

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ БИОТЕРАПИЯ

UTILITY BIOLOGICAL POTENTIAL OF TRANSGENIC ANIMALS MAMMARY GLAND FOR PRODUCTION OF RECOMBINANT ENDOSTATIN

*E.S. Zakharova, M.V. Pryzhkova, E.S. Zavadskaja, S.G. Kadulin,
A.V. Kibardin, L.S. Popov, S.L. Kiselev, N.V. Gnuchev
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

ABSTRACT

Using expression construction on the basis of the bovine S1-casein promoter elements and endostatin-coding fragment of mouse collagen XVIII cDNA a number of transgenic mice* populations were generated. Construction stably transmitted to the progeny and provided up to 0,6 g/L endostatin in the milk during lactation.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ СИНТЕЗА РЕКОМБИНАНТНОГО ЭНДОСТАТИНА

*Е.С. Захарова, М.В. Прыжкова, Е.С. Завадская, С.Г. Кадулин,
А.В. Кибардин, Л.С. Попов, С.Л. Киселев, Н.В. Гнучев
Институт биологии гена Российской академии наук,
Москва 119334; факс: (095) 1354105; e-mail: dna@biogen.msk.su*

РЕЗЮМЕ

Получено несколько популяций трансгенных мышей с помощью генетической конструкции, созданной на основе гена α S1-казеина крупного рогатого скота. Данная генетическая конструкция содержит фрагмент кДНК коллагена XVIII мыши, кодирующий полипептид эндостатин. Уровень секреции эндостатина в молоко достигал 0,6 г/л.

Введение. Среди онкологических заболеваний заметную часть составляют солидные метастазирующие опухоли. Традиционные методы лечения в первую очередь предлагают оперативное вмешательство. Однако, из практики известно, что в ряде случаев удаление первичной опухоли приводит к быстрому росту отдаленных метастазов. Этот факт натолкнул исследователей на мысль, что первичная опухоль своим присутствием в организме до определенного этапа развития ингибирует рост отдаленных метастазов. Это явление тесно связано с ангиогенезом. Ангиогенез - процесс развития новых кровеносных сосудов. В процессе своего развития опухоль прорастает сетью кровеносных сосудов, необходимых ей для питания. Ангиогенез практически не происходит в здоровом взрослом организме, однако, является одним из ключевых для развития опухоли и метастазов [9].

Ангиогенез - процесс многофакторный. Первичная опухоль способна вырабатывать как стимуляторы, так

и ингибиторы ангиогенеза, а ангиогенный фенотип является следствием конкретного соотношения этих факторов. Соотношение положительных и отрицательных факторов ангиогенеза в разных точках организма может быть разным и определяется удаленностью точки от первичной опухоли, скоростью синтеза и временем жизни этих факторов. Наблюдения показывают, что первичная опухоль способна стимулировать ангиогенез в своих собственных сосудах и ингибировать ангиогенез внутри метастазов и вторичных опухолей. Если предположить, что время жизни ингибиторов в циркуляции больше, чем время жизни стимуляторов, то кровеносных сосудов удаленных метастазов достигают только ингибиторы, и ангиогенез в них не происходит. Эта гипотеза была подтверждена экспериментально на животных моделях и такие ингибиторы ангиогенеза были выделены и охарактеризованы [16].

Одним из первых охарактеризованных факторов, блокирующих ангиогенез, стал 38 кДа белок - ингиби-

тор эндотелиальной пролиферации, названный ангиостатином. Он был выделен из сыворотки и мочи мышей - носителей опухоли LLC (Карциномы Легких Люис) с использованием нескольких стадий хроматографии. Микросеквенирование аминокислотной последовательности этого полипептида показало, что он гомологичен фрагменту плазминогена [15]. Аналогичным образом был получен и идентифицирован ингибитор эндотелиальной пролиферации выделяемый гемангиоэндотелиомой (ЕОМА). Им оказался 20 кДа полипептид идентичный С-концевому фрагменту коллагена XVIII [14].

Обнаруженные полипептиды были выделены и использованы в экспериментах на животных моделях. Оказалось, что периодические инъекции ангиостатина могут ингибировать рост, по крайней мере, еще трех (кроме LLC) разновидностей опухолей мыши, даже если терапию начинали, когда опухоль достигла 2% от веса животного [15]. Для дальнейших исследований были получены рекомбинантные ангиостатин и эндостатин в системах экспрессии E.coli и бакуловируса [15, 14].

Для получения достоверных результатов по терапии разных опухолей даже на мышах требуется довольно большое количество белка, и получение его из естественного источника крайне затруднительно и не эффективно. Рекомбинантный эндостатин, полученный в E.coli, выпал в осадок в нерастворимом виде [14]. Рекомбинантный эндостатин, полученный с использованием бакуловируса, специфически ингибировал пролиферацию эндотелиальных клеток и по характеру ингибирования полностью соответствовал природному продукту. Ингибирование происходило достаточно специфически, не наблюдалось ингибирования клеток не эндотелиального происхождения, в том числе ЕОМА-клеток [14].

В опытах на животных моделях было показано, что рекомбинантный эндостатин при введении 3 мкг на мышь в сутки ингибирует рост метастазов. При дозе 25 мкг на мышь в сутки рост опухоли ингибируется на 53%, доза 100 мкг на мышь в сутки ингибирует рост опухоли на 97%, при дозе 200 мкг на мышь в сутки в отдельных экспериментах удавалось добиться почти полной регрессии первичной опухоли [14]. В отдельной серии экспериментов мышам имплантировали V16F10-меланому, E241-фибросаркому, ЕОМА гемангиолиому и проводили терапию рекомбинантным эндостатином. Все привитые опухоли быстро регрессировали, и не было зафиксировано признаков токсичности ни в одной из обработанных эндостатином мышей [14].

Следовательно, использование ингибиторов ангиогенеза предоставляет уникальную возможность специфического воздействия на опухоль без оперативного вмешательства. В настоящее время опубликованы результаты первой стадии клинических испытаний препаратов рекомбинантного эндостатина [8, 11, 12].

Таким образом, эндостатин - ингибитор пролиферации эндотелиальных клеток и ангиогенеза, представляется очень перспективным для лечения целого ряда онкологических заболеваний. Существует несколько различных систем для получения рекомбинантного эндостатина. Каждая из этих систем имеет свои преимущ-

ества и недостатки.

В настоящее время одной из перспективных систем продукции биологически активных белков считается молочная железа трансгенных животных [5, 6, 10]. Молочная железа физиологически обладает огромным потенциалом синтеза белка, что является хорошей предпосылкой ее успешного использования для производства рекомбинантных продуктов. Трансгенные мыши являются традиционной модельной системой для предварительного исследования созданной генетической конструкции и проверки функциональности белкового продукта перед получением высокопродуктивных крупных трансгенных животных.

Используя полученную в нашей лаборатории генетическую конструкцию, мы получили восемь популяций трансгенных мышей, секретирующих рекомбинантный эндостатин в молоко.

Материалы и методы.

1. Ферменты и реактивы. В работе использовались ферменты, производимые фирмами Fermentas (Lithuania), Promega (USA), Gibco (USA) и реактивы производства фирм Sigma (USA), Qiagen (Germany) и Merck (Germany). Для радиоавтографии применялась пленка BioMax MS Kodak (UK) с соответствующими усиливающими экранами. Радиоавтография при определении первичной последовательности ДНК проводилась с использованием односторонней пленки BioMax MR Kodak. Стандартные праймеры (T7, T3 и Sp6 праймеры) были получены от Promega (USA). Остальные олигонуклеотиды были заказаны в фирме Синтол (Москва).

2. Выделение ДНК и РНК. Выделение геномной ДНК из образцов тканей мышей и тотальной РНК из тканей и органов мыши проводили как описано [17].

3. Агарозный гель-электрофорез ДНК и РНК. Гель-электрофорез ДНК проводился в 0.8-2.0% агарозном ТАЕ-геле с бромистым этидием как описано [17]. ДНК детектировалась в ультрафиолете (302 нм). Для экстракции фрагментов ДНК из геля использовался QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Гель-электрофорез РНК проводился с использованием Na-фосфатного буфера (pH=7,0) в 1,0% агарозном геле с формамидом в денатурирующих условиях как описано [17].

4. Приготовление раствора ДНК для микроинъекций. Генетическую конструкцию, представляющую собой фрагмент ДНК размером 7,5 т.п.н. отщепляли от плазмиды при помощи рестрикционной эндонуклеазы и разделяли в 0,7% агарозном геле. Для элюции фрагмента ДНК из агарозы использовали колонки фирмы Qiagen согласно прилагаемой методике. Для микроинъекций использовали раствор ДНК в концентрации 400 копий/пкл в буфере (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,25 mM EDTA).

5. Получение трансгенных мышей. Трансгенных мышей получали стандартным методом микроинъекции рекомбинантной ДНК в мужской пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки. В качестве доноров яйцеклеток использовали неполовозрелых самок (CBAxС57BL) F1, у которых проводили гормональную стимуляцию суперовуляции. После микроинъекции ооциты культивировали 1-2 часа *in vitro* (37°C, 5% CO₂) и трансплантировали псевдобеременным самкам

(СВА×С57ВL) F1, которых предварительно спаривали с вазэктомированными самцами [13].

Полученных первичных трансгенных мышей скрещивали с нетрансгенными (СВА×С57ВL) F1, для получения популяций трансгенных животных.

6. Анализ потомства на интеграцию конструкции. Идентификацию трансгенных мышей осуществляли с помощью Саузерн-блот анализа ДНК родившихся особей [17]. ДНК выделяли из хвостов. Для идентификации трансгенных животных, 100-200 нг ДНК расщепляли рестриктазой Xba1, разделяли в 1% агарозном геле, содержащем этидий бромид и переносили на мембрану Hybond-N (Amersham) в соответствии с рекомендациями производителя мембран. Фиксация ДНК на мембране проводилась облучением ее ультрафиолетом (302 нм) в течении 10 мин. Зонд для гибридизации (2000 п.н. фрагмент ДНК из 3'-области α S1-казеинового гена крупного рогатого скота) метили с использованием α P³²-dATP с помощью Prime-a-Gene Labeling System (Promega) и очищали от невключившихся нуклеотидов на PCR QIAquick Spin Column (Qiagen). Гибридизация мембран проводилась в буфере, содержащем 0.5 М Na-фосфат, pH 7.2; 7% SDS; 1 мМ ЭДТА, pH 8.0; 100 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося (Sigma) и меченный зонд ($1-6 \times 10^6$ cpm), при 65°C. После гибридизации мембраны отмывали в 0.1% SDS/2XSSC (0.3М NaCl, 30мМ Na-цитрат) при 65°C. Отмытые мембраны радиоавтографировались.

7. Анализ РНК. Фракционированную в агарозном геле РНК переносили на мембрану Hybond-N (Amersham) методом стандартного Ноузерн-блот переноса [17] с последующей гибридизацией с меченым фрагментом кДНК эндостатина мыши или с 2000 п.н. фрагментом ДНК из 3'-области α S1-казеинового гена крупного рогатого скота, как описано выше.

8. Анализ молока трансгенных животных. Молоко получали от лактирующих трансгенных самок на разных стадиях лактации (2, 5, 10, 15 и 20 дней). Для этого самку на 2,5-3 часа отсаживали от мышат, затем вводили 2/3 дозы наркоза и 0,5 ед. окситоцина [1]. После этого капилляром вручную сдаивали молоко и до исследования хранили его при -20°C.

Анализ проводили с помощью иммуноблотинга (Вестерн-блот анализ). Белки молока разделяли в 15% SDS-полиакриламидном геле с использованием триглицинового буфера как описано [17]. В качестве стандартов молекулярных весов использовали Prestained Protein Molecular Weight Standards (Gibco). После окончания гель-электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Immobilon-P (Millipore) с помощью T70 Semi-Dry Transfer Unit (Hoefel Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя оборудования. Для детекции эндостатина использовали антитела к 6xHis Tetra-His Antibody (Qiagen). Анализ иммобилизованных на мембране белков проводился с применением ECL Detection Reagents (Amersham) в соответствии с протоколом производителя.

Результаты и обсуждение. Молочная железа предназначена для синтеза большого количества белка. Опубликовано много исследований по созданию генетических конструкций для получения трансгенных животных, секретирующих в молоко гетерологичные белки [5, 6, 10]. Во всех ранее описанных исследовани-

ях в молоко секретировался продукт целого гена или полноразмерной кДНК. В нашем случае необходимо получить С-концевой фрагмент естественного полимера, и следовательно, в конструкции использовался фрагмент кДНК коллагена XVIII. Схема конструкции рVI-end описана ранее [2].

После проведенных микроинъекций было получено девять первичных трансгенных мышей. Идентификация трансгенных мышей осуществляли с помощью Саузерн-блот анализа (Рис 1).



1, 2, 3, 5 – пробы ДНК трансгенных мышей;
4 – проба ДНК нетрансгенной мыши;
6 – положительный контроль (ДНК плазмиды рVI-end);
7 – отрицательный контроль (ДНК нетрансгенной мыши)

Рис.1. Саузерн-блот-анализ ДНК потомства первичных трансгенных мышей по генетической конструкции рVI-end

Этот метод позволяет примерно оценить количество встроившихся копий рекомбинантной конструкции. У полученных нами трансгенных животных этот показатель составил 5-15 копий на геном. При последующих скрещиваниях, одна из первичных мышей не передавала трансгенный локус потомству и в дальнейших исследованиях не использовалась. От восьми оставшихся трансгенных мышей были получены восемь популяций трансгенных животных.

Самки мышей, начиная с первичных трансгенных животных и до третьего поколения, были протестированы на экспрессию введенной генетической конструкции. Для этого во время лактации у них брали молоко и определяли уровень секретируемого в него эндостатина. Рекомбинантный белок был детектирован в молоке трех поколений трансгенных животных (далее не проверяли). Уровень экспрессии колебался среди разных особей в пределах от 0,03 до 0,6 г /л.

Было замечено, что уровень экспрессии в одной из популяций трансгенных мышей зависит от стадии лактации. Максимальная экспрессия наблюдалась в первые дни лактации, а затем количество эндостатина в молоке быстро снижалось ниже уровня детекции (Рис. 2а). В остальных популяциях трансгенных мышей подобная закономерность не прослеживалась, и уровень экспрессии оставался примерно одинаковым на протяжении всего наблюдаемого периода лактации (Рис. 2б). Можно предположить, что изменение уровня экспрессии гена на разных стадиях лактации определяется генетическим окружением места интеграции конструкции в геноме. Из литературных источников известно, что активность гена САТ, находящегося под контролем регуляторных областей α S1-казеина, увеличивается до 12 дня лактации, а затем наблюдается падение его активности [7].

Уровень продукции рекомбинантного эндостатина в молоко полученных трансгенных животных дос-



а) популяция №2, F2:

1, 2 – положительный контроль: 100 нг и 500 нг рекомбинантного эндостатина, полученного в *E. coli* (при разделении в полиакриламидном геле, эндостатин, полученный в данной системе экспрессии, виден в виде двух полос; нижняя полоса является результатом неполного синтеза; указанное количество эндостатина содержится суммарно в двух полосах);
3 – отрицательный контроль (молоко нетрансгенной мыши);
4, 5, 6, 7 – пробы молока трансгенной самки, полученные на 2-й, 5-й, 10-й и 15-й дни лактации соответственно;

б) популяция №21, F3:

1 – положительный контроль (500нг рекомбинантного эндостатина),
2 – отрицательный контроль;
3, 4, 5 – пробы молока трансгенной мыши на 2-й, 5-й и 10-й дни лактации соответственно.

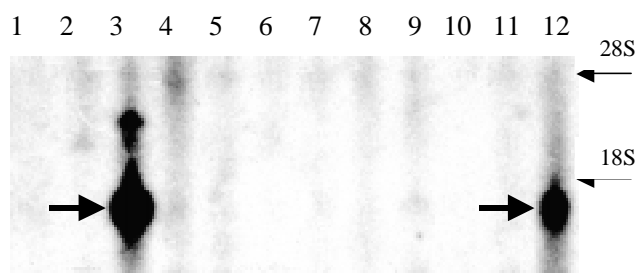
Рис.2. Вестерн-блот-анализ молока трансгенных самок мышей на разных стадиях лактации

тигал 0,6 г/л. Это больше, чем уровень продукции α S1-казеинового мини-гена (гена без интронов) под собственным промотором (0,01 г/л) [7], но меньше, чем таковой при использовании конструкции с полноразмерной геномной копией проколлагена типа I под контролем α S1-казеинового промотора (8 г/л) [19]. На настоящий момент существует набор средств для повышения уровня синтеза гетерологичного продукта. Возможно, нужно обратиться к попыткам синтезировать полноразмерный коллаген XVIII с последующим протеолитическим отщеплением эндостатина. Все это требует дальнейших разработок. Нам представляется важным подчеркнуть, что синтез значимых количеств эндостатина в молоке трансгенных животных возможен, несмотря на то, что эндостатин не является непосредственным продуктом гена, а лишь протеолитическим фрагментом естественного полимера (коллагена XVIII) [18].

Второе важное наблюдение заключается в следующем. Наш рекомбинантный продукт предположительно ингибирует ангиогенез. Мы еще не имеем полной информации о том, где и на какой стадии развития организма работает α S1-казеиновый промотор в естественных условиях, не говоря уже об искусственно созданной генетической кассете в чужеродном организме. Не исключена неспецифическая экспрессия нашей генетической конструкции в разных органах и на разных стадиях развития организма. А ведь именно в развивающемся организме так необходим процесс ангиогенеза. Поэтому полученные трансгенные мыши своим существованием позволяют надеяться, что наша конструкция работает достаточно специфично. Для проверки специфичности работы кассеты мы провели исследование РНК на присутствие интересующего нас транскрипта.

Для анализа РНК забирали органы от беременных и лактирующих трансгенных самок и выделяли из них РНК. РНК подвергали Нозерн-блот анализу. Результаты приведены на Рис. 3.

Положительный сигнал, соответствующий размеру рекомбинантной РНК (на Рис. 3, отмечено стрелками), как и предполагалось, наблюдается на дорожках, соответствующих молочной железе. Верхний сигнал на дорожке 3 соответствует эндогенному казеину. Всего было проанализировано 12 особей из разных популяций на разных стадиях беременности и лактации. Небольшой неспецифический уровень транскрипции был замечен у двух самок. У одной из самок (№386, популяция 91) положительный сигнал детектирован в поджелудочной железе (примерно 1% от уровня транскрипции в молочной железе), вторая самка (№33, популяция 18) - положительный сигнал в мышечной ткани и в мозге (менее 1% от уровня транскрипции в молочной железе). Анализ РНК из органов других самок этой же популяции и самок других популяций не обнаружил искомого транскрипта в аналогичных органах и тка-



1-9 – пробы РНК из органов самки №391 (популяция 91), 15-й день лактации: 1-сердце, 2-печень, 3-молочная железа, 4-легкое, 5-яичники, 6-брюшина, 7-почка, 8-селезенка, 9-мышцы;
10 – пропуск;
11, 12 – пробы РНК из органов беременной самки мыши №10 (популяция 18), 15-й день беременности: 11-плацента, 12-молочная железа

Рис.3. Нозерн-блот-анализ РНК из органов и тканей трансгенных лактирующей и беременной самок мышей

нях. Это позволяет нам предположить, что неспецифическая транскрипция с нашей генетической конструкции в двух описанных случаях является следствием генетических перестроек в геноме отмеченных самок (№386 и №33), а не следствием конструктивных особенностей нашей кассеты.

Известно, что тканеспецифичность экспрессии чужеродного гена в трансгенных животных зависит от длины используемого промоторного участка: более протяженные промоторные участки более специфичны. Для S1-казеина показано, что для специфической экспрессии в молочной железе достаточно протяженности промоторного участка ДНК в 1500 п.н. [4]. Мы в своей конструкции использовали промоторный участок α S1-казеина в 2000 п.н.

При использовании 1500 п.н. промоторного участка в генетических конструкциях для получения трансгенных кроликов молочная железа была единственным местом синтеза рекомбинантного продукта [4]. Использование промоторного участка α S1-казеина длиной 11 т.п.н., как и ожидалось, позволило получить трансгенных кроликов со специфической экспрессией рекомбинантного продукта только в молочной железе. Исследование РНК не обнаружило положительных сигналов в других проанализированных органах [3]. При получении трансгенных мышей с использованием репортерного гена CAT под α S1-казеиновым промотором длиной 1350 п.н. уровень экспрессии в различных органах трансгенных животных оценивался по активности гена CAT, что позволило авторам вести количественную оценку специфичности их генетической конструкции. Приведенные ими результаты показывают, что активность репортерного гена во всех проверенных органах кроме молочной железы находится на уровне фона [7].

Использование рекомбинантного продукта в экспериментах по ингибированию роста злокачественных образований требует тщательной очистки получаемого белка. Объем имевшихся в нашем распоряжении проб молока не позволил нам провести очистку продукта и оценить эффективность этого процесса, даже используя имеющийся на С-конце полученного эндостатина эпитоп 6xHis. Нами было установлено, что при проведении фракционирования молока (молоко разделяли центрифугированием: 15 минут, 15 000 об./мин.) на три фракции: казеины, сыворотку и жиры; эндостатин детектировался во фракции казеинов.

Для детального изучения биологической активности полученного в молоке эндостатина необходимо получение более крупных трансгенных животных. Одним из промежуточных вариантов является получение трансгенного кролика, который может обеспечить достаточное количество белка как для проведения функциональных тестов, так и для проведения мелкомасштабных испытаний.

Таким образом, нами показано, что сконструированная нами генетическая кассета pVI-end обеспечивает достаточно высокий уровень экспрессии эндостатина. Введенный ген экспрессируется у трансгенных самок в молочной железе в соответствии с используемым промотором, и рекомбинантный белок эндостатин секретируется в молоко лактирующих самок. Полученная конструкция способна эффективно интегрироваться в геном и стабильно передаваться по наслед-

ству вплоть до третьего поколения.

Работа поддерживалась грантами РФФИ и Московским Правительством.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биология развития млекопитающих. Методы. Под ред. Манк М. М.: Мир, 1990, с.-398.
2. *Завадская Е.С., Захарова Е.С., Кадулин С.Г. и др.* // Генетика, 2001, **37**, С. 1207-1212.
3. *Зиновьева Н.А., Безенфельдер У., Мюллер М., и др.* Исследование экспрессии IGF-1 человека у трансгенных кроликов. // Биотехнология, 1998, № 1, С. 3-11.
4. *Зиновьева Н.А., Безенфельдер У., Мюллер М., и др.* Трансгенные кролики как продуценты химозина крупного рогатого скота с молоком // Биотехнология, 1998, № 4, С. 17-31.
5. *Brem G., Beaufelder U., Hartl P.* Production of foreign proteins in the mammary glands of transgenic mammals // *Chimica Oggi.*, 1993, **11**, P. 21-25.
6. *Brem G., Hartl P., Beaufelder U., Wolf E. et al.* Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits // *Gene*, 1994, **149**, P. 351-355.
7. *Clarke R.A., Sokol D., Rigby N. et al.* Mamary gland-specific expression of bovine S1-casein-derived transgenes in mice. / *Transgenics*, 1994, **1**, P. 313-319.
8. *Eder J.P., Supko J.G., Clark J.W. et al.* Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. // *J.Clin.Oncol*, 2002, **20**, P. 3772-3784.
9. *Folkman J.* Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease // *Nature medicine*, 1995, **1**, P. 27-31.
10. *Hennighausen L.* The mammary gland as a bioreactor: production of foreign proteins in milk // *Protein expression and purification*, 1990, **1**, P.3-8.
11. *Herbst R.S., Hess K.R., Tran H.T. et al.* Phas I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. // *Clin.Oncol.*, 2002, **20**, P. 3792-3703.
12. *Herbst R.S., Mullani N.A., Davis D.W. et al.* Development of biologic markers of respons and assasment of antiangiogenic activity in clinical trial of human recombinant endostatin. // *Clin.Oncol.*, 2002, **20**, P. 3804-3814.
13. *Hogan B., Constantini F. and Lacy E.* // *Manipulating the mouse embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1986.
14. *O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y. et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth // *Cell.*, 1997, **88**, P. 277-285.
15. *O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y. et al.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis Lung Carcinoma // *Cell.*, 1994, **79**, P. 315-328.
16. *O'Reilly M.S., Rosenthal R., Sage E.H. et al.* The suppression of tumor metastases by a primary tumor // *Surg. Forum.*, 1993, **44**, P. 474-476.
17. *Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T.* Molecular cloning. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Ann Arbor, MI, 1989.
18. *Sasaki T., Hohenester E., Timpl R.* Structure and function of collagen-derived endostatin inhibitors of angiogenesis. // *IUBMB Life*, 2002, **53**, P. 77-82.
19. *Toman P.D., Chisholm G., McMullin H. et al.* Production of recombinant human type I procollagen homotrimer in the mammary gland of transgenic mice // *Transgenic Res.*, 1999, **8**, № 6, P. 415-427.