

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20 ____ р.

**СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
РЕКОМБІНАНТНОГО ФРАГМЕНТА В β N-ДОМЕНУ ФІБРИНОГЕНУ**

Випускна кваліфікаційна робота
студента денної форми навчання
за спеціальністю

Біотехнології та біоінженерія

Климкович Іванни-Марії Миколаївни

Науковий керівник від кафедри

д-р біол. наук, проф. Савчук О.М.

Робота виконана у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії
ім. О.В. Палладіна НАН України під керівництвом завідувача лабораторії
імунобіології, чл.-кор. НАН України Колиби Дениса Володимировича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2026 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ПТГ	–	ізопропілтіогалактопіранозид;
ОФ–ВЕРХ	–	обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія
CBD	–	calmodulin binding domains (кальмодулін-зв’язувальний домен);
DSP	–	downstream process (низхідний процес або етап очищення і формування препарату після біосинтезу);
EPO	–	erythropoietin (еритропоетин);
LB	–	Luria-Bertani broth (поживне середовище Лурія-Бертані);
PAI-1	–	інгібітор активатора плазміногену-1;
PAT	–	process analytical technology;
TF	–	тканинний фактор;
TFPI	–	інгібітор тканинного фактора;
tPA	–	тканинний активатор плазміногену;
QbD	–	concept «Quality by Design» (концепція «Якість через проєктування»);
USP	–	upstream process;
VLDLR	–	very-low-density-lipoprotein receptor (рецептор ліпопротеїнів дуже низької щільності).

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. Фібриноген, його функціональні домени та біотехнологічні підходи до одержання рекомбінантних білків	6
1.1. Регуляція гемостазу та роль фібриногену у коагуляційно-запальній відповіді	6
1.2. Структурна організація та функціональні властивості фібриногену	10
1.3. Роль βN -доменів у полімеризації фібрину та клітинних взаємодіях	12
1.4. Системи експресії та upstream-оптимізація рекомбінантних білків.....	16
1.5. Біотехнологічні підходи до очищення рекомбінантних білків	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	22
2.1. Матеріали.....	22
2.2. Методи.....	23
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	30
3.1. Отримання та характеристика рекомбінантного фрагмента фібриногену $\text{V}\beta(1-66)_2$	30
3.2. Отримання та характеристика пептиду $\text{V}\beta 1-42$	39
3.3. Порівняльна характеристика функціональної активності фрагментів $\text{V}\beta\text{N}$ -ділянки фібриногену.....	43
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ВСТУП

Сучасна біотехнологія виступає однією з провідних галузей науки, що активно розвивається на основі досягнень молекулярної біології, біохімії та генної інженерії. Вона відіграє важливу роль у розвитку медицини та фармацевтичної промисловості, зокрема у створенні нових діагностичних систем, вакцин та терапевтичних білків. Значну частину сучасних біофармацевтичних препаратів становлять рекомбінантні білки, отримані за допомогою генної інженерії [1].

Отримання рекомбінантних білків або їх окремих функціональних фрагментів – це важливий інструмент сучасних біомедичних досліджень, що дозволяє аналізувати їхні властивості та оцінювати перспективи практичного використання таких молекул. Особливий інтерес становлять білки, що беруть участь у регуляції гемостазу та пов'язаних із ним запальних процесів.

Серед компонентів системи гемостазу важливе місце займає фібриноген – розчинний глікопротеїн плазми крові, який відіграє ключову роль у коагуляційному процесі [2]. Після відщеплення фібринопептидів від фібриногену окремі ділянки його молекули набувають доступності та можуть проявляти біологічну активність, пов'язану з регуляцією коагуляційних, клітинних і запальних процесів. Це зумовлює інтерес до відповідних структурних фрагментів фібриногену як до потенційних біологічно активних молекул.

Отримання таких фрагментів у рекомбінантній формі відкриває можливість детального аналізу їхніх властивостей, оцінки функціональної активності, оптимізації та подальшого дослідження перспектив їх застосування у біомедичних розробках.

Метою даної роботи було отримання та аналіз біологічних властивостей рекомбінантного фрагмента В β N-домену фібриногену для досліджень його терапевтичного потенціалу. Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Отримати електрофоретично чистий рекомбінантний фрагмента В β N-домену фібриногену.
2. Одержати електрофоретично чистий пептид В β 1–42 з молекули фібриногену.
3. Переконатися у специфічності та функціональності отриманих фрагментів.
4. Провести порівняльний аналіз біологічних властивостей рекомбінантного фрагмента В β N-домену фібриногену та пептидного фрагмента В β 1–42, виділеного з молекули фібриногену.

РОЗДІЛ 1

ФІБРИНОГЕН, ЙОГО ФУНКЦІОНАЛЬНІ ДОМЕНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ

1.1. Регуляція гемостазу та роль фібриногену у коагуляційно-запальній відповіді

Гемостаз являє собою багатокомпонентну регуляторну систему, що забезпечує ефективну зупинку кровотечі при ушкодженні судинної стінки, в межах якої коагуляційна відповідь ініціюється локально в зоні ушкодження та просторово обмежується ендотеліальними й плазмовими антикоагулянтними механізмами. На молекулярному рівні гемостатична відповідь формується взаємодією первинного гемостазу (судинно-тромбоцитарної ланки), вторинного (коагуляційного) гемостазу та системи фібринолізу, узгоджена взаємодія яких визначає формування, стабілізацію та контрольовану деградацію фібринового згустку [2].

Первинний гемостаз є результатом складних взаємодій між тромбоцитами, судинною стінкою і адгезивними білками, що призводить до утворення первинного тромбоцитарного тромбу. Процес ініціюється адгезією циркулюючих тромбоцитів до субендотеліальних компонентів судинної стінки, експонованих унаслідок ушкодження ендотелію. В умовах інтенсивного кровотоку ключову роль у процесі відіграє фактор фон Віллебранда – мультимерний глікопротеїн, який зв'язується з колагеном субендотеліального шару завдяки А3-доміну та опосередковує захоплення тромбоцитів, взаємодіючи з рецепторним комплексом GPIb-IX-V на їх поверхні. Подальша стабілізація адгезії забезпечується прямою взаємодією колагену з тромбоцитарними рецепторами GPVI та інтегрином $\alpha 2\beta 1$ (GPIa/IIa), що призводить до активації внутрішньоклітинних сигнальних

шляхів, зміни конформації інтегрину $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GPIIb/IIIa) та подальшої агрегації тромбоцитів денної (заочної) форми навчання [2, 3].

Вторинний гемостаз – багатоетапний ферментативний процес, у якому беруть участь білки плазми крові і тканин, надмолекулярні структури та іони кальцію. Протеолітична активація факторів зсідання крові призводить до локального накопичення активного тромбіну, який виступає центральним ферментом коагуляційного процесу [4, 5]. Тромбін каталізує відщеплення фібринопептидів А і В від молекули фібриногену, внаслідок чого утворюються фібринові мономери, здатні до самозбирання у полімерну сітку [4]. Утворений фібрин стабілізує тромбоцитарну пробку. Одночасно тромбін активує фактор XIII, що забезпечує ковалентне зшивання фібринових волокон і підвищує механічну стійкість та резистентність згустку до фібринолізу [5, 6]. Таким чином, система зсідання крові перетворює нестабільне скупчення тромбоцитів на щільно організований фібриновий згусток, який герметизує ушкоджену ділянку судинної стінки [2].

Формування фібринового згустку супроводжується одночасною активацією антикоагулянтних механізмів, які здійснюють контроль швидкості активації коагуляційних факторів і реакцій між ними, тим самим просторово обмежуючи поширення процесу тромбоутворення за межі ділянки ушкодження. Ключову роль у цьому процесі відіграють антитромбін III, система протеїну С та інгібітор тканинного фактора (TFPI), які інактивують активні коагуляційні фактори та знижують подальшу генерацію тромбіну, зокрема шляхом пригнічення активності комплексу тканинного фактора (TF) з фактором VIIa [2, 7]. Узгоджена дія про- та антикоагулянтних механізмів забезпечує формування стабільного локалізованого фібринового згустку без розвитку системного тромбоутворення.

Завершальним етапом гемостатичної відповіді є фібриноліз – контрольована деградація фібринового згустку під дією плазіну, який утворюється з плазіногену за участю тканинного та урокіназного активаторів плазіногену. Ефективність фібринолізу визначається структурою

фібринового згустку, яка залежить від концентрацій фібриногену і тромбіну в процесі утворення полімеру, ступенем його зшивання та присутністю інгібіторів, зокрема інгібітора активатора плазміногену-1 (РАІ-1), що набуває особливого значення в умовах системного запалення [8].

У сучасній біомедичній літературі гемостаз розглядають як складову тромбо-запальної осі, у межах якої коагуляційні реакції, активація клітин крові та запальні сигнальні шляхи функціонують як єдина мережа. Запальні медіатори, активовані лейкоцити та нейтрофільні позаклітинні пастки здатні посилювати коагуляцію, тоді як компоненти коагуляційної системи впливають на клітинні реакції імунної відповіді. Порушення цієї регуляції асоціюється з розвитком тромбозів, ішемічного ураження тканин і органної дисфункції [9].

Ендотелій судин виступає інтегративним елементом системи гемостазу, поєднуючи механізми коагуляції, фібринолізу та запальної відповіді. В інтактному стані ендотеліальні клітини підтримують антитромботичний фенотип шляхом експресії поверхневих антикоагулянтних молекул, зокрема гепарансульфатів, які посилюють активність антитромбіну ІІІ, а також тромбомодуліну, що забезпечує активацію протеїну С та інгібування факторів Va та VIIIa [2].

Додатково ендотелій синтезує тканинний активатор плазміногену (tРА) і тим самим сприяє локальному фібринолізу та запобігає надмірному накопиченню фібрину в судинному руслі [2].

При ушкодженні або активації ендотелію відбувається функціональне перемикання його фенотипу з антитромботичного на прокоагулянтний. Це супроводжується індукцією експресії тканинного фактора, зниженням активності системи протеїну С та підвищенням рівня РАІ-1, що призводить до пригнічення фібринолізу [2].

У таких умовах ендотелій не лише втрачає здатність обмежувати коагуляцію, але й активно сприяє локальному утворенню тромбу.

Фібриноген і фібрин відіграють ключову роль у взаємодії між ендотелієм та коагуляційною системою. Після перетворення фібриногену на фібрин утворюється тривимірна фібринова сітка, яка безпосередньо контактує з поверхнею ендотеліальних клітин, формуючи тимчасовий позаклітинний матрикс. Цей матрикс забезпечує адгезію, міграцію та активацію ендотелію, а також регулює проникність судинної стінки в зоні ушкодження [10].

Структурні властивості фібрину, зокрема щільність полімерної сітки та ступінь її зшивання фактором XIIIa, безпосередньо впливають на функціональний стан ендотелію та ефективність подальшого фібринолізу [10].

За умов запалення або окисного стресу ендотеліальні клітини стають джерелом прозапальних цитокінів і активних форм кисню, що модифікують фібриноген та змінюють властивості утвореного фібрину. Окиснені форми фібриногену сприяють формуванню більш щільних, малопроникних фібринових згустків, стійкіших до фібринолізу, що посилюють тромбогенний потенціал ендотелію [11].

Такі зміни розглядають як один із ключових механізмів ендотеліальної дисфункції при хронічних запальних та серцево-судинних захворюваннях.

Отже, ендотелій виступає динамічним регулятором гемостатичної рівноваги. Його функціональний стан визначає локальну інтенсивність утворення фібрину, ефективність фібринолізу та ступінь залучення запальних механізмів, формуючи молекулярний контекст, у якому реалізуються біологічні ефекти окремих доменів фібриногену.

Фібриноген, у свою чергу, розглядається не лише як попередник фібрину, але як ключовий функціональний компонент системи гемостазу, властивості якого визначають архітектуру згустку, чутливість до фібринолізу та взаємодію з клітинними елементами. Сучасні дослідження демонструють, що структурні зміни фібриногену, зокрема в умовах окисного стресу, здатні істотно модифікувати перебіг коагуляції та сприяти формуванню протромботичного фенотипу згустку [11].

Отже, система гемостазу являє собою інтегровану коагуляційно-запальну мережу, в якій фібриноген займає центральне місце як структурний і регуляторний елемент, з чим пов'язано методологічне підґрунтя для подальшого детального аналізу його окремих структурних доменів та визначення їх ролі у фізіологічних і патологічних процесах.

1.2. Структурна організація та функціональні властивості фібриногену

Фібриноген належить до ключових білків плазми крові, що забезпечують реалізацію низки біологічних механізмів, спрямованих на підтримання стабільності внутрішнього середовища організму [2, 3]. Основна функція фібриногену в гемостазі полягає в участі у процесі зсідання крові: активація коагуляційного каскаду після пошкодження судин призводить до генерації тромбіну, під дією якого фібриноген перетворюється на фібрин, який формує каркас тромбу для зупинки кровотечі. Однак крім цього, фібриноген відіграє важливу роль у фібринолізі, репаративних і запальних процесах, ангиогенезі, метастазуванні, у взаємодії клітин і матриксу, визначає процес агрегації тромбоцитів, еритроцитів і впливає на адгезію лейкоцитів. Фібриноген досить інертний у кровообігу; однак, він стає дуже реакційноздатним після перетворення на мономерний, а потім на полімерний фібрин. Зокрема, фібринові полімери у згустках крові, що осідають на рані, активують фібринолітичну систему та слугують тимчасовою матрицею, на якій різні типи клітин адгезують, мігрують та проліферують під час загоєння рани, щоб зрештою замінити згустки крові природними тканинами. Такий поліфункціональний характер фібриногену пов'язано з його мультидоменною структурою, в якій окремі домени, що містять різні сайти зв'язування, беруть участь у численних взаємодіях, тим самим забезпечуючи засоби для участі фібриногену у вищезгаданих процесах.

Молекула фібриногену – димер, що складається з двох ідентичних субодиниць, кожна з яких утворена тримерами ланцюгів $A\alpha$, $B\beta$ і γ , з'єднаних між собою низкою між- та внутрішньоланцюгових дисульфідних зв'язків. Відповідно до сучасної номенклатури молекулу фібриногену поділяють на три основні регіони: центральний регіон E та периферичні регіони D, що розташовані на дистальних кінцях молекули фібриногену. Дві третини кожного $A\alpha$ -ланцюга формують гнучкі αC -регіони, які відігнуті назад і нековалентно зв'язані з E-регіоном. Кожен із регіонів характеризується складною субдоменною організацією. N-кінцеві ділянки ланцюгів, що містять фібринопептиди A і B, формують центральний E-регіон, тоді як C-кінцеві ділянки ланцюгів утворюють два D-регіони, які розташовано за схемою D–E–D [12, 13]. E- та D-регіони з'єднані конекторними α -спіралями із потрібною структурою та сформовані відповідно залишками кожного з ланцюгів $A\alpha$ $B\beta$ та γ . Доменна організація забезпечує взаємодію з лігандами та клітинними рецепторами [12].

Протеолітична дія тромбіну ініціює полімеризацію фібрину з утворенням протопібрил і подальшим формуванням фібринової мережі [12].

Функціональні властивості фібриногену визначаються також його структурною варіабельністю, зокрема наявністю γ' -ізоформи, що становить близько 8–15 % плазмового фібриногену та модулює взаємодію з тромбіном і архітектуру тромбу [12]. Окрім гемостатичної ролі, фібриноген взаємодіє з позаклітинним матриксом через послідовність $B\beta(15-42)$ і бере участь у клітинних процесах за участю факторів росту [12, 13].

Ковалентне зшивання фібрину під дією фактора XIII підвищує стабільність тромбу [12]. Водночас взаємодія фібриногену з $\alpha M\beta 2$ -рецепторами лейкоцитів пов'язує його функції з регуляцією запалення, а генетичні варіації цього білка асоціюються з ризиком тромботичних і геморагічних порушень [12-14].

1.3. Роль В β N-доменив у полімеризації фібрину та клітинних взаємодіях

Розширений аналіз структурної організації фібриногену дозволив виділити В β N-домени як функціонально значущі елементи молекули, залучені до ключових міжмолекулярних взаємодій [12, 15]. Ці домени формуються N-кінцевими ділянками В β -ланцюгів і охоплюють залишки В β (1–64), з'єднані з основною частиною молекули через дисульфідний зв'язок β Cys65– α Cys36. Після протеолітичного відщеплення фібринопептидів В тромбіном відповідні ділянки фібрину представлені фрагментом В β (15–64) і позначаються як β N-домени [15-17].

У неактивованому фібриногені В β N-домени вважаються структурно неупорядкованими, однак у складі інтактної молекули їхня конформація може частково стабілізуватися завдяки внутрішньомолекулярним взаємодіям. Активація фібриногену супроводжується експозицією ділянки В β (15–64), що надає цим доменам функціональної активності та забезпечує їхню участь у формуванні фібринового згустку і подальших міжмолекулярних контактах, які визначають його властивості [7, 15-18].

В β N-домени фібриногену та фібрину залучені до кількох взаємопов'язаних процесів, що визначають властивості фібринового згустку та його взаємодію з клітинними системами [12, 15, 18].

В β N-домени фібриногену відіграють важливу роль у формуванні фібринового згустку. Їх участь у процесі полімеризації фібрину визначає як швидкість збирання полімеру, так і просторову організацію та механічну стабільність згустку. Після активації фібриногену тромбіном і відщеплення фібринопептиду А процес полімеризації фібрину відбувається, однак утворений згусток характеризується низькою щільністю та підвищеною чутливістю до фібринолізу. Подальше видалення фібринопептиду В суттєво змінює перебіг цього процесу, посилюючи міжмолекулярні асоціації та сприяючи формуванню стабільної тривимірної фібринової сітки [12, 15, 16].

Функціонально це пов'язано з експонуванням βN -доменів, що формуються N-кінцевими ділянками $B\beta$ -ланцюгів після відщеплення фібринопептиду В. Саме ці домени беруть участь у комплементарних взаємодіях типу «В»–«b», які разом із взаємодіями «А»–«a» забезпечують латеральну асоціацію фібринових мономерів [12, 15]. Порушення структури βN -доменів або мутації критичних амінокислот у цій ділянці призводять до зниження ефективності полімеризації та формування морфологічно і функціонально дефектних згустків. Експерименти з сайт-спрямованим мутагенезом показали, що заміна His16 або Arg17 у $B\beta$ -ланцюгах супроводжується уповільненням полімеризації та підвищеною схильністю згустків до лізису, що підкреслює роль цих залишків у регуляції доступу тромбіну та стабілізації полімеру [15-17].

Окрім прямої участі у формуванні фібринового згустку, експоновані βN -домени забезпечують взаємодію фібрину з низкою регуляторних молекул, зокрема з гепарином. Після видалення фібринопептиду В афінність фібрин(оген)у до гепарину суттєво зростає, що пов'язано з відкриттям позитивно заряджених ділянок у межах послідовності $B\beta(15-66)$ [12, 15]. Ця взаємодія має важливе значення для модуляції активності тромбіну, оскільки гепарин, зв'язуючись із фібрином, посилює свою взаємодію з антитромбіном III і обмежує подальшу генерацію активного ферменту. Експериментальні дані свідчать про триразове зростання спорідненості фібрин(оген)у до гепарину після відщеплення фібринопептиду В, що підтверджує функціональну значущість активації βN -доменів у регуляції гемостазу. При цьому димерні форми βN -доменів демонструють значно вищу афінність до гепарину порівняно з мономерними фрагментами, що вказує на роль димерної організації у формуванні ефективного зв'язувального інтерфейсу [15].

Експонування βN -доменів після активації фібриногену створює умови для взаємодії фібрину з клітинними рецепторами ендотелію. Одним із перших описаних напрямів є взаємодія βN -доменів з VE-кадгерином, що пов'язана з

регуляцією фібрин-залежного ангіогенезу. Показано, що димерні β N-фрагменти, які відтворюють просторову організацію доменів у складі фібрину, здатні з високою афінністю зв'язуватися з третім позаклітинним доменом VE-кадгерину. Ключову роль у цьому процесі відіграють амінокислотні залишки His16 та Arg17 β N-домену, мутація яких призводить до значного послаблення або втрати зв'язування. Через цей механізм фібрин може сприяти формуванню капіляроподібних структур та брати участь у процесах ангіогенезу і загоєння тканин [12, 16, 18].

Паралельно було показано, що β N-домени фібрину залучені до регуляції запалення, зокрема через вплив на трансендотеліальну міграцію лейкоцитів. Спочатку було запропоновано модель прямого інгібування, згідно з якою пептид β (15–42) конкурує з фрагментом E1 за зв'язування з VE-кадгериним, зменшуючи міграцію лейкоцитів [15, 16, 19]. Однак подальші кількісні дослідження показали, що мономерний β (15–42) має низьку спорідненість до VE-кадгерину і не може ефективно конкурувати з E1-фрагментом. Це поставило під сумнів механізм прямого інгібування та зумовило пошук альтернативних шляхів [16].

У межах цих досліджень було встановлено, що β N-домени фібрину здатні взаємодіяти також з N-кадгериним, іншим представником родини класичних кадгеринів. Димерний рекомбінантний фрагмент $(\beta$ 15–66)₂, який імітує природну організацію β N-доменів у фібрині, зв'язується з позаклітинними доменами EC3 та EC5 N-кадгерину (рис. 1.1). Критичними для цієї взаємодії є залишки His16 та Arg17 β N-домену, тоді як у структурі N-кадгерину важливу роль відіграють негативно заряджені Asp/Glu-залишки у відповідних позаклітинних доменах. Хоча функціональне значення цієї взаємодії ще остаточно не визначене, припускається її участь у регуляції міжклітинних контактів та процесів судинної морфогенези [17].

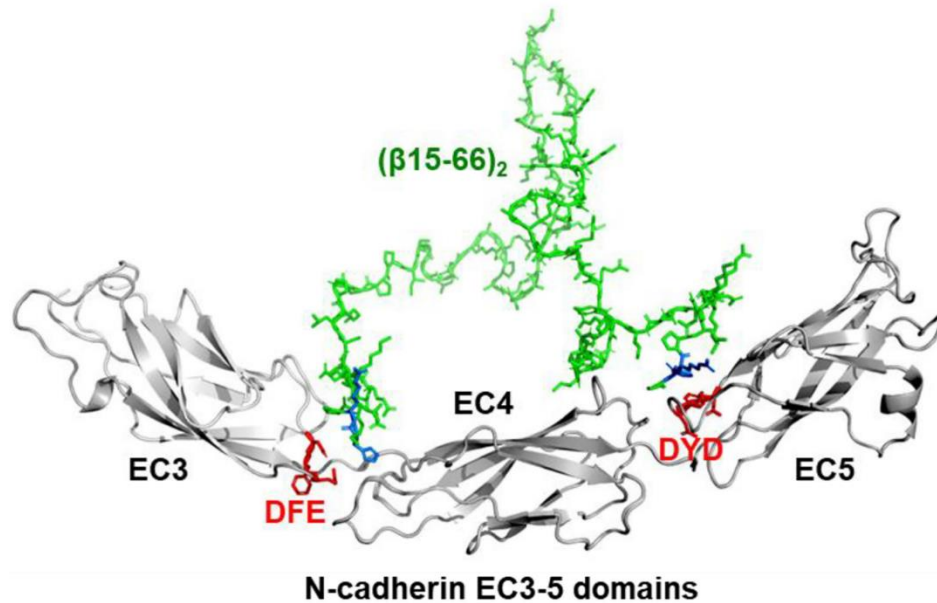


Рис. 1.1. Модель, що ілюструє запропоновану взаємодію між димерним фрагментом фібрину $(\beta 15-66)_2$ та фрагментом N-cad(3-5). Три позаклітинні домени N-кадгерину зображені у вигляді сірої стрічки. Залишки, що зв'язують фібрин, DFE та DYD, локалізовані на межах EC3-EC4 [17]

Подальші дослідження дозволили ідентифікувати рецептор ліпопротеїнів дуже низької щільності (VLDLR) як функціонально значущий партнера β N-домених фібрину. Встановлено, що димерні β N-домени взаємодіють з CR-доменами VLDLR, і ця взаємодія є іонозалежною та опосередкованою кластерами позитивно заряджених Lys/Arg-залишків. Активація VLDLR-залежного сигнального шляху призводить до змін у внутрішньоклітинній сигналізації ендотеліальних клітин, зокрема до модифікації активності Src-кінази Fyn і RhoA, що в кінцевому підсумку впливає на проникність ендотеліального бар'єра та міграцію лейкоцитів [14, 15, 20]. Саме цей механізм нині розглядається як основний у реалізації протизапальної дії фрагментів $B\beta(15-42)$ та споріднених димерних форм.

Тобто, $B\beta$ N-домени фібриногену являють собою багатфункціональні структурні елементи, які після активації фібриногену координують формування стабільного фібринового згустку та забезпечують його взаємодію

з регуляторними молекулами і клітинними рецепторами. Їх участь у полімеризації фібрину, гепарин-залежній регуляції тромбінового шляху, ангіогенезі та запаленні підкреслює фундаментальне і прикладне значення цих доменів для розуміння патофізіології гемостазу та розробки нових терапевтичних підходів [12, 15].

1.4. Системи експресії та Upstream-оптимізація рекомбінантних білків

Розвиток біотехнологій у фармацевтичній та медичній галузях тісно пов'язаний із впровадженням рекомбінантних білків, які стали основою значної частини біофармацевтичних препаратів. Їх застосування суттєво розширило можливості терапії онкологічних, ендокринних та аутоімунних захворювань [21, 22].

Промислове отримання рекомбінантних білків як активних фармацевтичних інгредієнтів включає два послідовних етапи: Upstream Process (USP), що охоплює біосинтез продукту, та Downstream Process (DSP), який відповідає за його виділення і очищення [22-24].

USP включає вибір відповідної системи експресії, конструювання та підготовку плазмідного вектора, трансформацію або трансфекцію клітин, відбір продуктивних клонів і оптимізацію умов культивування. На цьому етапі визначають критичні параметри росту клітин, зокрема склад культурального середовища, температуру, рН, рівень аерації та подачу поживних компонентів, що безпосередньо впливають на рівень експресії продукту [22, 25].

Вибір продуцента відіграє центральну роль у межах USP, оскільки клітина-господар на ефективність експресії білка, стабільність, здатність до коректного фолдингу, формування дисульфідних зв'язків, глікозилювання та інших посттрансляційних модифікацій, а також на технологічну придатність до подальшого очищення. Прокаріотичні системи привабливі швидким ростом, простотою та низькою собівартістю, але вони обмежені у синтезі

складних еукаріотичних білків, а також потребують суворого контролю бактеріальних домішок, зокрема ендотоксинів, при виробництві терапевтичних продуктів [22]. Натомість еукаріотичні системи (передусім клітини ссавців) частіше обирають для структурно складних білків, де критичні глікозилювання і правильна просторова організація, однак вони потребують спеціалізованих культуральних середовищ, суворого контролю умов культивування та посиленого мікробіологічного контролю через ризик контамінацій [23, 26]. Проміжне місце часто займають дріжджі, що поєднують відносну технологічну простоту з можливістю процесингу білків, хоча профіль глікозилювання та домішок потребує контролю і може ускладнювати очищення [22].

Попри наявність альтернатив, *E. coli* залишається найпоширенішим продуцентом рекомбінантних білків завдяки високій швидкості росту, технологічній простоті та добре вивченій генетиці, що робить систему придатною для лабораторної оптимізації експресії та подальшого масштабування відповідних рекомбінантних білків [26, 27]. Практична цінність системи *E. coli* підсилюється наявністю різноманітних експресійних векторів і регульованих промоторів (зокрема рЕТ-серії з T7/lac-контролем, рBAD-системи), що дозволяють керувати рівнем експресії та знижувати токсичність для клітини-господаря, а також широким вибором інженерних штамів, адаптованих до конкретних технологічних задач (BL21(DE3), Rosetta(DE3), Origami(DE3), SHuffle, Lemo21(DE3)). До типових обмежень *E. coli* належать відсутність еукаріотичних посттрансляційних модифікацій, утворення тілець включень і, а також необхідність ефективного видалення ендотоксинів. Для зменшення цих ризиків використовують інженерні рішення: підбір штаму, керований рівень індукції, коекспресію шаперонів, а також мітки злиття, що підвищують розчинність і полегшують подальшу очистку (His, MBP, GST, SUMO, TRX тощо) [26-30].

Окремою перевагою *E. coli* виступає різноманіття штамів, оптимізованих під різні класи білків. BL21 (DE3) та похідні часто застосовують як базові

продуценти завдяки зниженій протеолітичній деградації; Rosetta (DE3) корисний для генів із рідкісними кодонами, оскільки забезпечує додаткові тРНК; Origami (DE3) та SHuffle створені для покращення формування дисульфідних зв'язків у цитоплазмі, а Lemo21 (DE3) дозволяє тонко регулювати інтенсивність T7-залежної експресії для токсичних або “чутливих” білків. Вибір штаму входить до етапу оптимізації USP, оскільки прямо впливає на співвідношення “вихід продукту – розчинність – профіль домішок” і, відповідно, на складність DSP [26-28].

Керованість експресії в бактеріальних системах значною мірою визначається промотором і принципом індукції. Широкого використання набули lac-похідні промотори та систему lac-T7 (DE3), характерні для рЕТ-векторів, де транскрипція цільового гена запускається після індукції (наприклад, IPTG) через експресію T7 РНК-полімерази і подальшу роботу T7-промотора на векторі. Для випадків, коли потрібне більш “м'яке” або градуйоване керування, застосовують альтернативні системи, зокрема рBAD із індукцією L-арабінозою, а також температурно-індуковані системи на основі промоторів фага λ (pL/pR), де запуск транскрипції пов'язано зі зміною температури та інактивацією репресора. Окремий напрямок становлять автоіндукційні підходи, що зменшують потребу в ручному контролі індукції та полегшують відтворюваність процесу [26, 28].

Для зменшення ризиків контамінації, генетичного дрейфу та втрати експресійної здатності застосовують систему клітинних банків, що включає дослідницькі, головні (Master Cell Bank) та робочі (Working Cell Bank) банки. Клітини головного банку підлягають криоконсервуванню за строго контрольованих умов, після чого використовуються для формування робочих банків, безпосередньо задіяних при дослідженнях чи виробництві. Такий підхід підсилює відтворюваність серій і робить процес керованим з позиції якості [31].

Культивацію проводять з використанням різних режимів: періодичному, періодичному з підживленням, безперервному та перфузійному. Найчастіше в

промисловості використовують періодичне культивування з підживленням як компроміс між продуктивністю та керованістю процесу [23, 32]. Безперервні та перфузійні підходи дають змогу підтримувати більш стабільні умови й високі концентрації клітин, однак потребують складного контролю і мають вищі ризики контамінації та генетичної нестабільності, що обмежує їх застосування [22, 24, 26].

Сучасні підходи зосереджено на інтенсифікації USP, зокрема використанні систем високої щільності клітин, одноразових біореакторів та мікрофлюїдних платформ для мініатюризації й прискорення біопроектної оптимізації [22, 30, 33]. Оптимізований процес масштабують від лабораторного рівня до пілотного й промислового, забезпечуючи відтворюваність та відповідність вимогам якості і регуляторним стандартам [21, 23].

1.5. Біотехнологічні підходи до очищення рекомбінантних білків

DSP охоплює процеси виділення, концентрування та очищення продукту до необхідного рівня чистоти й стабільності [34, 35]. Складність DSP зумовлена тим, що продукт міститься у складній біологічній суміші, яка включає білки клітини-господаря, нуклеїнові кислоти, ендотоксини та інші споріднені домішки [23, 35].

Початкові стадії DSP спрямовані на отримання матеріалу для подальшого очищення і залежать від локалізації продукту. У випадку внутрішньоклітинної експресії клітинну масу руйнують механічними (високотискова гомогенізація, бісерне подрібнення, ультразвук) або хімічними методами з використанням детергентів і хелатуючих агентів, після чого проводять первинну сепарацію

(центрифугування, глибинна фільтрація, ультра- або діафільтрація) [23, 36]. Якщо білок секретується у культуральне середовище, клітини відокремлюють центрифугуванням або фільтрацією, після чого супернатант концентрують мембранними методами, зокрема ультрафільтрацією або діафільтрацією [36, 37].

У разі накопичення білка у вигляді тілець включення його спочатку солюбілізують у присутності хаотропних агентів (сечовини або гуанідину гідрохлориду) чи іонних детергентів, за потреби з додаванням відновників для корекції дисульфідних зв'язків. Після цього проводять контрольований рефолдинг шляхом поступового зниження умов денатурації розведенням або діалізом з введенням окисно-відновних пар для формування правильної структури білка [23, 31]. На всіх підетапах ключовою вимогою залишається збереження нативного стану та активності білка, що визначає підбір буферів, іонної сили, рН, стабілізаторів і температурних режимів [34].

Основу очищення у DSP зазвичай становить комбінація хроматографічних методів, які можуть розділяти компоненти за зарядом, спорідненістю, гідрофобними властивостями або розміром [38, 39]. Афінна хроматографія ґрунтується на специфічній взаємодії молекули з лігандом сорбенту та дозволяє селективно виділяти продукт із суміші, наприклад ІМАС для His-тегованих білків [36, 39, 40]. Іонообмінну хроматографію використовують для розділення компонентів за зарядом і видалення білків клітини-господаря, ДНК та частини ендотоксинів [34, 36, 39, 41]. Гідрофобна хроматографія ґрунтується на відмінностях у силі гідрофобної взаємодії молекул із лігандами сорбенту. Ексклюзивна хроматографія (гель-фільтрація) розділяє компоненти суміші за молекулярним розміром, що дозволяє видаляти агрегати та інші домішки. Для аналітичного контролю або очищення невеликих і стабільних білків також застосовують обернено-фазову високоефективну рідинну хроматографію (ОФ–ВЕРХ) [36, 39, 42]. Для підвищення ефективності процесу та зменшення витрат сорбенту застосовують багатоклонні безперервні схеми хроматографії [43].

Актуальні тренди DSP включають перехід до безперервного або напівбезперервного очищення, а також ширше використання автоматизованих платформ для підвищення відтворюваності процесу [35, 38]. Додатково розвиваються мембранні технології, зокрема ультра- та нанофільтрація, як інструмент концентрування, знесолення та доочищення продукту [37]. Інтеграція процесно-аналітичних технологій (PAT, Process Analytical Technology) та принципів Quality by Design (QbD) розглядається як перспективний напрям оптимізації DSP [25].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали

Роботу виконано на базі лабораторії імунології відділу молекулярної імунобіології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Перелік реактивів, що були використані у роботі: бактеріологічні петлі, середовища для бактерій LB, ППТГ (Thermo Scientific), чашки Петрі, агароза, агар («Sigma», США), ППТГ (Thermo Scientific), тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), персульфат амонію, трицин, β -меркаптоетанол, акриламід, N, N'-метилен-біс-акриламід («Sigma-Aldrich», США), сечовину, бром феноловий синій, кумасі блакитний G-250, додецилсульфат натрію (ДСН) («Sigma-Aldrich», США), трис(гідроксиметил)амінометан (Tris), трис-НСl, нітроцелюлоза («Amersham Biosciences», США), гліцерин, НСl, NaOH, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), (Міранда-С, Україна), глюкоза, ампіцилін (Київмедпрепарат, Україна), гепарин-агароза («Sigma-Aldrich», H6508), маркери для електрофорезу протеїнів та нуклеїнових кислот, коктейль інгібіторів протеїназ (prod #1861279, Thermo Scientific), одноразовий лабораторний посуд (Delta Lab, Іспанія) та інші реактиви кваліфікації х.ч. або ч.д.а. У дослідженні застосовували моноклональні мишачі антитіла 2d2a, специфічні до $\text{V}\beta\text{N}$ -домену фібриногену, які було люб'язно надано співробітниками відділу структури та функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Як вторинні використовували анти-мишачі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma, США).

Обладнання: Орбітальний шейкер-термостат ES-20, камера для вертикального електрофорезу (Bio-Rad, США), прилад для електропорації Electroporator 2510 (Eppendorf, Німеччина), ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, Німеччина), спектрофотометр GeneQuantoPro

(Amersham Biosciences, США), шафа-ламінар (Holten, Франція), спектрофлуориметр QuantaMaster 400 (Photon Technology International, Канада), мікроцентрифуга A-14 (Joan, Франція), рН-метр CyberScan 510 (Eutech Instruments, Сінгапур), охолоджувач SC-2М та нагрівач зразків TDD-120 (Biosan, Латвія), аналітичні ваги WAA 210/C/1 (Salex, Данія), холодильно-опалювальна установка (рефрижератор) (Joan, Франція).

2.2. Методи

Створення робочого банку електрокомпетентних клітин BL21 (DE3)

Rosetta. Клітини штаму BL21 (DE3) Rosetta, відібрані з банку компетентних клітин, попередньо культивували у 15–20 мл поживного середовища Лурія-Бертані (LB) при температурі 37°C та перемішуванні 220 об/хв протягом ночі. Отриману культуру використовували як інокулят: 1–2 мл культури переносили у 100 мл свіжого стерильного середовища LB і продовжували інкубацію за тих же умов до досягнення оптичної щільності суспензії $OD = 0,5-1,0$ од. абс. Після цього клітини осаджували центрифугуванням при 3600 об/хв протягом 10 хв за температури 4°C. Осад клітин ресуспендували у 50 мл стерильної води та повторно центрифугували при 3600 об/хв упродовж 15 хв при 4°C. Далі клітинний осад ресуспендували у 25 мл стерильної води і знову осаджували за аналогічних умов. Наступним етапом клітини ресуспендували у 10 мл стерильного 10 % розчину гліцерину та центрифугували при 3600 об/хв протягом 10 хв при 4°C. Після центрифугування осад клітин суспендували у 400 мкл 10 % стерильного гліцерину (кріопротектор). Отриману суспензію аліквотували і заморожували при температурі -70°C.

Трансформація компетентних клітин BL21 (DE3) Rosetta.

Трансформацію проводили використовуючи аліквоту електрокомпетентних

клітин BL21 (DE3) Rosetta з підготовленого банку та плазмідної ДНК з цільовим геном, клонованим у вектор pCAL-n. Для трансформації застосували метод електропорації – електропоратор Electroporator 2510. У мікропробірку переносили 40 мкл компетентних клітин *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta та 2 мкл плазмідної ДНК pCAL-n- $\beta(1-66)_2$ та ресуспендували. Отриману суспензію внесли в електропораторну кювету та піддавали дії електричного імпульсу при 2200 мВ і 4,5 мкс. Після чого у кювету додавали 1 мл середовища LB, 9 мкл глюкози та 4 мкл MgSO₄. Суспензію перенесли у мікропробірку та інкубували при температурі 37°C упродовж 1 години для відновлення клітин.

Для верифікації трансформованих клітин їх висівали на селективне агаризоване середовище LB. Бактеріальну суспензію наносили на чашки Петрі, що містили ампіцилін, і рівномірно розподіляли стерильним скляним шпателем. Використовували кілька варіантів контролю для перевірки наступних показників:

1. Перевірка контамінації та стерильності під час маніпуляцій – середовище без антибіотика із трансформованими клітинами;
2. Оцінка життєздатності компетентних клітин, також визначення ефективності трансформації – середовище з антибіотиком із трансформованими клітинами.

Чашки Петрі інкубували при температурі 37°C протягом 12–16 годин. Культури, що формували колонії на селективному середовищі, вважали трансформованими клонами.

Робочий банк трансформованих клітин. Клітини, відібрані з окремих колоній, культивували протягом ночі у 10 мл стерильного середовища LB, що містило ампіцилін у концентрації 0,1 мг/мл, при температурі 37°C та перемішуванні 220 об/хв. Після культивування клітини осаджували центрифугуванням при 3600 об/хв упродовж 20 хв. Осад ресуспендували у стерильному поживному середовищі, яке містило 20 % гліцеролу (кріопротектор). Суспензію переносили у кріотюби і заморожували при температурі -80°C.

Культивування бактерій та індукція експресії цільового білка (ВβN-домену). Культуру клітин BL21_ВβN, відібрану з банку, нарощували у 15–20 мл стерильного середовища LB з ампіциліном (0,1 мг/мл) при 37°C та 220 об/хв протягом ночі.

Отриманий інокулят у кількості 1–2 мл переносили у 200 мл свіжого стерильного середовища LB з ампіциліном, у концентрації 0,1 мг/мл, і культивували за аналогічних умов до досягнення оптичної щільності суспензії значення OD = 0,5–1,0 од. абс. Для індукцію експресії рекомбінантного білка додавали IPTG (концентрація 1 мМ). Подальше культивування здійснювали упродовж 4–6 годин при 30°C з перемішуванням 220 об/хв.

Виділення цільового білка (ВβN-домену). Після експресії бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 3600 об/хв упродовж 20 хв при температурі 4–7°C. Осад клітин ресуспендували з охолодженням у розчині Wash buffer, що містив 50 мМ Трис-НСl, рН 6,5. До отриманої суспензії додавали коктейль інгібіторів протеїназ у співвідношенні 1:100 та перемішували на вортексі. Подальшу дезінтеграцію клітин проводили на ультразвуковій установці при охолодженні. Після руйнування клітинної маси суспензію знову центрифугували протягом 20 хв за температури 4–7°C та при 3600 об/хв.

Фракціонування сульфатом амонію (NH₄)₂SO₄. Надосадову рідину відбирали та піддавали фракціонуванню сульфатом амонію. До супернатанту додавали насичений розчин (NH₄)₂SO₄ до досягнення 20%, 40% та 60% насичення, витримували зразки на холоді протягом 20 хв та центрифугували.

Надосадову рідину відбирали для подальшого аналізу.

Афінна хроматографічна очистка на основі гепарин-агарози. Для очищення отриманої білкової суміші проводили афінну хроматографію з використанням сорбенту на основі гепарин-агарози.

Сорбент гепарин-агароза (Sigma H6508) перед використанням промивали дистильованою водою у кількості не менше ніж 5 об'ємів колонки. Врівноваження носія проводили буферним розчином (50 мМ Tris-НСl, рН 6,5).

У складі буфера були відсутні солі та відновники, оскільки попередні дослідження показали, що присутність натрію хлориду при нанесенні зразка значно знижує ефективність сорбції цільового білка.

Перед нанесенням клітинний лізат центрифугували, після чого надосадову рідину наносили на гепарин-агарозу, попередньо врівноважену відповідним буфером. Об'єм сорбенту становив 3 мл. Нанесення здійснювали при швидкості потоку 0,5 мл/хв, контролюючи сигнал оптичної щільності при 280 нм. Колонку промивали тим самим буферним розчином (50 мМ Tris-HCl, рН 6,5) до стабілізації базової лінії та видалення незв'язаних компонентів. Для промивки використовували не менше ніж 10 об'ємів колонки.

Для відокремлення зв'язаних компонентів використовували ступінчастий градієнт концентрації NaCl з одночасним контролем сигналу при 280 нм, а саме послідовно використовували для елюції буферні розчини на основі 50 мМ Tris-HCl, рН 6,5, що містили 0,3 М, 0,5 М, 1 М та 1,5 М NaCl.

Після процедури сорбент піддавали регенерації, дезінфекції та консервуванню відповідно до інструкції виробника.

Збагачена тромбоцитами плазма крові. Збагачену тромбоцитами плазму крові отримували з венозної крові, відібраної натщесерце у присутності 3,8 % розчину цитрату натрію (співвідношення 9:1). Після обережного перемішування зразки переносили у пробірки та піддавали центрифугуванню для відділення формених елементів. Плазмову фракцію відбирали як супернатант. Для отримання збагаченої тромбоцитами плазми застосовували м'яке центрифугування (200 g, 20 хв, 20 °C), після чого верхній шар використовували для подальших досліджень.

Одержання пептиду Вβ1–42. Ферментативний гідроліз фібриногену. Фібриноген, попередньо позбавлений плазміногену на лізин-сефарозі, піддавали ферментативному гідролізу фібриногеназою з отрути *Echis multisquamatis*. Реакцію проводили у буферному розчині 0,05 М Tris-HCl, 0,13 М NaCl (рН 7,4) при температурі 25 °C протягом 45 хв. Концентрація

фібриногену становила 14 мг/мл, фібриногенази – 0,023 мг/мл. Гідроліз припиняли додаванням бензамідину до кінцевої концентрації 0,016 М [44].

Фракціонування продуктів гідролізу. Отриману реакційну суміш піддавали розділенню методом гелі-проникної хроматографії на Superdex-75. Перед проведенням хроматографії носій врівноважували буферним розчином 0,05 М Tris-HCl, 0,13 М NaCl (pH 7,4).

Елюцію здійснювали в ізократичному режимі з контролем оптичної густини при довжині хвилі 280 нм.

Для визначення концентрації пептиду використовували спектрофотометр Optizen (POP, Корея).

Концентрування отриманих фракцій здійснювали за допомогою мікроконцентраторів Amicon Ultra 5K (Millipore, США) шляхом центрифугування при прискоренні 1000 g. Отриманий препарат пептиду B β 1–42 зберігали при температурі -20 °C.

Мас-спектрометрія. Отримані зразки аналізували методом MALDI-TOF мас-спектрометрії з використанням приладу Voyager DE PRO (Applied Biosystems, США). Дослідження проводили на часопрольотному мас-спектрометрі, що працює за принципом Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI). Цей метод ґрунтується на лазерній десорбції та іонізації молекул у присутності матриці з подальшим визначенням маси іонів за часом їхнього прольоту до детектора.

Як матричну речовину для іонізації поліпептидних молекул використовували сінапінову кислоту (Sigma-Aldrich). Матричний розчин готували у концентрації 1 мг/мл, використовуючи суміш ацетонітрилу (Sigma-Aldrich) та 1 % водного розчину трифтороцтової кислоти (Sigma-Aldrich) у рівних об'ємних частках. Перед аналізом зразок змішували з матричним розчином у співвідношенні 3:2 (v/v).

Мас-спектри реєстрували у лінійному режимі роботи приладу при прикладеній напрузі 25 кВ. Отримані спектри обробляли та аналізували з

використанням програмного забезпечення Data Explorer 4.0.0.0 (Applied Biosystems).

Електрофоретичне розділення. Наявність цільового білка оцінювали методом електрофорезу у поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності SDS за методом Лемлі. Для цього використовували вертикальну електрофорезну камеру (Bio-Rad, США) та пластинки з 15 % ПААГ. У лунки гелю вносили по 10–15 мкл дослідних зразків та маркерами молекулярної маси.

Етапи підготовки гелю. Спочатку готували розділяючий гель, до складу якого входили акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, TEMED, гліцин, гелевий буфер і дистильована вода. Після його полімеризації формували концентруючий гель, що містив TEMED, гелевий буфер, акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід та дистильовану воду.

Перед внесенням у гель зразки змішували з буферним розчином, що містив 4 % ДСН, 8 М сечовину, 5 % бромфеноловий синій та β -меркаптоетанол. Підготовлені проби витримували упродовж 3–5 хв на нагрівальному пристрої TDD-120 (Biosan, Латвія) при температурі 90°C. Після електрофоретичного розділення гель фарбували розчином кумасі блакитного G-250 протягом 20 хв. Оцінку молекулярної маси білків проводили порівнянням зі маркерами для електрофорезу білків.

Турбідиметрія. Кінетику полімеризації фібрину визначали турбідиметричним методом. Реакційну суміш готували на основі розчину фібриногену (0,1 мг/мл) у 0,05 М трис-НСІ буферному розчині (рН 7,4), що містив 0,15 М NaCl. Полімеризацію ініціювали додаванням тромбіну (концентрація 0,25 NIH/мл).

Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі Optizen-POP при довжині хвилі 350 нм, 37°C протягом 60 хв із безперервною реєстрацією змін оптичної щільності.

Агрегація тромбоцитів. Дослідження агрегації тромбоцитів проводили у збагаченій тромбоцитами плазмі крові людини із концентрацією тромбоцитів 200–300 тис./мкл. Вимірювання здійснювали методом

фотооптичної агрегатометрії на агрегометрі «SOLAR AP2110». Усі дослідження виконували протягом перших трьох годин після забору крові.

Для проведення аналізу в кювету агрегометра вносили 225 мкл збагаченої тромбоцитами плазми та 25 мкл розчину досліджуваного білку. Отриману суміш інкубували *ex tempore* протягом 5 хв при температурі 37°C. Агрегацію тромбоцитів ініціювали 25 мкл ADP у концентрації 25 та 25 мкл розчину CaCl₂ (0,025 M).

Після внесення індуктора процес агрегації реєстрували протягом 10 хв у режимі без нормування результатів за початковим рівнем світлопропускання. За отриманими кривими визначали ступінь агрегації, який відповідав максимальному рівню світлопропускання плазми після додавання індуктора; швидкість агрегації, що характеризувала зміну світлопропускання у перші 30 с після ініціації реакції; а також час агрегації – інтервал, необхідний для досягнення максимального рівня агрегації.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Отримання та характеристика рекомбінантного фрагмента фібриногену $V\beta(1-66)_2$

Молекула фібриногену являє собою гексамер $(A\alpha B\beta\gamma)_2$, тобто складається з двох частин, кожна з яких містить ланцюги $A\alpha$, $B\beta$ та γ . У її складі два $B\beta$ -ланцюги, відповідно – дві N-кінцеві ділянки, з яких формується βN -область. Під дією тромбіну фібринопептиди А і В послідовно відщеплюються, внаслідок чого утворюється фібрин. При цьому N-кінцеві ділянки $B\beta$ -ланцюгів стають доступними та беруть участь у міжмолекулярних взаємодіях, що визначають властивості фібринового згустку.

βN -домени фібрину відіграє роль не лише у полімеризації, а й у взаємодії з клітинними рецепторами, зокрема VE-кадгерином та VLDLR, впливаючи на проникність ендотелію, міграцію лейкоцитів і перебіг запальних реакцій. З огляду на описані ефекти, βN -фрагменти розглядають як сполуки з потенційною протизапальною та антитромботичною активністю, що обумовлює інтерес до їх подальшого дослідження.

Для коректного дослідження біологічних властивостей використовують рекомбінантні конструкції, що відтворюють димерну форму βN -доменів, у складі фібрину. На відміну від коротких мономерних пептидів, що отримують при протеолізі фібриногену, димерні фрагменти, зокрема $V\beta(1-66)_2$, забезпечують ефективніше зв'язування з рецепторами та гепарином, що виступає критичним для реалізації та подальшого дослідження їхніх властивостей.

Одержання та вивчення димерних фрагментів для подальшого використання у дослідженнях на експериментальних моделях дозволяє не просто аналізувати окрему послідовність, а оцінити функціональні

властивості рекомбінантного продукту у контексті механізмів, релевантних для регуляції гемостазу та запальних процесів, що є необхідним етапом при розгляді цих фрагментів як основи для створення нових біологічно активних сполук.

Фрагмент фібриногену $V\beta(1-66)_2$ отримували методами рекомбінантних технологій, використовуючи продуцент BL21 Rosetta та плазмідною ДНК на основі вектора експресії pCAL-n. Для проведення одного циклу ферментації цільового білка застосовували аліквоту робочого банку культур об'ємом 1 мл. Цей банк було створено на основі колоній клітин BL21 Rosetta, успішно трансформованих плазмідною ДНК pCAL-n- $\beta(1-66)_2$. Плазмиду люб'язно надано колегами з Center for Vascular and Inflammatory Diseases, University of Maryland School of Medicine.

Початкову ферментацію проводили за стандартним протоколом із індукцією IPTG для перевірки рівня експресії цільового фрагменту у колоніях успішно трансформованих клітин-продуцента. Колонії, що вважалися успішно трансформованими, відбирали базуючись на проведеній серії контролів. Для подальшого дослідження відібрали 2 колонії трансформованого продуцента. Одержану після ферментації біомасу сепарували центрифугуванням. Виділення проводили по протоколу для виділення білка, що синтезується у розчинній формі. Сепарування проводили зі збереження оптимальної температури, тобто із охолодженням (приблизно 4–5°C) для мінімізації чи уникнення протеолітичного розщеплення. Аналіз отриманого лізату проводили методом ДСН-ПААГ.

На рис. 3.1. представлено електрофореграму результатів експресії та індукції з IPTG фрагменту $V\beta(1-66)_2$ на середовищі LB.

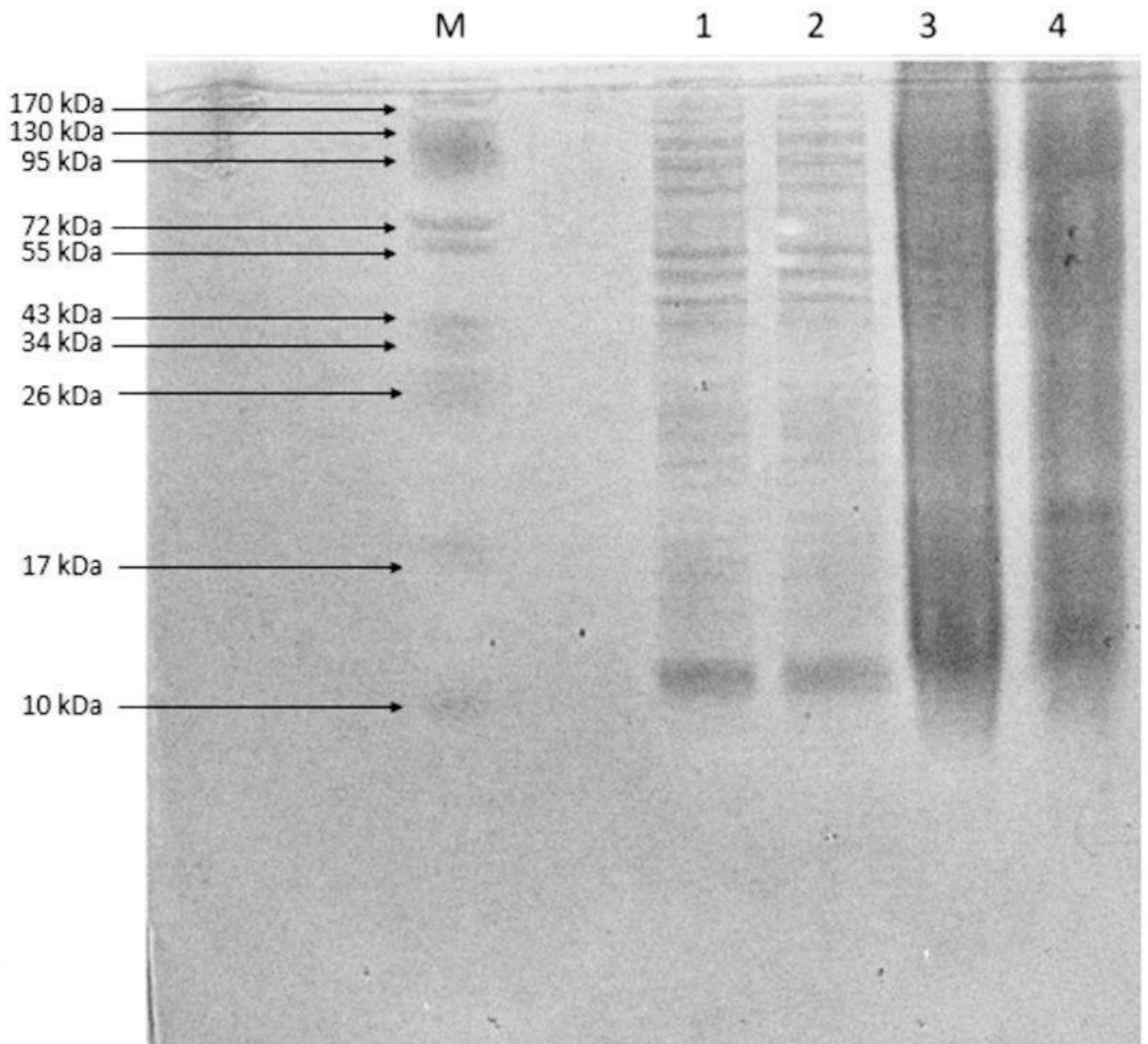


Рис. 3.1. Електрофореграма лізатів ферментації та індукції трансформованих клітин BL21 Rosetta колоній 1 та 2 на середовищі LB: М – маркери молекулярних мас; 1 – лізат колонії 1 (розведення 1:10); 2 – лізат колонії 2 (розведення 1:10); 3 – лізат колонії 1; 4 – лізат колонії 2

Спостерігали формування чіткої смуги у області, що відповідає молекулярній масі мономера цільового фрагменту (~ 11 кДа), що підтверджує успішну трансформацію продуцента та експресію рекомбінантного фрагменту фібриногену В β (1–66)₂. Оскільки зразки для ДСН-ПААГ приготовлені у невідновних умовах, як і очікувалося, смуга формується на рівні молекулярної маси, що відповідає мономеру цільового протеїну.

Отримані результати електрофоретичного аналізу узгоджуються з очікуваними характеристиками рекомбінантного фрагмента $V\beta(1-66)$, що свідчить про ефективність обраної системи експресії.

Отримання білка у розчинній формі виступає ключовою перевагою для подальших етапів очищення, оскільки дозволяє уникнути процедури рефолдингу, характерних для білків, що накопичуються у вигляді тілець включення.

Для підтвердження специфічності експресованого білку було проведено вестерн-блот аналіз із використанням моноклональних антитіл 2d-2a, специфічних до N-кінцевої ділянки $V\beta$ -ланцюга фібриногену. Блотограму наведено на рис. 3.2.

На блотограмі спостерігали формування смуг, що відповідають як мономерній формі фрагмента $V\beta(1-66)$, так і його димеру $V\beta(1-66)_2$, що свідчить про успішне отримання цільового продукту. У зразках видно чіткі смуги, що підтверджує наявність обох форм – мономеру та димеру. При цьому в зразках, підготовлених у відновних умовах (доріжки 1, 4), як і очікувалося, формується інтенсивна смуга, характерна для димерного фрагмента $V\beta(1-66)_2$, тоді як у невідновних умовах (доріжки 2, 3) спостерігається переважно смуга, що відповідає мономеру $V\beta(1-66)$, що можна пояснити неможливістю формування дисульфідних зв'язків у присутності денатуруючих агентів, зокрема β -меркаптоетанолу.

Проведений вестерн-блот аналіз виступає важливим етапом перевірки специфічності отриманого продукту, оскільки дозволяє ідентифікувати його за допомогою специфічних антитіл. Використання антитіл забезпечує додатковий рівень верифікації – важливий при одержанні рекомбінантних білків, для виключення утворення неспецифічних продуктів або деградаційних форм.

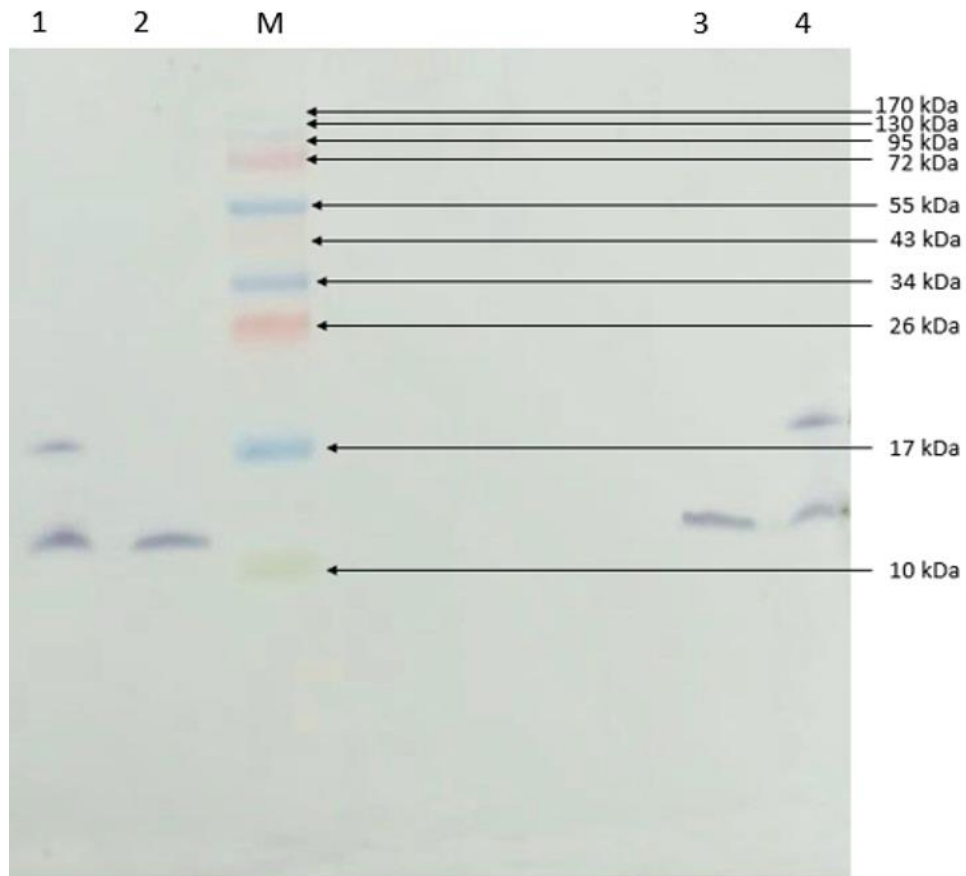


Рис. 3.2. Блотограма результатів аналізу зразків фрагменту $B\beta(1-66)_2$ (колонії 1 і 2) з використанням антитіл 2d-2a, специфічних до N-кінця $B\beta$ -ланцюга фібриногену: 1 – колонія 1, розчинна фракція, відновні умови; 2 – колонія 1, розчинна фракція, невідновні умови; М – маркер; 3 – колонія 2, розчинна фракція, невідновні умови; 4 – колонія 2, розчинна фракція, відновні умови

Наявність у зразках як мономерної, так і димерної форм фрагмента, пов'язане з особливостями досліджуваного рекомбінантного білка $B\beta(1-66)_2$. Формування димерної форми відповідає очікуваним характеристикам отриманого продукту, тоді як наявність мономерної форми може бути пов'язана з умовами підготовки зразків для аналізу.

З огляду на наявність у клітинному лізаті великої кількості баластних речовин і домішок, для виділення цільового фрагмента обрали метод афінної хроматографії на сорбенті гепарин-агароза. Такий підхід обґрунтований попередніми даними про взаємодію $B\beta N$ -домену фібриногену з гепарином, що зумовлює його селективне зв'язування з сорбентом.

На рис. 3.3. зображено хроматограму очистки суміші димерного фрагмента $V\beta(1-66)_2$ та його мономеру $V\beta(1-66)$ на сорбенті гепарин-агароза, що дозволяє простежити розподіл білків за афінністю до сорбенту.

УФ-детекцію проводили при довжині хвилі $\lambda = 280$ нм, що відповідає максимальному поглинанню білків. При нанесенні зразка (клітинного лізату) фіксувалося значне підвищення оптичної густини, що зумовлено високим вмістом білків і сторонніх домішок у лізаті, які не мають спорідненості до гепаринового сорбенту і проходять у вигляді незв'язаної фракції (пік 1 на хроматограмі).

Збір фракцій проводили окремо для кожного кроку ступінчастого градієнту елюції для визначення оптимальних умов елюції. Аналіз фракцій методом

ДСН-ПААГ виявив, що цільовий фрагмент білка $V\beta(1-66)$ елюється вже при $0,3$ М NaCl, що свідчить про його помірну афінність до гепарин-агарози.

Після видалення неспецифічно зв'язаних сполук було проведено елюцію зв'язаного білка. Другий пік (3) відповідає зв'язаній фракції, до складу якої входить цільовий білок – фрагмент $V\beta(1-66)_2$ та його мономер $\beta(1-66)$, які взаємодіють із функціональними групами гепарину.

Елюцію здійснювали градієнтом підвищення іонної сили буферного розчину, що забезпечило поступове вивільнення білків із сорбенту. Фракції, що відповідали піку 2, збирали та додатково аналізували для підтвердження наявності цільового білка (зокрема за допомогою ДСН-ПААГ).

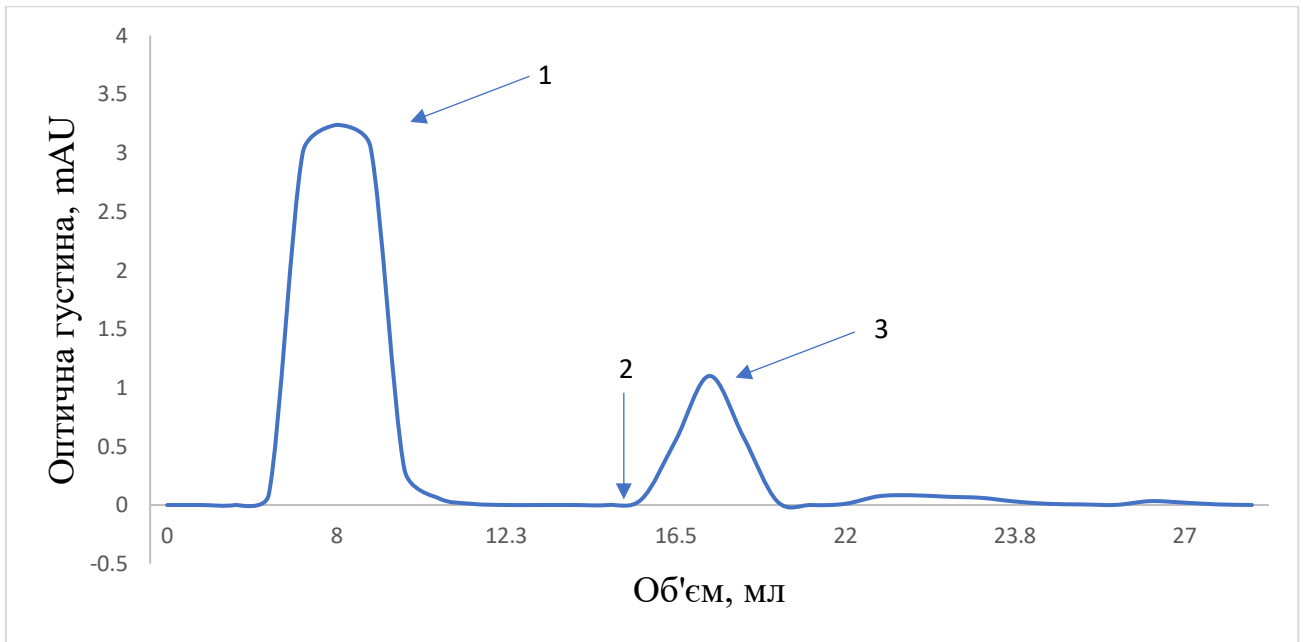


Рис. 3.3. Хроматограма очищення суміші димерного фрагмента $V\beta(1-66)_2$ та його мономеру $V\beta 1-66$ на гепарин-агарозі: 1 – незв'язана фракція; 2 – перехід від рухомої фази А до рухомої фази Б; 3 – зв'язана фракція

Взаємодія досліджуваного фрагмента з гепарин-агарозою визначається електростатичними взаємодіями між позитивно зарядженими амінокислотними залишками білка та сульфатними групами гепарину. Такий характер зв'язування типовий для білків, що містять гепарин-зв'язувальні ділянки, і підтверджує функціональну релевантність $V\beta N$ -домену.

Отримані дані підтвердили потенціал використання гепарин-афінної хроматографії для попереднього очищення $V\beta N$ -домену фібриногену. Цей метод дозволив відокремити білок від більшості домішок, що робить його перспективним для подальшого використання у процесі очищення та аналізу.

Для візуалізації результатів афінного очищення суміші димерного фрагмента $V\beta(1-66)_2$ та його мономеру $V\beta(1-66)$ після хроматографії на гепарин-агарозі, проведено аналіз методом ДСН-ПААГ у невідновних умовах.

На рис. 3.4. представлено електрофореграму відповідних зразків. Для коректного аналізу лізат був нанесений у розведенні 1:10. Лізат характеризується високим вмістом загального білка з інтенсивним фоном, що ускладнює ідентифікацію цільових фрагментів.

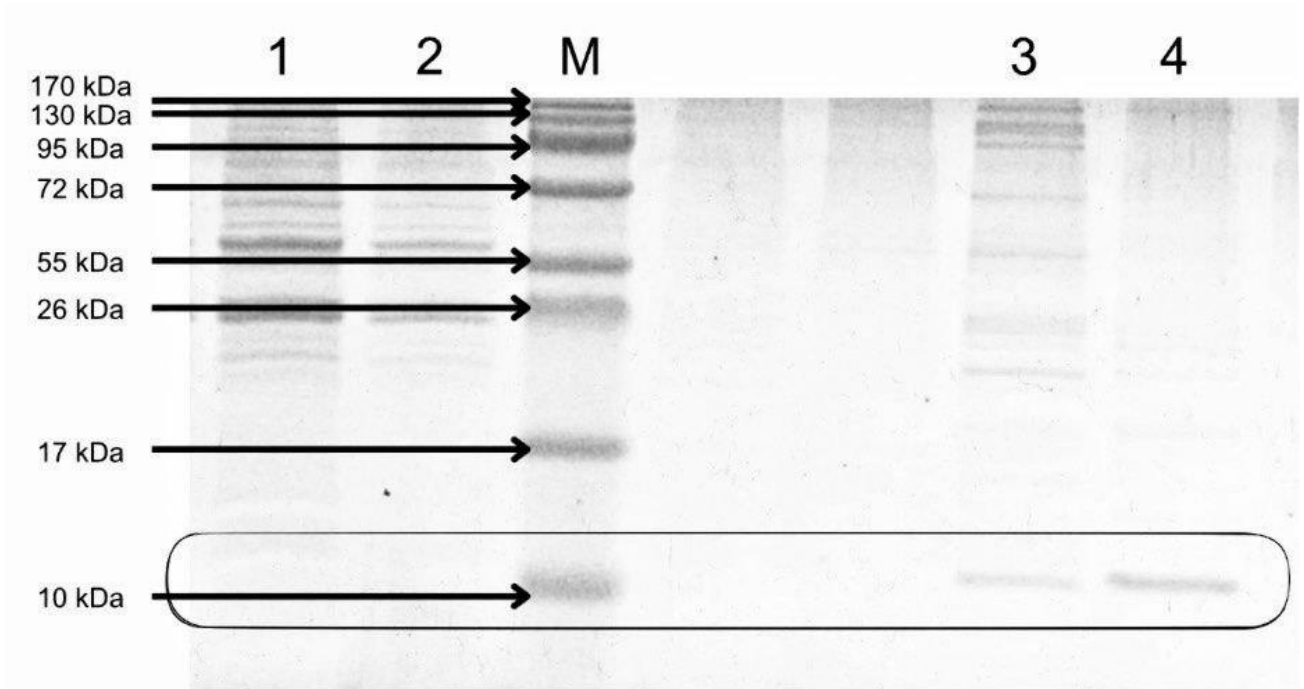


Рис. 3.4. Електрофореграма зразків хроматографічного очищення суміші димерного фрагмента $B\beta(1-66)_2$ та його мономеру $B\beta(1-66)$ на гепарин-агарозному сорбенті (невідновні умови): 1 – лізат (розведення 1:10); 2 – незв’язана фракція (розведення 1:10); М – маркери молекулярної маси; 3 – елюат, фракція 1; 4 – елюат, фракція 2

Відсутність смуги, що відповідає цільовому фрагменту у незв’язаній фракції, може вказувати на ефективне зв’язування $B\beta(1-66)_2$ та $B\beta(1-66)$ з сорбентом, що підтверджує попереднє припущення щодо їх афінності до гепарин-агарози.

У зразках елюату було наявно характерні смуги, зокрема у ділянці ~ 11 кДа, що відповідає мономеру $B\beta(1-66)$ та вказує на успішне елюювання цільового фрагмента у складі зв’язаної фракції.

Для підтвердження автентичності отриманого рекомбінантного фрагмента $B\beta(1-66)_2$ після експресії було проведено аналіз методом MALDI-TOF

мас-спектрометрії. Метод дозволяє визначати співвідношення маси іона до його заряду (m/z), на основі часу польоту іонів у вакуумному аналізаторі.

Характерне утворення переважно однозарядних іонів ($z = +1$), унаслідок чого значення m/z може бути безпосередньо співставне молекулярній масі аналізованої сполуки. Водночас за певних умов можливе утворення іонів із більшим зарядом, що призводить до реєстрації сигналів при менших значеннях m/z .

На отриманому мас-спектрі (рис. 3.5.) основний пік спостерігається при ~ 7 кДа (пік 1), а також наявний сигнал при $\sim 3,5$ кДа, який становить приблизно половину значення основного та може бути пояснений утворенням двозарядних іонів тієї ж молекули. У такому випадку зменшення значення m/z пов'язане зі збільшенням заряду іона, а не зі зміною його молекулярної маси.

Особливості реєстрації сигналів у MALDI-TOF можуть визначатися ефективністю десорбції та іонізації, яка відрізняється для різних форм білка, а також впливом матриці, складу буфера та умов аналізу. Це може зумовлювати переважну детекцію окремих іонних форм молекули у спектрі без повного відображення всіх можливих станів.

Таким чином, спостережувані сигнали узгоджуються з наявністю у зразку цільового білкового фрагмента, а їх розподіл пояснюється особливостями процесу іонізації в умовах MALDI-TOF аналізу.

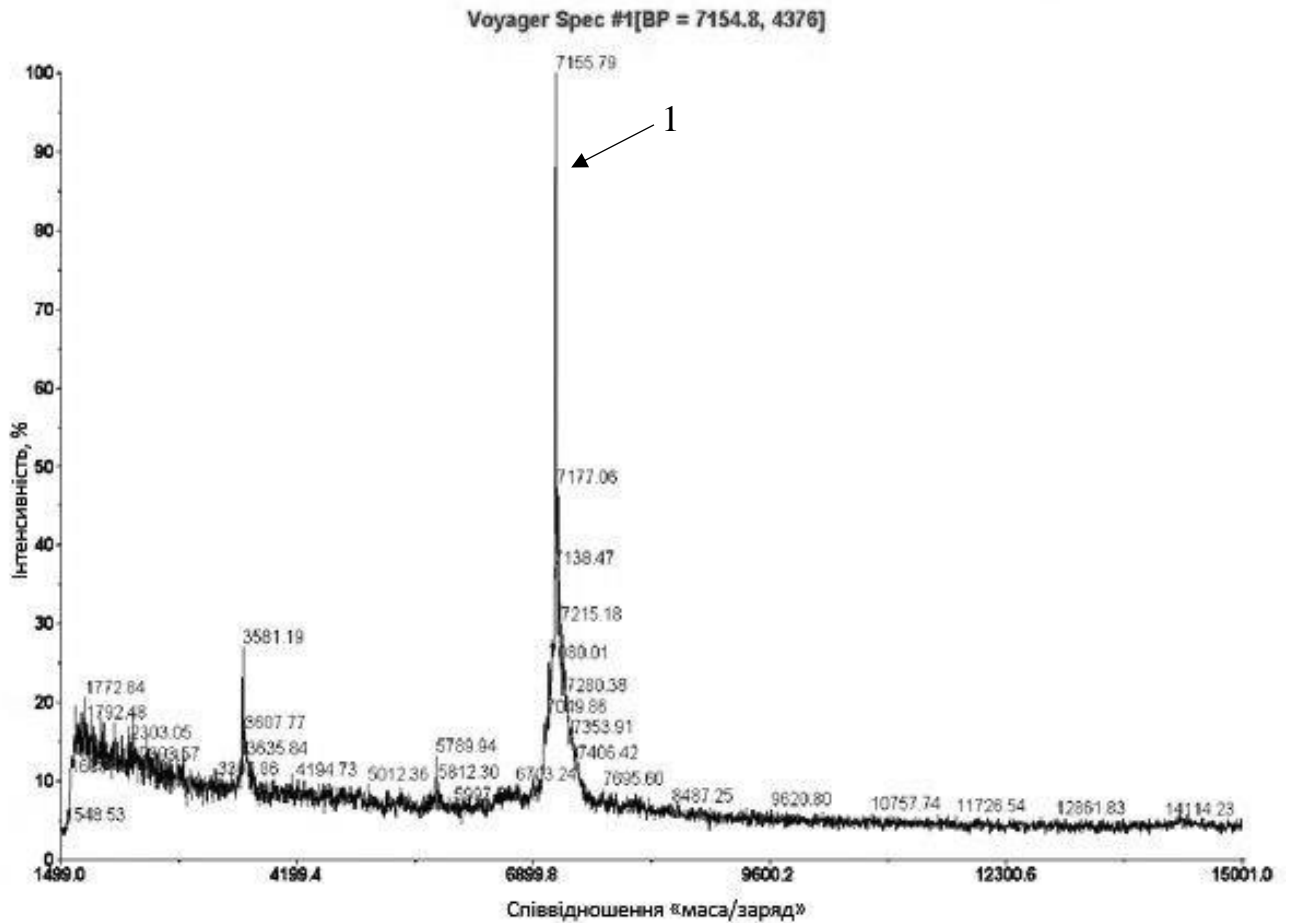


Рис. 3.5. MALDI-TOF мас-спектр зразка рекомбінантного протеїну $B\beta(1-66)_2$ після очищення: 1 – мономерний фрагмент $B\beta(1-66)$

3.2. Отримання та характеристика пептиду $B\beta(1-42)$

У результаті ферментативного розщеплення фібриногену протеїназою з отрути *Echis multisquamatis* N-кінцевий пептид $B\beta(1-42)$ відщепився від $B\beta$ -ланцюга фібриногену. У результаті, було одержано пептид $B\beta(1-42)$ та модифікований фібриноген $desB\beta(1-42)$. Для відокремлення продуктів гідролізу отриману реакційну суміш фракціонували методом гель-проникної хроматографії на колонці Superdex-75, розділивши компоненти суміші відповідно до їх молекулярної маси.

На рис. 3.6. представлено хроматограму гель-фільтраційного розділення продуктів гідролізу фібриногену.

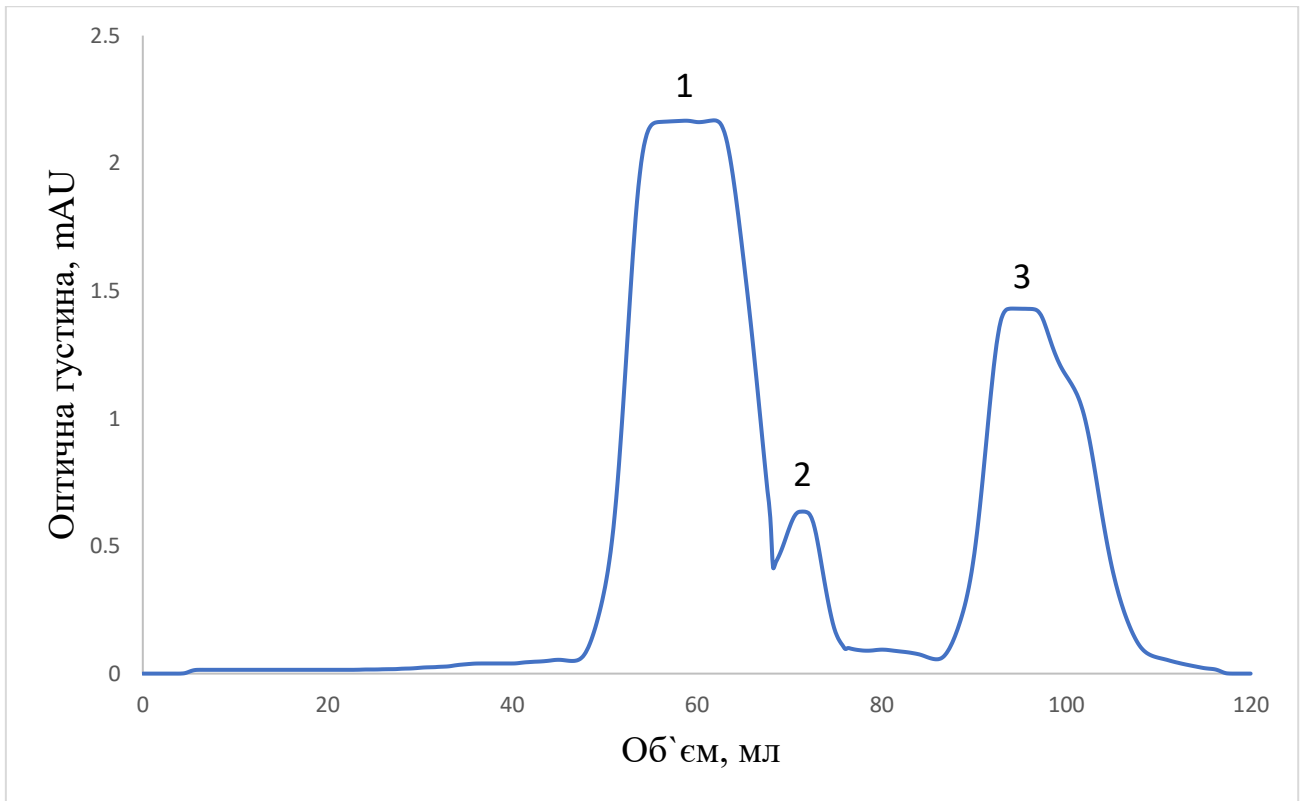


Рис. 3.6. Хроматографічне розділення гідролізату фібриногену, отриманого під дією фібриногенази з отрути *Echis multisquamatis*, за допомогою Superdex-75. 1 – зона елюції фібриногену desB β (1–42); 2 – зона елюції пептиду B β (1–42); 3 – зона елюції бензамідину.

Як видно з хроматограми, перший пік (1) відповідає високомолекулярній фракції фібриногену, що елюється раніше через більший гідродинамічний радіус молекули. Другий пік (2), який спостерігається у середній частині профілю елюції, відповідає відщепленому пептиду B β (1–42). Завдяки значно меншій молекулярній масі цей компонент елюється пізніше порівняно з фібриногеном. Третій пік (3) відповідає бензамідину, який використовували для припинення ферментативного гідролізу. Як низькомолекулярна сполука, бензамідин елюється наприкінці хроматографічного розділення.

Фракції, що відповідали піку 1 та піку 2, відбирали для подальшого аналізу.

Для оцінки складу відібраних фракцій проводили електрофоретичний аналіз методом ДСН-ПААГ. Результати електрофорезу наведені на рис. 3.7.

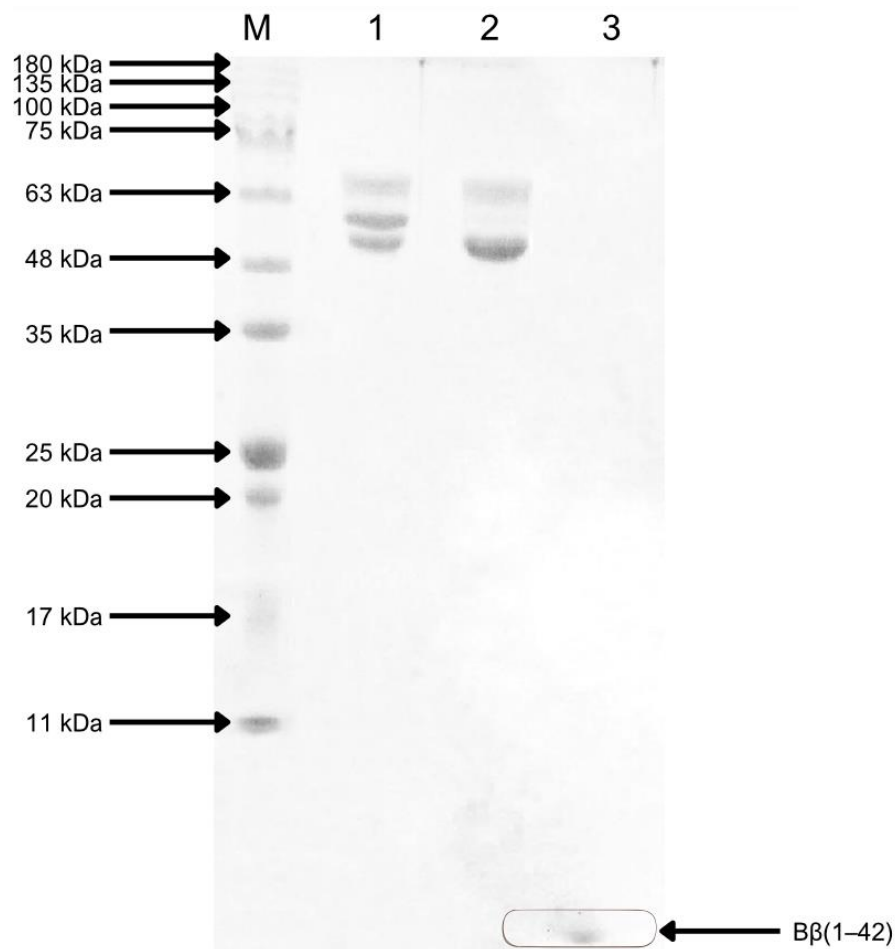


Рис. 3.7. Електрофореграма фракцій, отриманих після гель-фільтраційного розділення гідролізату фібриногену: М – маркер молекулярних мас; 1 – фібриноген; 2 – фракція, що містить фібриноген desBβ(1-42); 3 – фракція, що містить пептид Bβ(1-42)

Оскільки зразки для електрофоретичного розділення готували у присутності β-меркаптоетанолу, спостерігається розділення молекули фібриногену на окремі поліпептидні ланцюги: на доріжці 1 електрофореграми формуються три смуги, що відповідають Aα-, Bβ- та γ-ланцюгам. На доріжці 2 (фракція пік 1) зберігається профіль високомолекулярного білка, однак смуга Bβ-ланцюга чітко не відокремлюється, оскільки після відщеплення

пептиду $V\beta(1-42)$ його молекулярна маса зменшується і він мігрує поблизу γ -ланцюга. На доріжці 3 (фракція пік 2) відсутні виражені високомолекулярні смуги, натомість у нижній частині гелю спостерігається слабкий сигнал у низькомолекулярній області, що відповідає очікуваній міграції пептиду $V\beta(1-42)$.

Отже, використання гелі-проникної хроматографії на колонці Superdex-75 дозволило відокремити пептид $V\beta(1-42)$ від високомолекулярних компонентів реакційної суміші та низькомолекулярних домішок, і отримати препарат для подальшого структурного та функціонального аналізу.

Для підтвердження молекулярної маси отриманого пептиду $V\beta(1-42)$ було проведено мас-спектрометричний аналіз методом MALDI-TOF. Результати дослідження представлено на рис. 3.8.

На отриманому спектрі спостерігається домінуючий пік з молекулярною масою $\sim 4,5$ кДа, що відповідає очікуваній молекулярній масі пептиду $V\beta(1-42)$. Наявність цього сигналу підтверджує успішне відщеплення N-кінцевого фрагмента $V\beta$ -ланцюга фібриногену в результаті ферментативного гідролізу.

Окрім основного піку, на спектрі присутні сигнали меншої інтенсивності у діапазоні 1,5–3 кДа, які можуть відповідати фрагментам пептиду або іонним аддуктам, що формуються під час іонізації у матриці. З урахуванням попередньо згаданих особливостей процесу іонізації поява окремих сигналів при знижених значеннях m/z може бути пов'язана з реєстрацією іонів з більшим зарядом.

Отримані результати мас-спектрометрії узгоджуються з даними гелі-фільтраційного розділення та електрофоретичного аналізу і підтверджують отримання цільового пептиду $V\beta(1-42)$.

Тобто, використання MALDI-TOF мас-спектрометрії дозволило підтвердити молекулярну масу та автентичність отриманого препарату пептиду $V\beta(1-42)$.

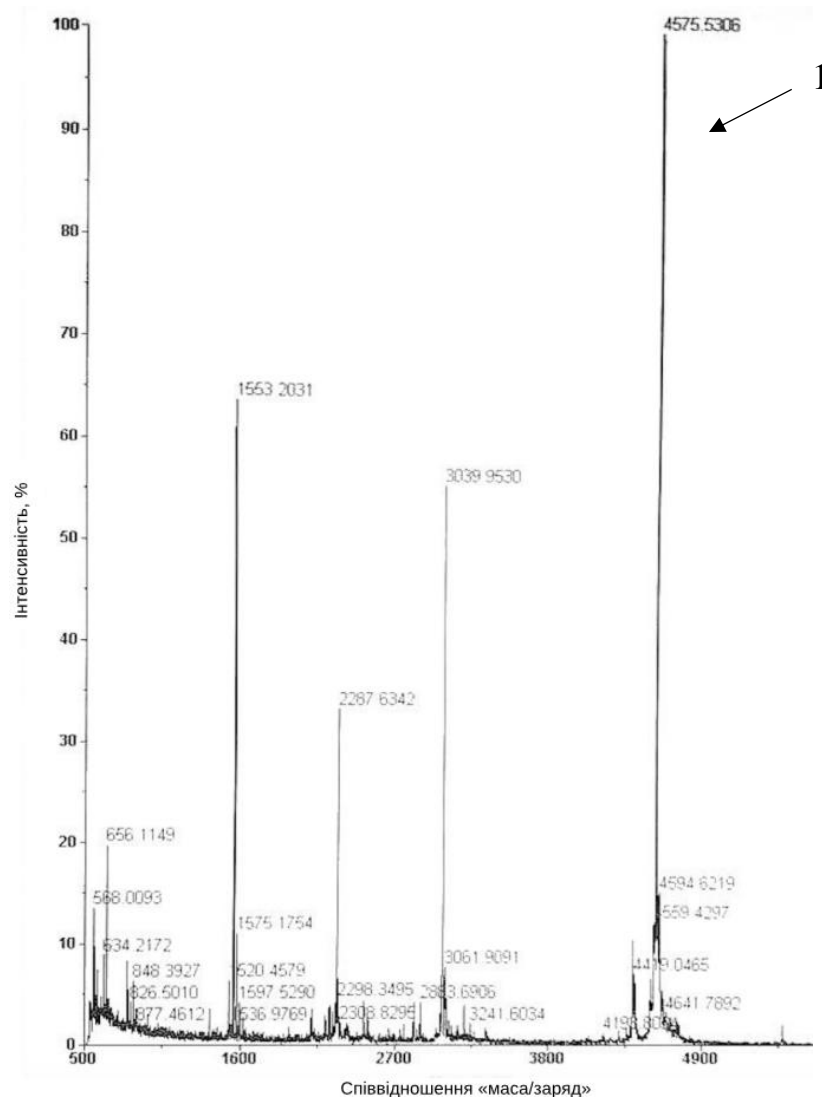


Рис. 2.8. MALDI-TOF мас-спектр препарату пептиду В β (1–42):

1 – пептид В β (1–42)

3.3. Порівняльна характеристика функціональної активності фрагментів В β N-ділянки фібриногену

Після одержання та підтвердження автентичності отриманих препаратів рекомбінантного фрагмента В β (1–66)₂ і пептиду В β (1–42) проводили функціональні дослідження їхнього впливу на процес формування фібринового згустку. Для цього використовували метод турбідиметричного

аналізу, щоб оцінювати кінетику полімеризації фібрину за зміною оптичної густини реакційної суміші.

У ході експерименту реєстрували зміну оптичної густини при довжині хвилі 350 нм (E350) протягом усього часу формування згустку. Аналіз турбідиметричних кривих дозволив оцінити характерні параметри полімеризації фібрину, зокрема латентну фазу утворення протофібрил, швидкість наростання турбідності та кінцеву оптичну густину, яка відображає структуру сформованої фібринової мережі.

На рис. 3.9. представлено типові турбідиметричні криві полімеризації фібрину у контрольному зразку та за присутності пептиду B β (1–42).

У контрольних умовах спостерігається характерна сигмоїдна крива полімеризації фібрину. Початкова латентна фаза відповідає періоду утворення протофібрил після відщеплення фібринопептидів тромбіном. Після цього відбувається швидке зростання оптичної густини, що відповідає латеральній асоціації протофібрил і формуванню більш товстих фібринових волокон. Надалі крива виходить на плато, що відображає завершення формування стабільної фібринової мережі.

У контрольних умовах спостерігається характерна сигмоїдна крива полімеризації фібрину. Початкова латентна фаза відповідає періоду утворення протофібрил після відщеплення фібринопептидів тромбіном. Після цього відбувається швидке зростання оптичної густини, що відповідає латеральній асоціації протофібрил і формуванню більш товстих фібринових волокон.

Надалі крива виходить на плато, що відображає завершення формування стабільної фібринової мережі.

У присутності пептиду В β (1–42) турбідиметричний профіль змінюється. Як видно з отриманих кривих, максимальне значення оптичної густини нижче порівняно з контролем.

При цьому загальний характер кривої полімеризації зберігається, що вказує на те, що присутність пептиду не блокує сам процес утворення фібрину, але може впливати на його структурні характеристики.

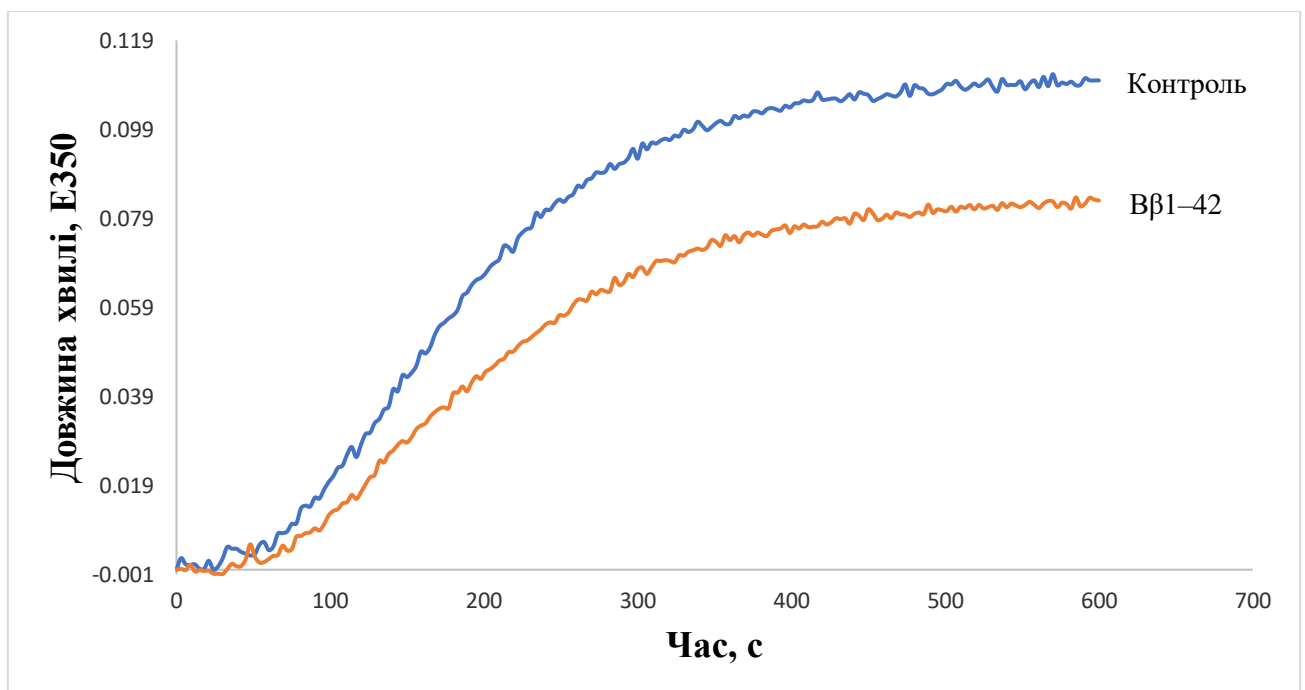


Рис. 3.9. Турбідиметричні криві, що відображають процес полімеризації фібрину в системі фібриноген+тромбін: Контроль – контрольний зразок; В β 1–42 – додавання до системи

У контрольних умовах спостерігається характерна сигмоїдна крива полімеризації фібрину. Початкова латентна фаза відповідає періоду утворення протофібрил після відщеплення фібринопептидів тромбіном. Після цього відбувається швидке зростання оптичної густини, що відповідає латеральній асоціації протофібрил і формуванню більш товстих фібринових волокон.

Надалі крива виходить на плато, що відображає завершення формування стабільної фібринової мережі.

У присутності пептиду $V\beta(1-42)$ турбідиметричний профіль змінюється. Як видно з отриманих кривих, максимальне значення оптичної густини нижче порівняно з контролем.

При цьому загальний характер кривої полімеризації зберігається, що вказує на те, що присутність пептиду не блокує сам процес утворення фібрину, але може впливати на його структурні характеристики.

Вплив рекомбінантного фрагмента $V\beta(1-66)_2$ на перебіг полімеризації фібрину представлено на рис. 3.10. Турбідиметричні криві демонструють більш виражені зміни порівняно із пептидом $V\beta(1-42)$.

У присутності фрагмента $V\beta(1-66)_2$ спостерігається суттєве зниження оптичної густини. Кінцеве значення турбідності залишається значно нижчим за контрольний зразок, а зростання сигналу на початкових етапах полімеризації доволі повільне. Отримані дані свідчать про те, що присутність цього фрагмента може впливати на процес формування фібринової мережі, змінюючи параметри агрегації фібринових протофібрил.

Тобто, результати турбідиметричного аналізу демонструють, що як пептид $V\beta(1-42)$, так і рекомбінантний фрагмент $V\beta(1-66)_2$ здатні змінювати параметри формування фібринового згустку. При цьому ефект, що спостерігається у присутності фрагмента $V\beta(1-66)_2$, є більш вираженим, що може бути пов'язано з наявністю додаткових структурних елементів $V\beta N$ -ділянки, які беруть участь у взаємодіях під час полімеризації фібрину.

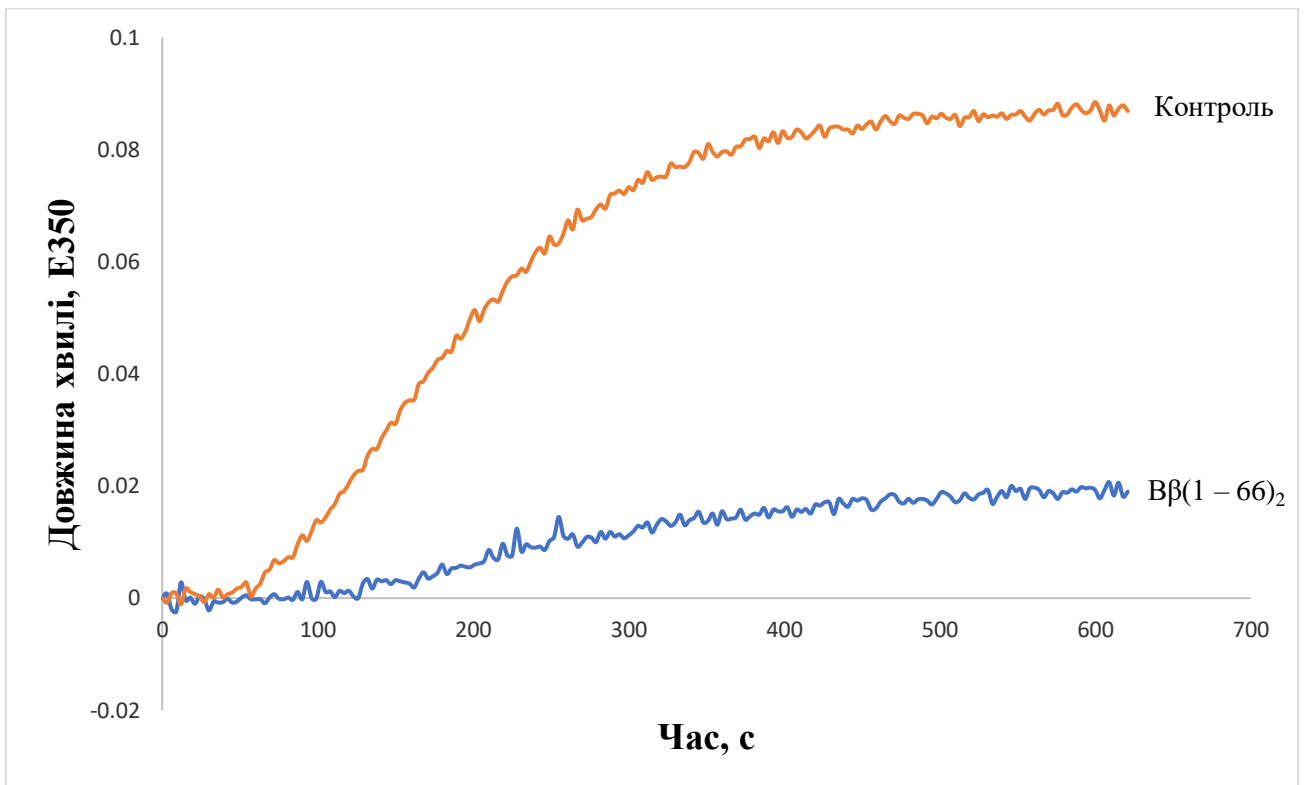


Рис. 3.10. Турбідиметричні криві, що відображають процес полімеризації фібрину в системі фібриноген+тромбін: К – контроль; Вβ(1–66)₂ – додавання до системи

Для оцінки впливу отриманих фрагментів на процес агрегації тромбоцитів було проведено дослідження здатності фрагментів модулювати агрегацію тромбоцитів методом світлової агрегатометрії.

Агрегатометричний аналіз базується на реєстрації зміни оптичної щільності тромбоцитарної плазми під час утворення агрегатів тромбоцитів. У міру формування агрегатів прозорість плазми збільшується, що реєструється приладом у вигляді зростання показника агрегації (АР, %). Тобто, за формою та параметрами агрегатометричної кривої можна оцінювати швидкість та ступінь агрегації тромбоцитів.

На рис. 3.11. наведено результати агрегатометричного аналізу у контрольних умовах та у присутності пептиду Вβ(1–42).

У присутності пептиду Вβ(1–42) характер агрегатометричної кривої суттєво не змінюється. Як видно з отриманих результатів, агрегатометричні

криві у контрольному зразку та у присутності цього пептиду практично співпадають. Максимальний рівень агрегації та кінетика реакції залишаються близькими до контрольних значень, що може свідчити про відсутність вираженого впливу пептиду $V\beta(1-42)$ на процес агрегації тромбоцитів у використаних експериментальних умовах.

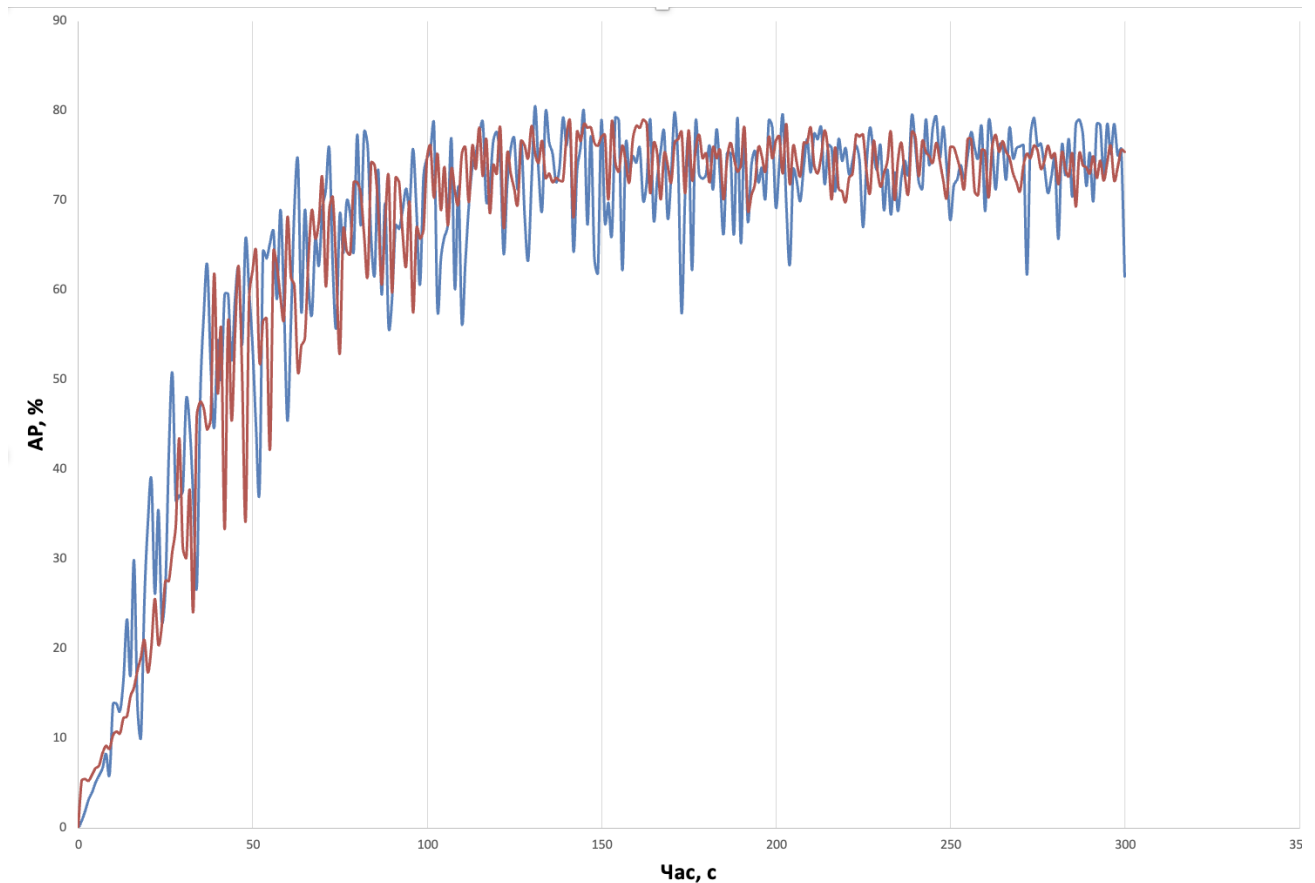


Рис. 3.11. Агрегатометричні криві агрегації тромбоцитів у контрольних умовах (синій ряд) та у присутності пептиду $V\beta(1-42)$ (червоний ряд)

Подальше дослідження було спрямоване на оцінку впливу рекомбінантного фрагмента $V\beta(1-66)_2$ (рис. 3.12). У присутності цього фрагмента характер агрегатометричної кривої змінюється. Спостерігається нижчий максимальний рівень агрегації, який стабілізується на рівні приблизно 35–40 %. Тобто, у присутності досліджуваного рекомбінантного фрагмента

відзначається зменшення ступеня агрегації тромбоцитів порівняно з контролем.

Отримані результати дозволяють провести порівняльну оцінку біологічної активності досліджуваних фрагментів $V\beta N$ -ділянки фібриногену. Встановлено, що пептид $V\beta(1-42)$ не спричиняє помітних змін кінетики та рівня агрегації тромбоцитів порівняно з контрольним зразком. Натомість у присутності рекомбінантного фрагмента $V\beta(1-66)_2$ спостерігається виражене зниження максимального рівня агрегації тромбоцитів. Отримані результати свідчать про наявність інгібувального впливу рекомбінантного фрагмента $V\beta(1-66)_2$ на процес агрегації тромбоцитів, тоді як коротший пептид $V\beta(1-42)$ такої активності у описаних експериментальних умовах не проявляє.

Відмінності у біологічній активності досліджуваних фрагментів можуть бути зумовлені як їх довжиною, так і особливостями структурної організації. Рекомбінантний фрагмент $V\beta(1-66)_2$ охоплює ширшу амінокислотну послідовність, яка включає ділянки, потенційно залучені до міжмолекулярних взаємодій, тоді як коротший пептид $V\beta(1-42)$ містить лише частину цієї області.

Димерна організація фрагмента $V\beta(1-66)_2$ наближає конфігурацію досліджуваної ділянки до відповідної у складі фібрину, що сприяє більш ефективній реалізації міжмолекулярних контактів та відображається на характері біологічної активності досліджуваного фрагмента.

У свою чергу, мономерний пептид $V\beta(1-42)$, отриманий шляхом протеолітичного розщеплення фібриногену, не відтворює повну структуру

β N-доменів. Це може обмежувати можливості реалізації тих типів взаємодій, які потребують участі більш протяжних або просторово узгоджених ділянок.

Отримані результати узгоджуються з уявленнями про те, що організація β N-доменів визначає особливості їх впливу на взаємодії з клітинними компонентами та регуляцію коагуляційних реакцій.

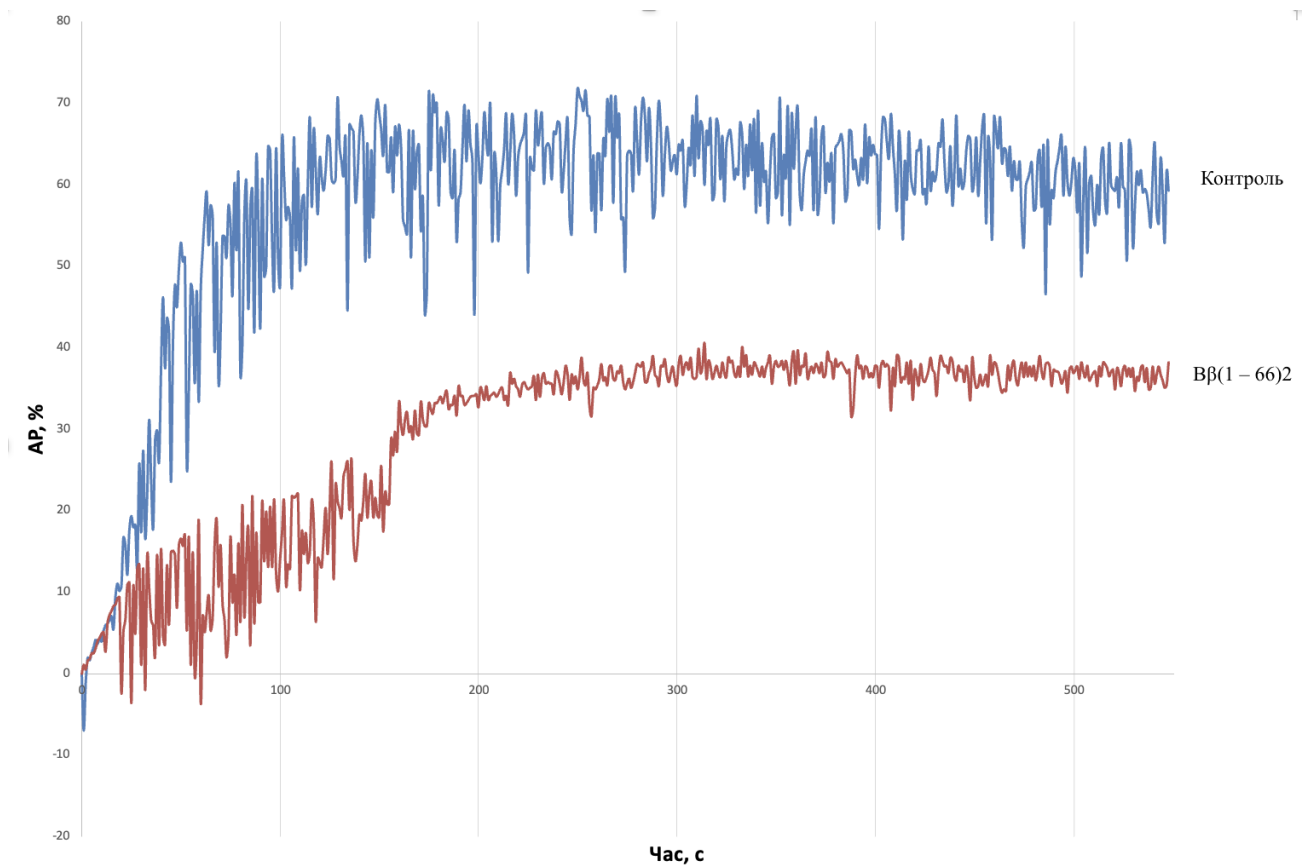


Рис. 3.12. Агрегатометричні криві агрегації тромбоцитів у контрольних умовах (контроль) та у присутності рекомбінантного фрагменту $V\beta(1-66)_2$

ВИСНОВКИ

Одержано та проаналізовано біологічні властивості рекомбінантного фрагмента В β N-домену фібриногену для подальших досліджень його терапевтичного потенціалу. Проведені дослідження підтвердили аутентичність отриманого фрагмента та дозволили оцінити його функціональну активність у порівнянні з природним пептидом В β (1–42), виділеним із молекули фібриногену. Отримані результати свідчать про перспективність використання рекомбінантного фрагмента В β N-домену для подальшого вивчення його біологічних властивостей та потенційного застосування у дослідженнях регуляції системи гемостазу.

1. Одержано рекомбінантний фрагмент В β N-домену фібриногену В β (1–66)₂ у системі експресії на основі клітин *E. coli*.

2. Отримано пептид В β (1–42) шляхом ферментативного розщеплення фібриногену протеїназою з отрути *Echis multisquamatis*.

3. Підтверджено специфічність та аутентичність отриманих фрагментів. Рекомбінантний фрагмент В β (1–66)₂ охарактеризовано методами ДСН-ПААГ, вестерн-блот аналізу та MALDI-TOF мас-спектрометрії, а наявність пептиду В β (1–42) підтверджено електрофоретичним аналізом та MALDI-TOF мас-спектрометрією.

4. Проведено порівняльний аналіз біологічних властивостей рекомбінантного фрагмента В β (1–66)₂ та пептиду В β (1–42) за допомогою турбідиметричного аналізу полімеризації фібрину та агрегатометрії тромбоцитів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Walsh, G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*, 36, pp. 1136–1145.
2. Favaloro, E.J. and Pasalic, L. (2024). Innovative diagnostic solutions in hemostasis. *Diagnostics*, 14, p. 2521.
3. Neubauer, K. and Zieger, B. (2021). Endothelial cells and coagulation. *Cell and Tissue Research*, 387, pp. 391–398.
4. Weisel, J.W. and Litvinov, R.I. (2019). Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 17(2), pp. 271–282.
5. Wolberg, A.S. (2023). Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 21(11), pp. 3005–3015.
6. Undas, A. and Ariëns, R.A.S. (2011). Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31, pp. e88–e99.
7. Hoffman, M. and Monroe, D.M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, 85, pp. 958–965.
8. Risman, R.A., Kirby, N.C., Bannish, B.E., Hudson, N.E. and Tutwiler, V. (2023). Fibrinolysis: an illustrated review. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.e100081> [Accessed 17 February 2023].
9. Kolev, K. and Medcalf, R.L. (2023). Thrombosis meets inflammation. *Frontiers in Immunology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1303385> [Accessed 18 October 2023].
10. Weisel, J.W. and Litvinov, R.I. (2013). Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood*, 121(10), pp. 1712–1719.
11. Nencini, F., Giurranna, E., Borghi, S., Taddei, N., Fiorillo, C. and Becatti, M. (2025). Fibrinogen oxidation and thrombosis: shaping structure and

function. *Antioxidants*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox14030390>

12. Mosesson, M.W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), pp. 1894–1904.
13. Біохімія і біотехнологія – сучасній медицині. (2013). С.В. Комісаренка, ред. Київ: ФОП Москаленко О.М.
14. Gomes, M., Ângelo-Dias, M., Duarte, G.S., Dias, S.S., Serra, S.S. and Lima, J. (2024). Safety of fibrinogen concentrate in non-trauma and non-obstetric adult patients during perioperative care: systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm13123482>
15. Medved, L. and Yakovlev, S. (2020). Structure and function of fibrinogen B β N-domains. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(3), pp. 22–35.
16. Yakovlev, S., Gao, Y., Cao, C., Chen, L., Strickland, D.K., Zhang, L. and Medved, L. (2011). Interaction of fibrin with VE-cadherin and anti-inflammatory effect of fibrin-derived fragments. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(9), pp. 1847–1855.
17. Yakovlev, S., Nyenhuis, D.A., Tjandra, N., Strickland, D.K. and Medved, L. (2024). Identification of amino acid residues critical for the interaction of fibrin with N-cadherin. *Biochemistry*, 64, pp. 83–91.
18. Stohnii, Y.M., Ryzheykova, M.V., Rebriiiev, A.V., Kuchma, M.D., Marunych, R.Y., Chernyshenko, V.O., Shablii, V.A., Lypova, N.M., Slominskyi, O.Y., Garmanchuk, L.V., Platonova, T.M. and Komisarenko, S.V. (2020). Aggregation of platelets, proliferation of endothelial cells and motility of cancer cells are mediated by the B β 1(15)-42 residue of fibrin(ogen). *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(2), pp. 72–84.
19. Gorlatov, S. and Medved, L. (2002). Interaction of fibrin(ogen) with the endothelial cell receptor VE-cadherin: mapping of the receptor-binding site in the NH₂-terminal portions of the fibrin β chains. *Biochemistry*, 41(12), pp. 4107–4116.

20. Yakovlev, S. and Medved, L. (2017). Interaction of fibrin with the very low density lipoprotein receptor: further characterization and localization of the VLDL receptor-binding site in fibrin β N-domains. *Biochemistry*, 56(19), pp. 2518–2528.
21. Gupta, S.K. and Shukla, P. (2017). Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: a review. *Frontiers in Pharmacology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00419>
22. Lindskog, E.K. (2018). *The Upstream Process: Principal Modes of Operation*. Basel: Lonza Pharma & Biotech.
23. Tripathi, N.K. and Shrivastava, A. (2019). Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420> [Accessed 20 December 2019].
24. Matanguihan, C. and Wu, P. (2022). Upstream continuous processing: recent advances in production of biopharmaceuticals and challenges in manufacturing. *Current Opinion in Biotechnology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102815>
25. Gomes, A.R., Byregowda, S.M., Veeregowda, B.M. and Balamurugan, V. (2016). An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(7), pp. 346–356.
26. Seyed, M.G.H., Najmeh, F., Behrouz, G. and Amirhossein, S. (2018). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*(E.coli): what we need to know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), pp. 718–725.
27. Terol, G.L., Gallego-Jara, J., Martínez, R.A.S., Vivancos, A.M., Díaz, M.C. and de Diego Puente, T. (2021). Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in Microbiology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001> [Accessed 21 June 2021].

28. Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
29. Jia, B. and Jeon, C.O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.160196> [Accessed 6 August 2016].
30. Liu, M., Wang, B., Wang, F., Yang, Z., Gao, D., Zhang, C., Ma, L. and Yu, X. (2019). Soluble expression of single-chain variable fragment (scFv) in *Escherichia coli* using superfolder green fluorescent protein as fusion partner. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, pp. 6071–6079.
31. Akash, M.S.H., Rehman, K., Tariq, M. and Chen, S. (2015). Development of therapeutic proteins: advances and challenges. *Turkish Journal of Biology*, 39(3), pp. 271–293.
32. Chen, C., Wong, H.E. and Goudar, C.T. (2018). Upstream process intensification and continuous manufacturing. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22, pp. 191–198.
33. Kerk, Y.J., Jameel, A., Xing, X.-H. and Zhang, C. (2021). Recent advances of integrated microfluidic suspension cell culture system. *Engineering Biology*, 5(4), pp. 81–97.
34. Remans, K., Lebendiker, M., Abreu, C., Maffei, M., Sellathurai, S., May, M.M., Vaněk, O. and de Marco, A. (2022). Protein purification strategies must consider downstream applications and individual biological characteristics. *Microbial Cell Factories*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01751-3> [Accessed 7 April 2022].
35. Jayakrishnan, A., Wan Rosli, W.R., Tahir, A.R.M., Razak, F.S.A., Kee, P.E., Ng, H.S., Chew, Y.-L., Lee, S.-K., Ramasamy, M., Tan, C.S. and Liew, K.B. (2024). Evolving paradigms of recombinant protein production in pharmaceutical industry: a rigorous review. *Sci*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/sci6010009> [Accessed 31 January 2024].

36. Behme, S., Gad, S.C., Tobin, J.J. and Walsh, G. (2012). *Pharmaceutical Biotechnology. Drug Discovery and Clinical Applications*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.
37. Reig, M., Vecino, X. and Cortina, J.L. (2021). Use of membrane technologies in dairy industry: an overview. *Foods*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods10112768> [Accessed 11 November 2021].
38. Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K. and Owczarek, B. (2019). A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed Research International*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/4216060> [Accessed 8 January 2019].
39. *New Bioprocessing Strategies: Development and Manufacturing of Recombinant Antibodies and Proteins*. (2018). B. Kiss, U. Gottschalk, M. Pohlscheidt, ed. Cham: Springer Nature.
40. Łacki, K.M. and Riske, F. (2019). Affinity chromatography: an enabling technology for large scale bioprocessing. *Biotechnology Journal*, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1002/biot.201800397> [Accessed 23 September 2019].
41. Kimia, Z., Hosseini, S.N., Ashraf Talesh, S.S., Khatami, M., Kavianpour, A. and Javidanbardan, A. (2019). A novel application of ion exchange chromatography in recombinant hepatitis B vaccine downstream processing: improving recombinant HBsAg homogeneity by removing associated aggregates. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1113, pp. 20–29.
42. El Rassi, Z. (2021). Reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography of carbohydrates and glycoconjugates. In: Z. El Rassi, ed. *Carbohydrate Analysis by Modern Liquid Phase Separation Techniques*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier. Ch. 2, pp. 35–124.
43. Gillette, K., Bisschops, M. and Schofield, M. (2021). Development and optimization of multicolumn chromatography for mAb perfusion

processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 97(9), pp. 2473–2484.

44. Chernyshenko, V.O., Platonova, T.M., Makogonenko, Y.M., Rebriev, A.V., Mikhalovska, L.I., Chernyshenko, T.M. and Komisarenko, S.V. (2014).

Fibrin(ogen)olytic and platelet modulating activity of a novel protease from the *Echis multisquamatis* snake venom. *Biochimie*, 105, pp. 76–83.