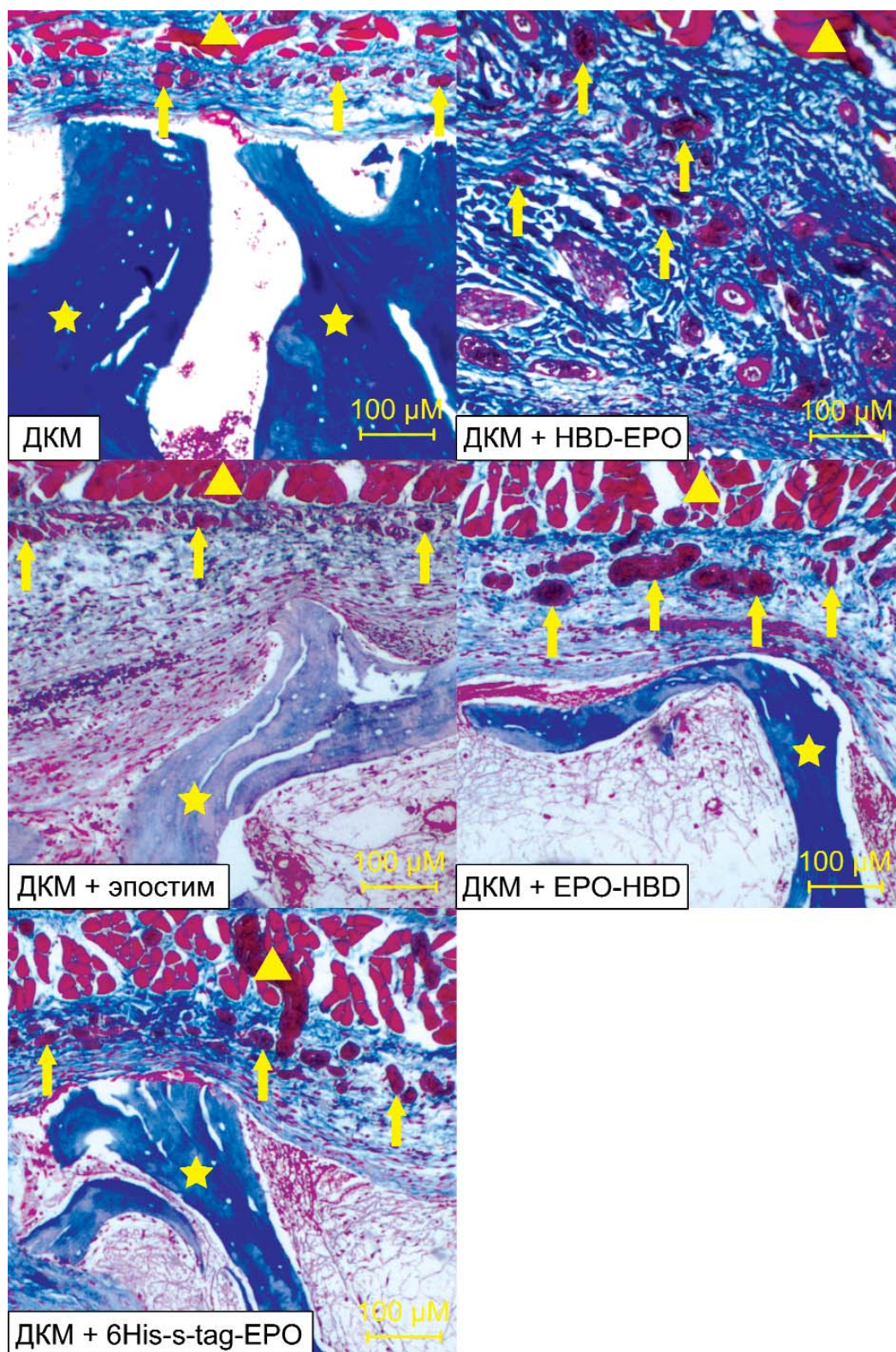
дней, окрашивали гематоксилин-эозином, а также азаном по Гейденгайну [34]. Оценку общей гистологической картины проводили по образцам, окрашенным гематоксилин-эозином, подсчет площади сосудов – по образцам, окрашенным азаном.

Общая гистологическая картина оказалась схожей во всех группах. Эпидермис, дерма и его придатки в препаратах были интактны. В адвентиции располагался имплантат в виде фрагмента децеллюляризованной губчатой кости без признаков ее резорбции остеокластами и перифокального остеогенеза. Пространство между балками было заполнено слабо организованным фибрином с небольшим числом клеточных элементов (лейкоцитов и макрофагов). По периферии очага наблюдалась слабо или умеренно выраженная воспалительная реакция с образованием зрелой грануляционной ткани из фибробластоподобных элементов и макрофагов и слабо или умеренно выраженной инфильтрацией лимфоцитами и плазмочитами.

Основные отличия между группами выразились в разной степени васкуляризации тканей (рис. 5, табл. 1). В табл. 1 приведены нижний и верхний квартили площади сосудов и медианы. В наименьшей степени васкуляризация выражена в контрольной группе с ДКМ без нанесенных на него белков, а также при имплантации ДКМ с эпостимом. Мелкие сосуды площадью 209–742 мкм<sup>2</sup> (медиана 459 мкм<sup>2</sup>) в случае ДКМ и 220–952 мкм<sup>2</sup> (медиана 401 мкм<sup>2</sup>) в случае ДКМ с эпостимом, содержащие эритроциты, сосредоточены в основном в периферийной зоне очага, вдоль подкожного мышечного слоя. Похожая картина с более выраженной васкуляризацией, заключающейся в увеличенном количестве сосудов большей площади, наблюдалась при имплантации ДКМ с 6His-s-tag-ЕРО (419–1264 мкм<sup>2</sup>, медиана 744 мкм<sup>2</sup>). В случае белков НВД-ЕРО и ЕРО-НВД наблюдалась самая выраженная картина васкуляризации. Сосуды различного размера – от мелких до очень крупных, площадью 643–1859 мкм<sup>2</sup> (медиана 1098 мкм<sup>2</sup>) в случае НВД-ЕРО и 876–4410 мкм<sup>2</sup> (медиана 2217 мкм<sup>2</sup>) в случае ЕРО-НВД, – присутствовали как на периферии, так и в тканях, расположенных ближе к центру очага.

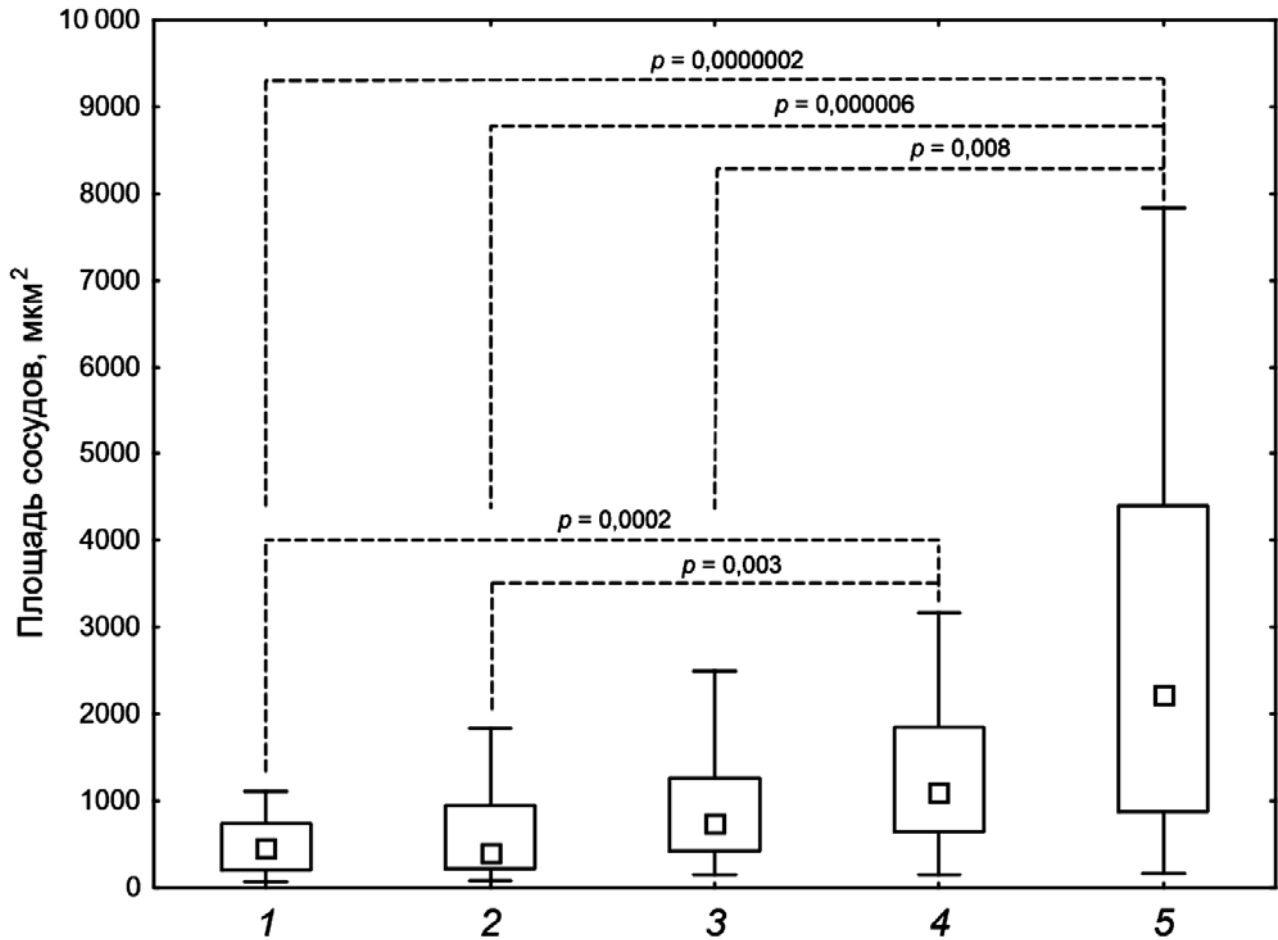
Статистический анализ площади сосудов на гистологических срезах показал достоверные различия по сравнению с контрольной группой (ДКМ) и группой с ДКМ + эпостим при имплантации ДКМ + НВД-ЕРО и ДКМ + ЕРО-НВД (рис. 6). При этом по площади сосудов группа ДКМ + 6His-s-tag-ЕРО достоверно отличалась только от группы ДКМ + ЕРО-НВД, но не от группы ДКМ + НВД-ЕРО.





**Рис. 5.** Микроскопическая картина образцов тканей в области подкожной имплантации дисков ДКМ без нанесения белков и с нанесенными на них белками через пять дней после имплантации. Окрашивание азаном по методу Гейденгайна [34]. Увеличение 40х. Треугольниками обозначены подкожные мышечные волокна, стрелками – сосуды, заполненные окрашенными азаном в красный цвет эритроцитами, звездочками – фрагменты имплантата из ДКМ, представленные децеллюляризованной губчатой костью.

С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [www.elibrary.ru](http://www.elibrary.ru)



**Рис. 6.** Диаграмма размаха площади сосудов на гистологических срезах у групп с подкожной имплантацией: 1 – ДКМ, 2 – ДКМ + эпостим, 3 – ДКМ + 6His-s-tag-ЕРО, 4 – ДКМ + НВД-ЕРО, 5 – ДКМ + ЕРО-НВД. Маленькими квадратами обозначены медианы, границы прямоугольника – нижний и верхний квартили, планки – разброс значений. Приведены значения  $p$ , полученные при сравнении групп между собой с применением критерия Краскела–Уоллиса

Основные характеристики исследованных белков представлены в табл. 1.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ранее проведенном исследовании [18] путем синтеза в клетках *E. coli* мы получили НВД-ЕРО – вариант рекомбинантного эритропоэтина с дополнительным доменом НВД из BMP-2 *Danio rerio*, обеспечивающим способность белка связываться с гепарин-содержащими субстратами и близкими по свойствам матрицами, в частности с ДКМ – имплантируемым материалом, широко применяемым для репарации дефектов костной ткани. Показано, что биологическая активность белка НВД-ЕРО *in vitro*, заключающаяся в способности вызывать пролиферацию клеток эритролейкемии человека линии TF-1, на два порядка ниже биологической активности синтезируемого в эукариотических клетках пре-

парата эпостим (ООО «Фармапарк», Россия). При этом местная активность *in vivo*, заключающаяся в васкуляризации окружающих тканей, наблюдаемая через пять дней после подкожного введения ДКМ с нанесенными на него в дозе 1 мкг белками, в случае НВД-ЕРО существенно выше, чем в случае эпостима. Вероятно, данный эффект объясняется тем, что в НВД-ЕРО, в отличие от эпостима, присутствует белковый домен НВД, обеспечивающий связывание и удержание на ДКМ, благодаря которым осуществляется пролонгированное действие белка. Тот факт, что введение иммобилизованного на ДКМ НВД-ЕРО в низкой дозе (1 мкг) за короткий срок (5 сут) [18] приводило к выраженной васкуляризации тканей, свидетельствует о том, что уже этот вариант ЕРО представляет собой белок, перспективный с точки зрения использования в регенеративной медицине. Тем не менее с помощью методов белковой инженерии можно попытаться улучшить свойства белка.



Рекомбинантный белок НВД-ЕРО, сконструированный нами ранее [18], содержит домен НВД на *N*-конце молекулы. Такое расположение НВД мы выбрали при конструировании НВД-ЕРО по аналогии с его положением в природном факторе ВМР-2 у всех видов животных. Поскольку способность данного домена связываться с гепарин-содержащими носителями используется при хроматографической очистке этого варианта ЕРО на гепарин-сефарозе [18], *N*-концевое положение домена НВД может приводить к затруднению разделения в процессе хроматографии полноразмерного рекомбинантного белка и вариантов с недостроенной полипептидной цепочкой. При этом выход очищенного белка может снижаться из-за необходимости исключать фракции, в которых присутствуют его укороченные варианты. Поэтому для получения нового варианта рекомбинантного ЕРО было решено переместить домен НВД в *C*-концевое положение. С целью избегания взаимовлияния белковых доменов для их соединения рекомендуют использовать линкеры с повышенной жесткостью, содержащие остатки пролина, чередующиеся с другими аминокислотными остатками [24]. При конструировании нового рекомбинантного белка ЕРО-НВД вместо гибкого линкера  $\text{NH}_2\text{-GSGSGS-COOH}$ , с помощью которого были соединены домены в НВД-ЕРО, мы использовали длинный жесткий междоменный линкер с последовательностью  $\text{NH}_2\text{-GSPAPAPAPAPAPARS-COOH}$ . Схемы строения молекулы белка ЕРО-НВД и ранее полученных белков НВД-ЕРО и 6His-s-tag-ЕРО, которые использовались для сравнительной характеристики вариантов ЕРО в данной работе, приведены в табл. 1.

Очищенные белки 6His-s-tag-ЕРО, НВД-ЕРО и ЕРО-НВД в соответствии с различиями в величинах молекулярной массы демонстрируют различную подвижность при электрофорезе по Лэммли (рис. 1). В процессе выделения белков с помощью хроматографии на сорбенте WorkBeads 40 S, рефолдинга и последующей хроматографии на Heparin Sepharose CL-6B (см. «Методы исследования») получают очищенную окисленную форму белков. Окисленные белки 6His-s-tag-ЕРО и НВД-ЕРО имеют структуру, близкую к нативной, с присутствием в молекуле двух S-S-связей, образованных четырьмя остатками цистеина, как было показано ранее с помощью масс-спектрометрии [17, 18]. Электрофоретическая подвижность окисленных форм всех трех белков (рис. 1, дорожки 1, 3 и 5) отличается от подвижности восстановленных форм, получаемых при добавлении ДТТ (рис. 1, дорожки 2, 4 и 6), в большую сторону. Белок ЕРО-

НВД выделяли и рефолдировали практически в тех же условиях, что и НВД-ЕРО [18]. Окисленная и восстановленная формы ЕРО-НВД в соответствии с величинами молекулярных масс имеют подвижности, промежуточные между подвижностью соответствующих форм 6His-s-tag-ЕРО и НВД-ЕРО. Вероятно, это свидетельствует в пользу того, что в окисленной форме ЕРО-НВД также присутствуют обе характерные для ЕРО внутримолекулярные дисульфидные связи.

По результатам измерения активности *in vitro* на культуре клеток эритролейкемии человека линии TF-1 удельная активность 6His-s-tag-ЕРО составляет 15,6%, ЕРО-НВД – 2,8% и НВД-ЕРО – 0,2% от активности эпостима. Таким образом, благодаря перестановке доменов и замене линкера на более жесткий и длинный у белка ЕРО-НВД удалось повысить удельную активность более чем на порядок (в 13 раз) по сравнению с белком НВД-ЕРО. Активность 6His-s-tag-ЕРО выше, чем у обоих вариантов эритропоэтина с НВД, и, по данным этого эксперимента, составляет 15,6%, что хорошо согласуется с ранее полученными данными об активности этого белка (13,4%; [17]).

Для исследования взаимодействия всех вариантов эритропоэтина с EPOR применяли метод биослойной интерферометрии, в основе которого лежит явление интерференции световых волн. Направляемый пучок белого света отражается от поверхности оптоволоконного биодатчика с нанесенным биосовместимым слоем белка А. Поэтапное высокоаффинное взаимодействие биодатчика, покрытого белком А с Fc-фрагментом рецептора, а затем рецептора с изучаемыми вариантами эритропоэтина позволило получить интерферометрический профиль в режиме реального времени. Этим методом удалось выяснить, что среди четырех исследуемых белков максимальной скоростью ассоциации с EPOR обладает эпостим (рис. 3). Вариант 6His-s-tag-ЕРО также характеризуется высокой скоростью ассоциации с EPOR, хотя и меньшей, чем у эпостима. При этом интересно, что скорость диссоциации в случае 6His-s-tag-ЕРО меньше, чем у эпостима (рис. 3). Варианты ЕРО-НВД и НВД-ЕРО имеют пониженную скорость ассоциации с EPOR по сравнению с 6His-s-tag-ЕРО и эпостимом. Наименьшая скорость ассоциации с рецептором была отмечена в случае НВД-ЕРО.

Для вариантов ЕРО-НВД и НВД-ЕРО в начале интерферометрического профиля ассоциации наблюдается наличие нелинейного участка в промежутке времени 0–100 с (рис. 3). Вероятно, это свидетельствует о присутствии в препаратах фракций с разной степенью аффинности к

рецептору, что хорошо видно при увеличении концентрации  $>20$  нМ (данные не приведены). Возможно, гетерогенность связана с присутствием в препаратах некоторого количества не идентифицируемых электрофоретически высокомолекулярных агрегатов или форм с неправильно сформированными S-S-связями, характеризующихся меньшей аффинностью к рецептору. Мы предполагаем, что гетерогенность препаратов могла также повлиять на активность *in vitro*.

Таким образом, по результатам оценки *in vitro* пролиферативной активности и аффинности к EPOR исследуемых вариантов эритропоэтина белки располагаются по убыванию активности в следующем порядке: эпостим  $\rightarrow$  6His-s-tag-ЕРО  $\rightarrow$  ЕРО-НВД  $\rightarrow$  НВД-ЕРО (табл. 1).

В экспериментах по оценке способности исследуемых белков к связыванию и удержанию на носителе ДКМ получены результаты, в целом коррелирующие с присутствием в белках домена НВД и его интактностью. Наилучшее связывание показано для белка ЕРО-НВД, несущего в С-концевом положении домен НВД, отделенный от эритропоэтинового домена жестким спейсером, наихудшее — для белка 6His-s-tag-ЕРО, в котором отсутствует домен НВД (рис. 4, табл. 1).

Интересным наблюдением является то, что эпостим, не имеющий гепарин-связывающего домена, в данных условиях демонстрирует даже несколько лучшее связывание и выход из ДКМ, чем белок НВД-ЕРО, содержащий НВД-домен. Это, вероятно, объясняется особенностями гликозилирования эпостима, обеспечивающими способность к взаимодействию с ДКМ, несмотря на присутствие в терминальных отделах углеводных цепочек отрицательно заряженных сиаловых кислот.

Таким образом, изменение положения домена НВД на С-концевое в случае белка ЕРО-НВД привело не только к улучшению пролиферативной активности *in vitro* в культуре клеток и к увеличению скорости ассоциации с EPOR, но и к существенному улучшению связывания с ДКМ, увеличению продолжительности выхода и количества вышедшего из носителя белка по сравнению с НВД-ЕРО и другими исследованными белками. Такой эффект, вероятно, объясняется более удачным расположением доменов и уменьшением их взаимовлияния при использовании более жесткого спейсера.

При сравнительной характеристике исследуемых вариантов эритропоэтина по активности *in vivo*, проявляющейся в васкуляризации окружающих тканей, оценку общей гистологической картины проводили по образцам, окрашенным

гематоксилин-эозином, подсчет площади сосудов — по образцам, окрашенным азаном по Гейденгайну [34]. Окрашивание азаном облегчает визуализацию сосудов, содержащих эритроциты, что используется в некоторых исследованиях — например, в работе Zwingenberger et al. [35] для оценки степени васкуляризации тканей при исследовании совместного действия рекомбинантных факторов SDF-1a и BMP-2 на регенерацию костной ткани вместо традиционного иммуногистохимического подхода с применением антитела CD31 — маркера эндотелиальных клеток. Ранее [18] мы использовали окрашивание азаном для подсчета количества и площади сосудов, содержащих эритроциты, и оценки степени васкуляризации окружающих тканей при подкожном введении имплантатов из ДКМ с нанесенными на них НВД-ЕРО и эпостимом. В данной работе мы провели расширенный эксперимент по той же методике, добавив для сравнения группы с белками 6His-s-tag-ЕРО и ЕРО-НВД, а также группу с ДКМ без нанесенного белка.

Полученные данные (рис. 5 и 6) хорошо согласуются с теоретическими представлениями о том, что лучшую способность к васкуляризации окружающих тканей при имплантации на ДКМ должны проявлять белки, удерживающиеся на носителе за счет присутствия гепарин-связывающего домена (ЕРО-НВД и НВД-ЕРО) и, таким образом, создающие более высокую локальную концентрацию фактора, который вызывает ангиогенез и васкуляризацию в области имплантации.

Дальнейшие исследования с целью изучения возможности медицинского применения полученных в работе вариантов эритропоэтина с дополнительными белковыми доменами, особенно белка ЕРО-НВД, представляют с нашей точки зрения большой интерес. При этом остается открытым вопрос о возможной иммуногенности двухдоменных белков прокариотического происхождения при имплантации в организм человека. Безопасность конкретных имплантируемых материалов может быть оценена только в ходе проведения соответствующих доклинических и клинических исследований. Однако следует отметить, что полученные варианты эритропоэтина планируется использовать не для системного, а для местного введения в костную ткань. При этом будут применяться современные хирургические методики, предотвращающие попадание имплантируемых материалов в кровь и окружающие ткани. Это может в значительной мере предупреждать возникновение нежелательных иммунных реакций. Для препаратов рекомбинантного эритропоэтина прокарио-



тического происхождения сведений о возникновении иммунных реакций при местной имплантации нет. В то же время имеются многочисленные данные по исследованию иммунных реакций у пациентов при местном способе введения препарата «INFUSE® Bone Graft» («Medtronic», США) с целью регенерации костной ткани. Этот препарат представляет собой адсорбирующую коллагеновую губку и лиофилизированный рекомбинантный белок rhBMP-2, который растворяют в дистиллированной воде и наносят на губку непосредственно перед имплантацией в область дефекта костной ткани. Полученные данные свидетельствуют о низкой иммуногенности rhBMP-2 и отсутствии корреляции между наличием осложнений после применения «INFUSE® Bone Graft» и присутствием антител к rhBMP-2 в крови пациентов [36].

Таким образом, в результате проведенных сравнительных исследований показано, что благодаря перестановке домена HBD в С-концевое положение и использованию более жесткого междоменного пролин-аланинового спейсера путем синтеза в *E. coli* удалось получить вариант рекомбинантного эритропоэтина EPO-HBD, обладающий повышенной в ~13 раз по сравнению с HBD-EPO активностью *in vitro* в пролиферативном клеточном тесте на культуре клеток линии TF-1 эритролейкемии человека. Для белка EPO-HBD также характерна более высокая по сравнению с HBD-EPO скорость ассоциации с EPOR, как показано в экспериментах по биослойной интерферометрии. Белок EPO-HBD демонстрирует лучшие по сравнению со всеми остальными исследованными белками (эпостимом, HDB-EPO и 6His-s-tag-EPO) параметры связывания с ДКМ и постепенного выхода из этого носителя. Кроме того, EPO-HBD проявляет максимально выраженную способность стимулировать васкуляризацию тканей при под-

кожной имплантации ДКМ с нанесенными на него белками. Все вышеперечисленные особенности позволяют считать полученный нами новый вариант рекомбинантного эритропоэтина EPO-HBD перспективным для изучения возможности его медицинского применения, в частности использования в экспериментах по регенерации костной ткани как самостоятельно, так и в сочетании с другими белковыми факторами, такими как BMP-2, что будет являться предметом дальнейших исследований.

#### Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-15-00133).

#### Благодарности

Авторы выражают благодарность З.М. Галушкиной за выращивание биомассы для выделения белка и М.С. Кривоzubову за помощь в подготовке дисков из ДКМ.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Одобрение комитета по этике

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, где проводились исследования, положениям Директивы 2010/63/EU и Приложению А к Европейской Конвенции ETS № 123.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krantz, S.B. (1991) Erythropoietin, *Blood*, **77**, 419–434.
2. Shiozawa, Y., Jung, Y., Ziegler, A.M., Pedersen, E.A., Wang, J., Wang, Z., Song, J., Wang, J., Lee, C.H., Sud, S., Pienta, K.J., Krebsbach, P.H., and Taichman, R.S. (2010) Erythropoietin couples hematopoiesis with bone formation, *PLoS One*, **5**, e10853.
3. Wu, C., Giaccia, A.J., and Rankin, E.B. (2014) Osteoblasts: a novel source of erythropoietin, *Curr. Osteoporos. Rep.*, **4**, 428–432.
4. Li, C., Shi, C., Kim, J., Chen, Y., Ni, S., Jiang, L., Zheng, C., Li, D., Hou, J., Taichman, R.S., and Sun, H. (2015) Erythropoietin promotes bone formation through EphrinB2/EphB4 signaling, *J. Dent. Res.*, **94**, 455–463.
5. Holstein, J.H., Menger, M.D., Scheuer, C., Meier, C., Culemann, U., Wirbel, R.J., Garcia, P., and Pohlemann, T. (2007) Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing, *Life Sci.*, **80**, 893–900.
6. Holstein, J.H., Orth, M., Scheuer, C., Tami, A., Becker, S.C., Garcia, P., Histing, T., Morsdorf, P., Klein, M., Pohlemann, T., and Menger, M.D. (2011) Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice, *Bone*, **49**, 1037–1045.
7. Garcia, P., Speidel, V., Scheuer, C., Laschke, M.W., Holstein, J.H., Histing, T., Pohlemann, T., and Menger, M.D.

- (2011) Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice, *J. Orthop. Res.*, **29**, 165–172.
8. Rolfing, J.H.D., Bendtsen, M., Jensen, J., Stiehler, M., Foldager, C.B., Hellfritzsch, M.B., and Bunger, C. (2012) Erythropoietin augments bone formation in a rabbit posterolateral spinal fusion model, *J. Orthop. Res.*, **30**, 1083–1088.
  9. Sun, H., Jung, Y., Shiozawa, Y., Taichman, R.S., and Krebsbach, P.H. (2012) Erythropoietin modulates the structure of bone morphogenetic protein 2-engineered cranial bone, *Tissue Eng. Part A*, **18**, 2095–2105.
  10. Rolfing, J.H., Jensen, J., Jensen, J.N., Greve, A.S., Lysdahl, H., Chen, M., Rejnmark, L., and Bunger, C. (2014) A single topical dose of erythropoietin applied on a collagen carrier enhances calvarial bone healing in pigs, *Acta Orthop.*, **85**, 201–209.
  11. Patel, J.J., Modes, J.E., Flanagan, C.L., and Krebsbach, P.H. (2015) Dual delivery of EPO and BMP2 from a novel modular poly- $\epsilon$ -caprolactone construct to increase the bone formation in prefabricated bone flaps, *Tissue Eng. Part C Methods*, **21**, 889–897.
  12. Omlor, G.W., Kleinschmidt, K., Gantz, S., Speicher, A., Guehring, T., and Richter, W. (2016) Increased bone formation in a rabbit long-bone defect model after single local and single systemic application of erythropoietin, *Acta Orthop.*, **87**, 425–431.
  13. Wang, Y.J., Liu, Y.D., Chen, J., Hao, S.J., Hu, T., Ma, G.H., and Su, Z.G. (2010) Efficient preparation and PEGylation of recombinant human non-glycosylated erythropoietin expressed as inclusion body in *E. coli*, *Int. J. Pharm.*, **386**, 156–164.
  14. Jeong, T.H., Son, Y.J., Ryu, H.B., Koo, B.K., Jeong, S.M., Hoang, P., Do, B.H., Song, J.A., Chong, S.H., Robinson, R.C., and Choe, H. (2014) Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from *E. coli*, *Protein Expr. Purif.*, **95**, 211–218.
  15. Boissel, J.P., Lee, W.R., Presnell, S.R., Cohen, F.E., and Bunn, H.F. (1993) Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure, *J. Biol. Chem.*, **268**, 5983–5993.
  16. Narhi, L.O., Arakawa, T., Aoki, K., Wen, J., Elliott, S., Boone, T., and Cheetham, J. (2001) Asn to Lys mutations at three sites which are N-glycosylated in the mammalian protein decrease the aggregation of *Escherichia coli*-derived erythropoietin, *Protein Eng.*, **14**, 135–140.
  17. Grunina, T.M., Demidenko, A.V., Lyaschuk, A.M., Poponova, M.S., Galushkina, Z.M., Soboleva, L.A., Cherepushkin, S.A., Polyakov, N.B., Grumov, D.A., Solovyev, A.I., Zhukhovitsky, V.G., Boksha, I.S., Subbotina, M.E., Gromov, A.V., Lunin, V.G., and Karyagina, A.S. (2017) Recombinant human erythropoietin with additional processable protein domains: purification of protein synthesized in *Escherichia coli* heterologous expression system, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1285–1294.
  18. Karyagina, A.S., Grunina, T.M., Poponova, M.S., Orlova, P.A., Manskikh, V.N., Demidenko, A.V., Strukova, N.V., Manukhina, M.S., Lyaschuk, A.M., Galushkina, Z.M., Cherepushkin, S.A., Polyakov, N.B., Solovyev, A.I., Zhukhovitsky, V.G., Tretyak, D.A., Boksha, I.S., Gromov, A.V., and Lunin, V.G. (2018) Synthesis in *Escherichia coli* and characterization of human recombinant erythropoietin with additional heparin-binding domain, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1207–1221.
  19. McCullough, P.A., Barnhart, H.X., Inrig, J.K., Reddan, D., Sapp, S., Patel, U.D., Singh A.K., Szczech, L.A., and Califf, R.M. (2013) Cardiovascular toxicity of epoetin-alfa in patients with chronic kidney disease, *Am. J. Nephrol.*, **37**, 549–558.
  20. Dourous, A., Jobski, K., Kollhorst, B., Schink, T., and Garbe, E. (2016) Risk of venous thromboembolism in cancer patients treated with epoetins or blood transfusions, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **82**, 839–848.
  21. Ruppert, R., Hoffmann, E., and Sebald, W. (1996) Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site, which modifies its biological activity, *Eur. J. Biochem.*, **37**, 295–302.
  22. Karyagina, A.S., Boksha, I.S., Grunina, T.M., Demidenko, A.V., Poponova, M.S., Sergienko, O.V., Lyaschuk, A.M., Galushkina, Z.M., Soboleva, L.A., Osidak, E.O., Semikhin, A.S., Gromov, A.V., and Lunin, V.G. (2016) Optimization of rhBMP-2 active-form production in a heterologous expression system using microbiological and molecular genetic approaches, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **31**, 208–213.
  23. Bartov, M.S., Gromov, A.V., Poponova, M.S., Savina, D.M., Nikitin, K.E., Grunina, T.M., Manskikh, V.N., Gra, O.A., Lunin, V.G., Karyagina, A.S., and Gintsburg, A.L. (2016) Modern approaches to research of new osteogenic biomaterials on the model of regeneration of cranial critical-sized defects in rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **162**, 273–276.
  24. Chen, X., Zaro, J.L., and Shen, W.C. (2013) Fusion protein linkers: property, design and functionality, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **65**, 1357–1369.
  25. Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q.W., Smart, J., Su-Rick, C.J., Pobre, E., Diaz, D., Gomez, D., Hand, C., Coleman, T., and Cerami, A. (2004) Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14907–14912.
  26. Rolfing, J., Baatrup, A., Stiehler, M., Jensen, J., Lysdahl, H., and Bunger, C. (2014) The osteogenic effect of erythropoietin on human mesenchymal stromal cells is dose-dependent and involves non-hematopoietic receptors and multiple intracellular signaling pathways, *Stem Cell Rev.*, **10**, 69–78.
  27. Kim, J., Jung, Y., Sun, H., Joseph, J., Mishra, A., Shiozawa, Y., Wang, J., Krebsbach, P.H., and Taichman, R.S. (2012) Erythropoietin mediated bone formation is regulated by mTOR signaling, *J. Cell Biochem.*, **113**, 220–228.
  28. Garcia, P., Speidel, V., Scheuer, C., Laschke, M.W., Holstein, J.H., Histing, T., Pohlemann, T., and Menger, M.D. (2011) Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice, *J. Orthop. Res.*, **29**, 165–172.
  29. Holstein, J.H., Orth, M., Scheuer, C., Tami, A., Becker, S.C., Garcia, P., Histing, T., Morsdorf, P., Klein, M., Pohlemann, T., and Menger, M.D. (2011) Erythropoietin stimulates bone formation, cell proliferation, and angiogenesis in a femoral segmental defect model in mice, *Bone*, **49**, 1037–1045.
  30. Li, C., Shi, C., Kim, J., Chen, Y., Ni, S., Jiang, L., Zheng, C., Li, D., Hou, J., Taichman, R.S., and Sun, H. (2015) Erythropoietin promotes bone formation through EphrinB2/EphB4 signaling, *J. Dent. Res.*, **94**, 455–463.
  31. Karyagina, A.S., Boksha, I.S., Grunina, T.M., Demidenko, A.V., Poponova, M.S., Sergienko, O.V., Lyashchuk, A.M., Galushkina, Z.M., Soboleva, L.A., Osidak, E.O., Bartov, M.S., Gromov, A.V., and Lunin, V.G. (2017) Two variants of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) with additional protein domains: synthesis in an *Escherichia coli* heterologous expression system, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 613–624.
  32. Concepcion, J., Witte, K., Wartchow, C., Choo, S., Yao, D., Persson, H., Wei, J., Li, P., Heidecker, B., Ma, W., Varma, R., Zhao, L.-S., Perillat, D., Carricato, G., Recknor, M., Du, K., Ho, H., Ellis, T., Gamez, J., Howes, M., Phi-Wilson, J., Lockard, S., Zuk, R., and Tan, H. (2009) Label-free detection of biomolecular interactions using BioLayer interferometry for kinetic characterization, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **12**, 791–800.

33. Громов А.В., Никитин К.Е., Карпова Т.А., Зайцев В.В., Сидорова Е.И., Андреева Е.В., Бартов М.С., Мишина Д.М., Субботина М.Е., Шевлягина Н.В., Сергиенков М.А., Соболева Л.А., Котнова А.П., Шарапова Н.Е., Семихин А.С., Диденко Л.В., Карягина А.С., Лунин В.Г. (2012) Разработка методики получения остеопластического материала на основе деминерализованного костного матрикса с максимальным содержанием нативных факторов роста костной ткани, *Биотехнология*, **5**, 66–75.
34. Heidenhain, M. (1905) Zeitschrift fur wissenschaftliche Mikroskopie und fur mikroskopische Technik, S. Hirzel, Leipzig, **22**, pp. 339.
35. Zwingenberger, S., Langanke, R., Vater, C., Lee, G., Niederlohmann, E., Sensenschmidt, M., Jacobi, A., Bernhardt, R., Muders, M., Rammelt, S., Knaack, S., Gelinsky, M., Gunther, K.P., Goodman, S.B., and Stiehler, M. (2016) The effect of SDF-16 on low dose BMP-2 mediated bone regeneration by release from heparinized mineralized collagen type I matrix scaffolds in a murine critical size bone defect model, *J. Biomed Mater. Res. A*, **104**, 2126–2134.
36. Hwang, C.J., Vaccaro, A.R., Lawrence, J.P., Hong, J., Schellekens, H., Alaoui Ismaili, M.H., and Falb, D. (2009) Immunogenicity of bone morphogenetic proteins, *J. Neurosurg. Spine*, **10**, 443–451.

**RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN PROTEINS  
SYNTHESIZED IN *Escherichia coli* CELLS: EFFECTS  
OF ADDITIONAL DOMAINS ON THE *in vitro*  
AND *in vivo* ACTIVITIES**

**A. S. Karyagina<sup>1,2,3\*</sup>, T. M. Grunina<sup>1</sup>, A. M. Lyaschuk<sup>1</sup>, E. V. Voronina<sup>4</sup>,  
R. A. Marigin<sup>4</sup>, S. A. Cherepushkin<sup>4</sup>, I. N. Trusova<sup>4</sup>, A. V. Grishin<sup>1,2</sup>,  
M. S. Poponova<sup>1</sup>, P. A. Orlova<sup>1</sup>, V. N. Manskikh<sup>1,3</sup>, N. V. Strukova<sup>1</sup>,  
M. S. Generalova<sup>1</sup>, K. E. Nikitin<sup>1</sup>, L. A. Soboleva<sup>1</sup>, I. S. Boksha<sup>1,5</sup>,  
and A. V. Gromov<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology,  
Ministry of Health of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia;  
E-mail: akaryagina@gmail.com, alexander.v.gromov@gmail.com

<sup>2</sup> All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology,  
127550 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov  
Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

<sup>4</sup> State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial  
Microorganisms, Kurchatov Institute National Research Center,  
117545 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Research Center of Mental Health, 115522 Moscow, Russia

Received July 10, 2018

Revision received September 14, 2018

Accepted September 14, 2018

The aim of this work was to compare biological activities of three variants of bacterially expressed human recombinant erythropoietin (EPO) with additional protein domains: 6His-s-tag-EPO protein carrying the s-tag (15-a.a. oligopeptide from bovine pancreatic ribonuclease A) at the N-terminus and HBD-EPO and EPO-HBD proteins containing heparin-binding protein domains (HBD) of the bone morphogenetic protein 2 from *Danio rerio* at the N- and C-termini, respectively. The commercial preparation Epostim (LLC Pharmapark, Russia) produced by synthesis in Chinese hamster ovary cells was used for comparison. The EPO variant with the C-terminal HBD domain connected by a rigid linker (EPO-HBD) possesses best properties as compared to HBD-EPO with the reverse domain arrangement. It was ~13 times more active *in vitro* (i.e., promoted proliferation of human erythroleukemia TF-1 cells) and demonstrated a higher rate of association with the erythropoietin receptor (EPOR). EPO-HBD also exhibited the greatest binding to the demineralized bone matrix (DBM) and more prolonged release from the DBM among the four proteins studied. Subcutaneous administration of EPO-HBD immobilized on DBM resulted in significantly more pronounced vascularization of surrounding tissues in comparison with the other proteins and DBM alone. Therefore, EPO-HBD displayed better performance with regard to all the investigated parameters than other examined EPO variants, and it seems promising to study the possibility of its medical use.

**Keywords:** erythropoietin, heparin-binding domain, proliferation of human erythroleukemia cells TF-1, vascularization of surrounding tissues