



БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ ГИРУДИНА-1 ИЗ *Hirudo medicinalis*

© 2012 г. М. А. Костромина, Р. С. Есипов[#], А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, ГСП-7, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 13.07.2011 г. Принята к печати 18.07.2011 г.

Гирудин-1 – высокоселективный ингибитор тромбина, секретируемый слюнными железами медицинских пиявок *Hirudo medicinalis*. Этот антикоагулянт прямого действия используется для профилактики и лечения нарушений в системе свертывания крови. Помимо существующего рекомбинантного аналога гирудина-1 (63-десульфатогирудина-1), медицинское значение имеют его модифицированные аналоги, обладающие повышенной активностью и стабильностью. Полученные нами синтетические гены гирудина-1 и двух его аналогов ([Leu¹, Thr²]гирудина-1 и [Leu¹, Thr²]гирудина-1/3) были клонированы в экспрессирующий вектор pTWIN1 в одной рамке считывания с геном мини-интеина DnaB из *Synechocystis* sp. Штаммы-продуценты соответствующих гибридных белков были созданы на основе штамма *E. coli* ER2566. Разработаны схемы получения 63-десульфатогирудина-1 и его аналогов, включающие стадии выделения гибридного белка после разрушения клеточной биомассы штаммов-продуцентов, ренатурацию целевого пептида в составе гибридного белка, его рН-индуцируемое расщепление и хроматографическую очистку целевого продукта. С помощью стандартного амидолитического теста были определены антитромботические активности полученных пептидов. Разработанные способы получения 63-десульфатогирудина-1, [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1 и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1/3 позволили получить эти пептиды с высоким выходом (14, 25 и 24 мг с 1 л клеточной культуры соответственно) и высокой активностью 13423, 33333 и 19802 АТУ/мг соответственно.

Ключевые слова: 63-десульфатогирудин-1, интеин, антитромботическая активность.

ВВЕДЕНИЕ

В результате нарушения прокоагулянтных, антикоагулянтных и фибринолитических процессов в системе свертывания крови развиваются разные типы тромбозов. Для их лечения используются тромболитические препараты и антикоагулянты прямого и непрямого действия [1]. Медицинская пиявка *Hirudo medicinalis* используется в медицинской практике в гирудотерапии при лечении широкого спектра заболеваний [2]. Секрет ее слюнных желез содержит большое количество биологически активных веществ, в том числе группу изогирудинов – ингибиторов тромбина. Это семейство полипептидов включает три основных компонента (гирудин-1, гирудин-2 и гирудин-3) и

более 17 их аналогов с различными аминокислотными заменами [3, 4]. Гирудин-1 является среди них самым сильным ингибитором тромбина и используется при лечении тромбозов [5].

Все природные гирудины состоят из 64–66 а.о., обладают одинаковой пространственной организацией (*N*-концевой домен с тремя дисульфидными связями и кислый *C*-концевой домен) и содержат сульфогруппу на Tyr63 [6]. Гирудины являются бивалентными ингибиторами тромбина (КФ 3.4.21.5) прямого действия, поскольку одновременно связывают два его сайта: их *N*-концевые области взаимодействуют с субстратсвязывающим участком активного центра тромбина, а отрицательно заряженные *C*-концевые домены – с анионсвязывающим экзосайтом-1 тромбина [7, 8].

Для связывания гирудина-1 с тромбином большое значение имеет наличие сульфогруппы на Tyr63, поэтому несульфатированные рекомбинантные аналоги обладают сниженной антикоагулянтной активностью [9]. При структурных исследованиях комплекса гирудина-1 с тромбином были определены аминокислотные остатки, ответственные за сродство ингибитора к ферменту

Сокращения: АТУ – антитромботическая единица активности; BSA – бычий сывороточный альбумин; CBD – хитинсвязывающий домен; ESI – ионизация распылением в электрическом поле; IPTG – изопропил-β-*D*-1-тиогалактопиранозид; HIR – гирудин-1; NIH – единица коагулянтной активности тромбина в соответствии с NIH-стандартом National Institute of Health; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; TEMED – тетраметилэтилендиамин; TOF – время-пролётный масс-спектрометрический детектор.

[#] Автор для связи: +7 (495) 336-68-33; факс: +7 (495) 330-74-10; эл. почта: esipov@ibch.ru.

[10–12]. На основе результатов этих работ были созданы многочисленные модифицированные аналоги с повышенной антитромботической активностью [13–18]. Среди уже зарегистрированных медицинских препаратов – рекомбинантный гирудин-1 (дезирудин, Iprivask, Canyon Pharmaceuticals) [19–21] и лепирудин (Refludan, Bayer Schering Pharma, Sanofi-Aventis и др.), содержащий две аминокислотные замены Val1Leu и Val2Thr [22, 23].

Целью данной работы было получение трех аналогов природного гирудина-1, различающихся своей антитромботической активностью, а именно: 63-десульфатогирудина-1 (дезирудина), [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1 (лепирудина), содержащего две аминокислотные замены Val1Leu и Val2Thr, и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1/3, состоящего из *N*-концевого (1–52)-фрагмента [Leu¹, Thr²]-гирудина-1 и *C*-концевого (53–66)-фрагмента гирудина-3.

Как правило, рекомбинантные аналоги природных гирудинов получают в составе гибридных белков, содержащих *N*-концевые сигнальные последовательности. При биосинтезе таких белков гирудин секретируется либо в периплазматическое пространство клеток *E. coli* [24, 25], либо в культуральную среду при использовании дрожжей *Pichia pastoris* [26] или *Hansenula polymorpha* [27]. Отличительной особенностью разработанной нами методики является получение 63-десульфатогирудина-1 и его аналогов в составе гибридных белков, в которых белком-носителем является мини-интеин DnaB из *Synechocystis* sp. (рис. 1а). Благодаря способности подобных белков к автокаталитическому расщеплению выделение целевых полипептидов не требует использования протеиназ или химических реагентов [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Существует большое количество примеров выделения интеинсодержащих гибридных белков, способных к автокаталитическому расщеплению с образованием целевого продукта (пептидов и белков) [29, 30]. Особенности интеинопосредованного получения полипептидов были установлены нами ранее при разработке методик выделения глюкогона [31] и эпидермального фактора роста человека [32] и применены в настоящей работе.

Создание рекомбинантных плазмид pER-HIR, pER-HIRLep и pER-HIRLep1/3

Нуклеотидные последовательности генов гирудина-1 и его аналогов были оптимизированы по составу кодонов в соответствии с данными,

представленными в базе данных “Codon-Usage Database” для *Escherichia coli* [33].

Искусственный ген, кодирующий гирудин-1 (*hir*), был получен химико-ферментативным синтезом из частично перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов Н1–Н12. Сконструированный ген использовали в качестве матрицы для ПЦР с концевыми праймерами Н-Int и Н-Ter (рис. 1б), после чего лигировали в плазмидный вектор pGEM-5Zf(–).

Для создания гена, кодирующего [Leu¹, Thr²]-гирудин-1 (*hirLep*), в 5'-конец гена *hir* были введены нуклеотидные замены с помощью ПЦР с частично перекрывающимися синтетическими праймерами Н-Lep1 и Н-Lep2 и праймером Н-Ter (рис. 1в). Сконструированные гены *hir* и *hirLep* были лигированы по сайтам рестрикции LguI и BamHI в экспрессирующий вектор pTWIN1 (New England BioLabs) в одной рамке считывания с 5'-концевыми последовательностями генов хитинсвязывающего домена (CBD) и мини-интеина *Ssp* DnaB. Таким образом, были созданы экспрессирующие векторы pER-HIR и pER-HIRLep, содержащие гибридные гены *dnaB-hir* и *dnaB-hirLep* соответственно.

Ген, кодирующий [Leu¹, Thr²]-гирудин-1/3 (*hirLep1/3*), был создан при лигировании в плазмидный вектор pER-HIRLep по сайтам рестрикции KpnI и BamHI 3'-концевого фрагмента гена гирудина-3, сконструированного из частично перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов С1–С5 (рис. 1г). Полученная экспрессирующая плаزمида pER-HIRLep1/3 не содержала сайтов рестрикции KpnI и BamHI, что позволило осуществить отбор правильного вектора с помощью рестриктоного анализа.

Подбор условий культивирования штаммов-продуцентов E. coli ER2566/pER-HIR, E. coli ER2566/pER-HIRLep и E. coli ER2566/pER-HIRLep1/3

При трансформации компетентных клеток штамма *E. coli* ER2566 экспрессирующими векторами pER-HIR, pER-HIRLep и pER-HIRLep1/3 были созданы штаммы-продуценты гибридных белков DnaB-HIR, DnaB-HIRLep и DnaB-HIRLep1/3, соответственно. Характерной особенностью интеинсодержащих гибридных белков является склонность к автокаталитическому расщеплению *in vivo*, что приводит к снижению выхода целевого продукта при его выделении [34]. Известно о существенном влиянии температурного режима при культивировании на степень расщепления гибридного белка и его растворимость в клеточной цитоплазме.

Было установлено, что гибридный белок DnaB-HIRLep не претерпевал расщепления *in vivo*. Максимальный уровень экспрессии (32% от суммарного клеточного белка) достигался при выращивании клеточной культуры при 37°C в течение 4 ч после индукции (рис. 2, дорожки 4 и 5).

Степень же расщепления белков DnaB-HIR и DnaB-HIRLep1/3 напрямую зависела от температурного режима при выращивании, но в разной степени. Гибридный белок DnaB-HIR расщеплялся на 80% (рис. 2, дорожка 3) за 3 часа при 37°C, а при 25°C – только на 18% (рис. 2, дорожка 2). Гибридный белок DnaB-HIRLep1/3, напротив, при выращивании клеточной культуры при 25°C в течение 4 ч после индукции расщеплялся на 50%, а при 37°C не расщеплялся вовсе (рис. 2, дорожки 6 и 7).

Таким образом, были подобраны оптимальные условия для выращивания созданных клеточных культур. При этом уровень экспрессии для pER-HIR составил 32%, для pER-HIRLep – 25%, для pER-HIRLep1/3 – 28% от суммарного клеточного белка. При центрифугировании 1 л клеточных культур были получены 3.3, 2 и 3 г влажных клеток соответственно.

Выделение и расщепление гибридного белка DnaB-HIR и DnaB-HIRLep1/3

При выращивании клеточных культур штаммов *E. coli* ER2566/pER-HIR и *E. coli* ER2566/pER-HIRLep1/3 гибридные белки DnaB-HIR и DnaB-HIRLep1/3 синтезировались в растворимой форме (рис. 3а и г). После очистки из клеточного супернатанта с помощью анионообменной хроматографии гибридные белки расщеплялись при pH 6.0 и 25°C. Степень расщепления гибридных белков DnaB-HIR и DnaB-HIRLep1/3 через 24 ч составила 98% (определено по результатам электрофореза SDS-ПААГ, рис. 3а и г).

С помощью ОФ ВЭЖХ было определено, что при расщеплении гибридного белка DnaB-HIR образовывалось 2 пептидных продукта (рис. 3б, I). Время элюирования первого продукта совпало со временем элюирования 63-десульфатогирудина-1 (HV-1, Sigma). С помощью ESI-TOF-МС было подтверждено, что продукт 1 является 63-десульфатогирудином-1. Значение его молекулярной массы (M 6962.90 Да) совпало с теоретически рассчитанным (рис. 3в). Наличие второго продукта с молекулярной массой 6963.90 Да свидетельствовало о неэффективной ренатурации в составе гибридного белка *in vivo*. При восстановлении дитиотреитолом дисульфидных связей в гибридном белке DnaB-HIR перед его выделением из кле-

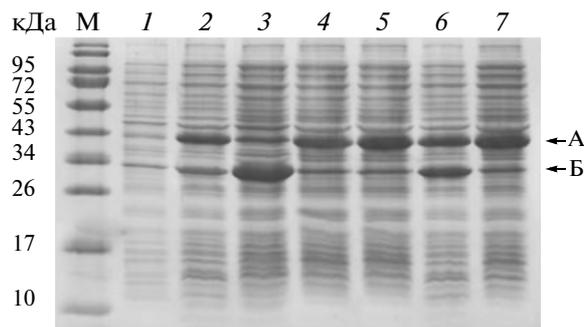


Рис. 2. Подбор условий культивирования штаммов-продуцентов *E. coli* ER2566/pER-HIR (2, 3), *E. coli* ER2566/pER-HIRLep (4, 5) и *E. coli* ER2566/pER-HIRLep1/3 (6, 7). М – маркеры молекулярной массы; 1 – неиндуцированная клеточная культура; 2, 4, 6 – выращивание индуцированной культуры при 25°C; 3, 5, 7 – выращивание индуцированной культуры при 37°C; время культивирования 3 ч (2, 3) и 4 ч (4–7); А – гибридный белок, Б – остаточный полипептид (хитинсвязывающий домен и интеин SspDnaB). Электрофорез в 15% SDS-ПААГ в денатурирующих условиях.

точного супернатанта продукт 2 практически не образовывался (рис. 3б, II).

Ренатурация [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1/3 эффективно происходила *in vivo*, что было доказано при анализе продуктов расщепления гибридного белка DnaB-HIRLep1/3 с помощью ОФ ВЭЖХ (рис. 3д) и ESI-TOF-МС (рис. 3е). Молекулярная масса пептидного продукта 1 (M 7019.92 Да) полностью соответствовала расчетной.

Выделение и расщепление гибридного белка DnaB-HIRLep

При выращивании клеточной культуры штамма *E. coli* ER2566/pER-HIRLep гибридный белок DnaB-HIRLep агрегировал в виде телец включения. Его выделение включало стадии разрушения клеточной биомассы, отмывки полученных телец включения от примесных белков и клеточного дебриса, их растворения в буферном растворе, содержащем 8 М мочевины и 10 мМ β-меркаптоэтанол, и разбавления полученного белкового раствора для ренатурации гибридного белка. Полученный гибридный белок DnaB-HIRLep расщеплялся при pH 6.0 и 25°C. Степень расщепления через 24 ч составила 98% (определено по результатам белкового электрофореза SDS-ПААГ, рис. 4а).

Образовавшиеся при расщеплении белковые продукты анализировали с помощью ОФ ВЭЖХ (рис. 4б). С помощью ESI-TOF-МС было подтверждено, что при расщеплении образовался продукт (M 6978.96 Да), соответствующий

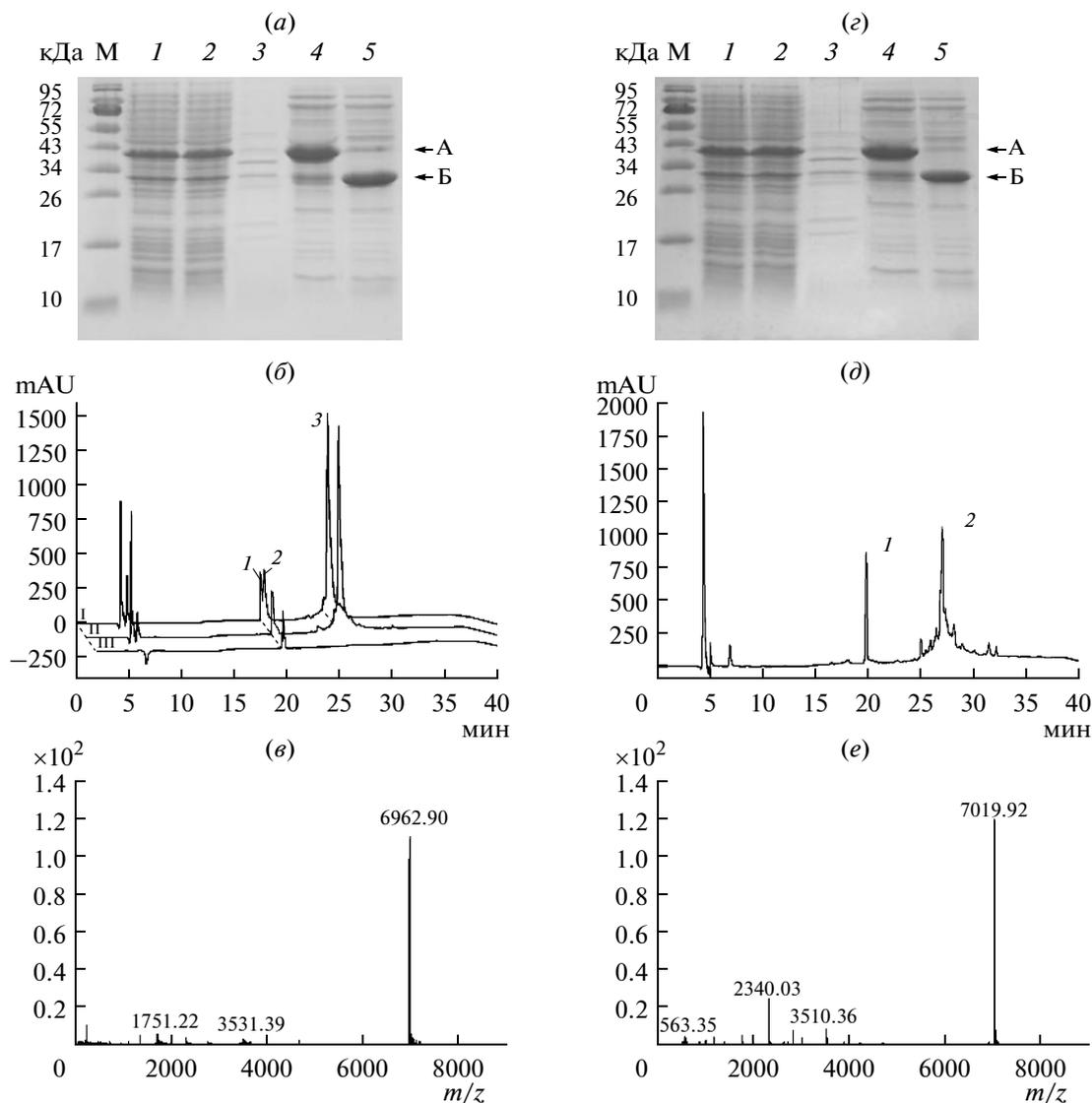


Рис. 3. Выделение 63-десульфатогируидина-1 и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогируидина-1/3. Выделение и расщепление гибридных белков DnaB-HIR (a) и DnaB-HIRLep1/3 (c): M – маркеры молекулярной массы; 1 – тотальный клеточный лизат; 2 – супернатант после центрифугирования клеточного лизата; 3 – осадок после центрифугирования клеточного лизата; 4 – суммарная белковая фракция, полученная после ионообменной хроматографии на Q Sepharose XL; 5 – расщепление гибридного белка через 24 ч при 25°C при pH 6.0. А – гибридный белок, Б – остаточный полипептид (хитин-связывающий домен и интеин *SspDnaB*). Электрофорез в 15% SDS-ПААГ; (б) Хроматографический анализ продуктов расщепления гибридного белка DnaB-HIR: 63-десульфатогируидин-1 (1), продукт его неправильного рефолдинга (2) и остаточный полипептид (хитин-связывающий домен и интеин *SspDnaB*) (3). I – расщепление гибридного белка DnaB-HIR; II – расщепление гибридного белка DnaB-HIR, восстановленного дитиотреитолом; III – маркер (5 мкг HV-1). (д) Хроматографический анализ продуктов расщепления гибридного белка DnaB-HIRLep1/3: [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогируидин-1/3 (1) и остаточный полипептид (хитин-связывающий домен и интеин *SspDnaB*) (2); ESI-TOF-МС 63-десульфатогируидина-1 (e) и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогируидина-1/3 (e).

[Leu¹, Thr²]-63-десульфатогируидину-1 (рис. 4в). Таким образом, ренатурация [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогируидина-1 эффективно проходила в составе гибридного белка и не требовала вспомогательных реагентов.

Выделение 63-десульфатогируидина-1 и его аналогов

После расщепления гибридного белка осуществляли очистку целевого пептида от интеина *SspDnaB* и примесных клеточных белков с помощью анионообменной хроматографии и

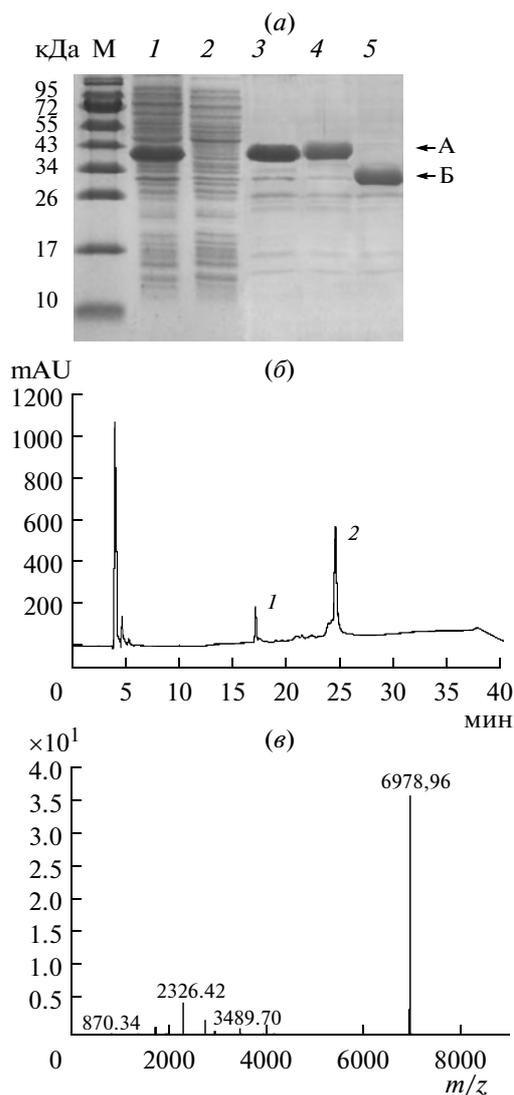


Рис. 4. Выделение $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1. (а) Выделение и расщепление гибридного белка DnaB-HIRLep. М – маркеры молекулярной массы; 1 – клеточный лизат; 2 – супернатант после центрифугирования клеточного лизата; 3 – тельца включения; 4 – ренатурация гибридного белка; 5 – расщепление гибридного белка через 24 ч при 25°C при pH 6.0. А – гибридный белок, Б – остаточный полипептид (хитин-связывающий домен и интеин *Ssp*-DnaB). Электрофорез в 15% SDS-ПААГ в денатурирующих условиях. (б) Хроматографический анализ продуктов расщепления гибридного белка DnaB-HIRLep: $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудин-1 (1) и остаточный полипептид (хитинсвязывающий домен и интеин *Ssp*-DnaB) (2). (в) ESI-TOF-МС выделенного $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1.

ОФ ВЭЖХ. Для удаления компонентов буферной системы использовали гель-фильтрационную хроматографию.

Разработанные методики позволили осуществить выделение 63-десульфатогирудина-1,

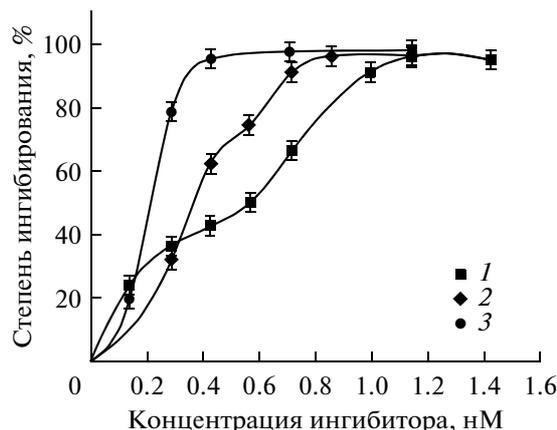


Рис. 5. Антитромботическая активность 63-десульфатогирудина-1 (1), $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1/3 (2), $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1(3).

$[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1 и $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1/3 с выходом 14, 25 и 24 мг с одного литра культуральной среды.

Определение биологической активности 63-десульфатогирудина и его аналогов

Были определены антитромботические активности полученных рекомбинантных аналогов гирудина-1. Для измерения использовали стандартный амидолитический тест, основанный на способности тромбина расщеплять искусственный аналог фибриногена, биологического субстрата тромбина – *N-n*-тозил-Gly-Pro-*n*-нитроанилид [35, 36]. Ингибирующая активность антитромботических препаратов измеряется в антитромботических единицах (АТУ). 1 АТУ соответствует количеству ингибитора, которое снижает коагуляционную активность тромбина на 1 НИН-единицу.

Было установлено, что для 100% ингибирования 0.2 НИН-единиц тромбина требуется 14.9 нг 63-десульфатогирудина-1, 10.1 нг $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1/3 и 6 нг $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1 (рис. 5) [35]. Исходя из этого, были рассчитаны их антитромботические активности: 13423 АТУ/мг для 63-десульфатогирудина-1, 19802 АТУ для $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1/3 и 33333 АТУ для $[\text{Leu}^1, \text{Thr}^2]$ -63-десульфатогирудина-1. Полученные значения активностей сопоставимы с приведенными в других литературных источниках [17, 33].

Разработанные нами методики интеин-опосредованного получения аналогов гирудина-1 не содержат выделенной стадии ренатурации целе-

вых пептидов в отличие от ранее описанной схемы выделения гирудина-1 [37]. Кочановским и соавт. был создан гибридный белок, состоящий из интеина *Sce VMA* из *Saccharomyces cerevisiae* и гирудина-1 и способный к тиол-зависимому расщеплению. Однако именно из-за использования тиольного реагента (дитиотреитола) в высокой концентрации требовалось проведение дополнительных стадий диализа и ренатурации гирудина-1 с помощью окислительно-восстановительной пары цистеин–цистин.

Таким образом, разработанные нами методики позволили получить 63-десульфатогирудин-1, [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудин-1 и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудин-1/3 с высоким выходом (14, 25 и 24 мг/л клеточной культуры, соответственно) и высокой активностью 13423, 33333, 19802 АТУ, соответственно. Наибольшей антитромботической активностью среди выделенных пептидов обладал [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудин-1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, хлорид натрия, гидроксид натрия, соляную кислоту, полиэтиленгликоль 6000, уксусную кислоту, этанол, ацетон, мочевины (Реахим), персульфат аммония (Merck); ацетонитрил (ЛесБиофарм); акриламид, *N,N*-метиленбисакриламид, Кумасси бриллиантовый синий R-250 (Bio-Rad); бромфеноловый синий, TEMED, оранжевый G, агарозу, дитиотреитол, додецилсульфат натрия, EDTA, LiClO₄, глицин, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), бромистый этидий; IPTG, BSA (Sigma); агар, дрожжевой экстракт, бакто-триптон, бакто-агар (Difco); ATP, dNTP (Fermentas), рестриктазы EcoRV, KpnI, LguI и BamHI (Fermentas), ДНК-лигазу фага T4, T4-полинуклеотидкиназу, Pfu-ДНК-полимеразу, Taq-ДНК-полимеразу (Fermentas); клеточные штаммы *E. coli* XL1-Blue и ER2566 (NEB); *N-n*-тозил-Gly-Pro-*n*-нитроанилид, тромбин человека (Sigma), рекомбинантный гирудин-1 (HV-1) из *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma).

Создание рекомбинантной плазмиды pGEM-HIR. Искусственный ген *hir*, кодирующий гирудин-1, был получен химико-ферментативным синтезом с использованием синтетических олигонуклеотидов H-Int (5') GGTGGTTGCTCTTCSAACGTGGTGTACACCGAT (подчеркнут сайт расщепления рестриктазой LguI) и H-Ter (5') GGTGGTGGATCCCTATTACTGCAGGTATTCTTC (подчеркнут сайт расщепления рестриктазой

BamHI) и частично перекрывающихся олигонуклеотидов H1–H12 (5'–3'):

GTGGTGTACACCGATTGTACCGAATCTGGT	H1
CAGAACCTGTGTCTGTGTGAAGGTTCTAAC	H2
GTTTGTGGTCAGGGTAACAAATGTATTCTG	H3
GGTCTGTATGGTGAAAAAACCAGTGTGTT	H4
ACCGGTGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCT	H5
CATAACGATGGTGAATTTGAAGAAATCCG	H6
TTACTGCAGGTATTCTTCCGGAATTTCTTCAAA	H7
ATCACCATCGTTATGAGACTGCGGTTTCCGG	H8
GGTACCTTCACCGGTAACACACTGGTTTTTTT	H9
CACCATCAGAACCCAGAATACATTTGTT	H10
ACCCTGACCACAAACGTTAGAACSTTCACACA	H11
CAGACACAGGTTCTGACCAGATTCGGTACA	H12

По 200 пмоль олигонуклеотидов H2–H6 и H8–H12 были фосфорилированы с помощью T4-полинуклеотидкиназы в соответствии с протоколом, предлагаемым фирмой-производителем. Смесь фосфорилированных и нефосфорилированных олигонуклеотидов H1 и H7 (по 200 пмоль) была осаждена 10 объемами 2% LiClO₄ в ацетоне при –20°C за 20 мин. Осадок олигонуклеотидов, полученный после центрифугирования в течении 10 мин при 14000 об/мин, дважды промыли в 200 мкл ацетона, высушили на лиофильной сушке (Speed Vac Concentrator CS 18, Savant Instruments Harvegetul) и растворили в 15 мкл воды milliQ. Полученную смесь олигонуклеотидов прогрели 2 мин при 95°C, медленно охладили до 25°C и лигировали с помощью ДНК-лигазы фага T4 в соответствии с протоколом, предлагаемым фирмой-производителем (Fermentas). Сконструированный ген *hir* амплифицировали с помощью ПЦР с использованием Pfu-ДНК-полимеразы и синтетических праймеров H-Int и H-Ter.

ПЦР проводили с помощью Pfu-ДНК-полимеразы в соответствии с протоколом, предлагаемым фирмой-производителем, в амплификаторе PTC-200 DNA Engine Cycler (Bio-Rad). Созданный ген *hir* был лигирован по тупым концам с помощью ДНК-лигазы фага T4 с плазмидным вектором pGEM-5Zf(–) (Promega), предварительно обработанным рестриктазой EcoRV. Все ферментативные реакции осуществляли в соответствии с протоколами, предлагаемыми фирмой-производителем (Fermentas). Лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Отбор рекомбинантов проводили по сине-белой реакции в соответствии с руководством [38]. Плазмиды, выделенные из неокрашенных клонов *E. coli* XL1-Blue/pGEM-HIR, проверяли на наличие гена *hir* с помощью ПЦР с использованием Taq-ДНК-полимеразы и праймеров H-Int и H-Ter. Правильность последовательности созданного

гена *hir* подтверждали секвенированием на автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 2000.

Создание экспрессирующего вектора pER-HIR. Рекombинантные плазмиды pGEM-HIR и pTWIN1 были последовательно обработаны эндонуклеазами рестрикции LguI и BamHI и полученные фрагменты были лигированы с помощью ДНК-лигазы фага T4. Все ферментативные реакции осуществляли в соответствии с протоколами, предлагаемыми фирмой-производителем (Fermentas). Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Отбор экспрессирующего вектора pER-HIR осуществляли с помощью ПЦР с использованием Taq-ДНК-полимеразы и праймеров H-Int и H-Ter.

Создание экспрессирующего вектора pER-HIRLep. Синтетический ген *hirLep*, кодирующий [Leu¹, Thr²]-гирудин-1, был получен с помощью ПЦР с использованием Pfu-ДНК-полимеразы в соответствии с протоколом, предлагаемым фирмой-производителем. В качестве матрицы применяли плазмидный вектор pGEM-HIR, а в качестве праймеров – олигонуклеотид H-Ter (5') GGTG-GTGGATCCTATTACTGCAGGTATTCTTC (подчеркнут сайт расщепления рестриктазой BamHI) и

частично перекрывающиеся синтетические олигонуклеотиды H-Lep1 (5') GGTGGTTGCTCT-TCTAACCTGACCTACACC (подчеркнут сайт расщепления рестриктазой LguI) и H-Lep2 (5') CTTCTAACCTGACCTACACCGATTGTACCGA. Полученный ПЦР-продукт и плазмидный вектор pTWIN1 (New England BioLabs) были последовательно обработаны эндонуклеазами рестрикции LguI и BamHI и лигированы между собой с помощью ДНК-лигазы фага T4. Все ферментативные реакции осуществляли в соответствии с протоколами, предлагаемыми фирмой-производителем (Fermentas). Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Отбор экспрессирующего вектора pER-HIRLep осуществляли с помощью ПЦР с использованием Taq-ДНК-полимеразы (Fermentas) и праймеров H-Lep2 и H-Ter.

Создание экспрессирующего вектора pER-HIRLep1/3. Ген *hirLep1/3*, кодирующий [Leu¹, Thr²]-гирудин-1/3, был получен при лигировании в рекombинантную плазмиду pER-HIRLep 3'-концевого фрагмента гена гирудина-3, сконструированного из частично перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов C1–C5 (5'–3')

GCCGAAACCGCAGTCTCATAACCAGGGTGATTTTG
AACCGATTCCGGAAGATGCGTACGATGAATAATAA
GATCTTATTATTCATCGTACGCATCT
TCCGGAATCGGTTCAAATCACCCCTG
GTTATGAGACTGCGGTTTTCGGCGTAC

C1
C2
C3
C4
C5

По 200 пмоль олигонуклеотидов C2, C4 и C5 фосфорилировали с помощью T4-полинуклеотидкиназы в соответствии с протоколом, предлагаемым фирмой-производителем. Смесью фосфорилированных и нефосфорилированных олигонуклеотидов C1 и C3 (по 200 пмоль) осаждали 10 объемами 2% LiClO₄ в ацетоне за 20 мин при –20°C. Осадок олигонуклеотидов, полученный после центрифугирования в течении 10 мин при 14000 об/мин, дважды промывали в 200 мкл ацетона, сушили на лиофильной сушке (Speed Vac Concentrator CS 18, Savant Instruments Harvegetul) и растворяли в 15 мкл воды milliQ. Полученную смесь олигонуклеотидов прогревали 2 мин при 95°C и медленно охлаждали до 25°C. После чего лигировали с помощью ДНК-лигазы фага T4 с плазмидным вектором pER-HIR, предварительно обработанным эндонуклеазами рестрикции KpnI и BamHI, в соответствии с протоколом, предлагаемым фирмой-производителем. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Отбор плазмидного вектора

pER-HIRLep1/3 осуществляли с помощью рестриктоного анализа с использованием эндонуклеаз рестрикции KpnI и BamHI. Правильность последовательности созданного гена *hirLep1/3* подтверждали секвенированием на автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 2000.

Культивирование штаммов E. coli ER2566/pER-HIR, E. coli ER2566/pER-HIRLep и E. coli ER2566/pER-HIRLep1/3 осуществляли следующим образом: трансформированные созданными экспрессирующими векторами клетки штамма *E. coli* ER2566 высевали в колбу Эрленмейера для культивирования, содержащую 100 мл среды LB (1% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl) с ампициллином (100 мкг/мл), выращивали 16 ч при 37°C на шейкере CERTOMAT® S II (Sartorius) при перемешивании со скоростью 200 об/мин для получения ночной культуры с A₆₀₀ = 3.5. Далее ночные культуры высевали в 3 литра среды LB с ампициллином (100 мкг/мл): в колбы Эрленмейера для культивирования с 250 мл среды добавляли по 5 мл

ночной культуры. Клеточные культуры выращивали при 37°C на шейкере при перемешивании со скоростью 200 об/мин до $A_{600} = 1.0$, после чего добавляли IPTG до концентрации 0.4 мМ и выращивали 3 ч при 25°C (штамм *E. coli* ER2566/pER-HIR) и 4 ч при 37°C (штаммы *E. coli* ER2566/pER-HIRLep и *E. coli* ER2566/pER-HIRLep1/3). После чего клеточные культуры центрифугировали в течение 20 мин при 4°C и 4000 об/мин (центрифуга Heraeus Cytofuge 20-3, ротор 54).

Гибридные белки DnaB-HIR и DnaB-HIRLep1/3 выделяли из клеточного супернатанта после разрушения соответствующих штаммов-продуцентов *E. coli* ER2566/pER-HIR и *E. coli* ER2566/pER-HIRLep1/3. Клеточную биомассу, полученную при выращивании 3 л клеточной культуры, ресуспендировали в 10 объемах буферного раствора pH 8.5, содержащего 50 мМ Трис HCl, 10 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, и разрушали на УЗ-дезинтеграторе (Labsonic® P, Sartorius, цикл – 0.5 с, амплитуда – 50%) в течение 20 мин при 4°C. После чего клеточную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 12000 об/мин и 4°C (центрифуга HERMLE Z383K). Полученный супернатант разбавляли в 2 раза водой milliQ, титровали 1 М NaOH до pH 9.0 и фильтровали с помощью фильтров с размером пор 0.45 мкм (Millipore). При выделении гибридного белка DnaB-HIRLep1/3 в клеточный супернатант добавляли 1 М дитиотреитол до концентрации 10 мМ и инкубировали 3 ч при 23°C.

Очистку гибридных белков осуществляли с помощью хроматографии на колонке XK 16/20 (GE Healthcare) с 25 мл анионообменного сорбента Q Sepharose XL (GE Healthcare). Разбавленный раствор супернатанта наносили со скоростью 2 мл/мин на колонку, уравновешенную буферным раствором pH 9.0, содержащим 50 мМ Трис-HCl, 5 мМ EDTA 10 мМ дитиотреитол. После нанесения колонку уравновешивали буферным раствором pH 9.0, содержащим 50 мМ Трис-HCl, 5 мМ EDTA, и проводили хроматографию в градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М за 120 мин) со скоростью 2 мл/мин. Объединяли фракции, содержащие более 20% целевого гибридного белка. Полученный белковый раствор титровали 1 М HCl до pH 6.0 и оставляли на 24 ч при 25°C для расщепления гибридного белка.

Гибридный белок DnaB-HIRLep выделяли из клеточной биомассы штамма *E. coli* ER2566/pER-HIRLep в виде телец включения. 10 г влажных клеток, полученных при выращивании 3 л клеточной культуры, ресуспендировали в 100 мл буферного раствора pH 8.5, содержащего 50 мМ Трис HCl, 10 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, и разрушали на УЗ-дезинтеграторе (Labsonic® P, Sartorius, цикл – 0.5 с, амплитуда – 50%) в течение 10 мин при 4°C. Клеточную суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 12000 об/мин и 4°C (цен-

трифуга HERMLE Z383K). Осадок телец включения ресуспендировали в 100 мл буферного раствора pH 8.5, содержащего 50 мМ Трис HCl, 10 мМ EDTA, перемешивали в течение 30 мин и центрифугировали 20 мин при 12000 об/мин и 4°C.

Отмытые тельца включения ресуспендировали в 100 мл буферного раствора pH 10, содержащего 50 мМ Трис HCl, 5 мМ EDTA, 8 М мочевины, 10 мМ β-меркаптоэтанол, и оставляли при перемешивании на 24 ч при 22°C. Нерастворимый клеточный дебрис отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 12000 об/мин. Полученный раствор телец включения разбавляли в 20 раз в 1900 мл буферного раствора pH 8.0, содержащего 50 мМ Трис HCl, 5 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, и оставляли при перемешивании на 24 ч при 10°C. После чего белковый раствор титровали 1 М HCl до pH 6.0 и инкубировали 24 ч при 25°C для расщепления гибридного белка DnaB-HIRLep.

Конечную очистку 63-десульфатогирудина-1 и его аналогов осуществляли с помощью хроматографии на колонке XK 16/20 (GE Healthcare) с 25 мл анионообменного сорбента Q Sepharose HP (GE Healthcare). Белковый раствор, содержащий продукты расщепления гибридного белка, титровали 1 М HCl до pH 4.8. Полученную белковую суспензию фильтровали от выпавшего белка сначала через складчатый фильтр с размером пор 8 мкм (Millipore), а затем через фильтры с размером пор 0.45 мкм (Millipore). Фильтрат наносили со скоростью 1 мл/мин на колонку XK 26/20 Q Sepharose HP, уравновешенную буферным раствором 20 мМ ацетат натрия, pH 4.8. После нанесения колонку отмывали тем же буфером, уравновешивали буферным раствором pH 4.8, содержащим 20 мМ ацетат натрия, 50 мМ NaCl, и элюировали белок в условиях градиента pH от 4.8 до 3.6 за 125 мин со скоростью 1 мл/мин. Объединяли фракции, содержащие целевой пептид (50 мл с концентрацией белка 1.1–1.8 мг/мл).

Последующую очистку 63-десульфатогирудина-1 и его аналогов осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Диасорб-130-С16Т 7 мкм, 16 × 250 мм (БиоХимМак СТ). К 50 мл раствора целевого пептида, очищенного с помощью ионообменной хроматографии, добавляли 5 мл ацетонитрила и 50 мкл 100% TFA, фильтровали через фильтр 0.22 мкм (Millipore) и наносили на колонку со скоростью 2 мл/мин. Хроматографию осуществляли в градиенте 80%-го ацетонитрила (от 10 до 60%) в 0.1% TFA за 60 мин со скоростью 3.5 мл/мин. Фракции, содержащие более 98% нативного пептида (63-десульфатогирудина-1 или его аналогов), объединяли и лиофильно высушивали на центробежном концентраторе CentriVar Acid-Resistant System (Labconco Corp). В результате получали 44 мг 63-десульфатогирудина-1 и по

77 мг [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1 и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1/3.

Очистку пептидов от компонентов буфера (ацетонитрила и TFA) осуществляли с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Высушенный белок растворяли в воде milliQ до концентрации 20 мг/мл и наносили на колонку XK 16/70 (GE Healthcare) с 120 мл сорбента Superdex 30 prep grade (GE Healthcare). Хроматографию проводили в буферном растворе 20 мМ бикарбоната аммония, pH 8.0 со скоростью 1.5 мл/мин. Фракции, содержащие целевой пептид, собирали и лиофильно высушивали с помощью центробежного концентратора CentriVar Acid-Resistant System (Labconco Corp). В результате получали 40 мг 63-десульфатогирудина-1 и по 74 мг [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1 и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1/3.

Аналитическую ОФ ВЭЖХ проводили на колонке Prosphere C18 300 А 5μ, 150 × 4.6 мм. Анализируемые белковые продукты элюировали в градиенте 80%-го ацетонитрила (от 8 до 64%) в 0.1% TFA со скоростью потока 0.75 мл/мин.

Определение ингибирования активности тромбина аналогами 63-десульфатогирудина-1 осуществляли в амидолитическом тесте *in vitro* по стандартному протоколу [6, 35, 36]. Определенное количество исследуемого пептида добавляли в реакционный буфер pH 8.0, содержащий 50 мМ Трис-НCl, 150 мМ NaCl, 0.1% полиэтиленгликоля 6000, и инкубировали при 37°C в течение 1 мин. К полученной реакционной смеси (V940 мкл) добавляли тромбин человека (0.2 НИЕ-единицы активности, 10 мкл раствора 20 НИЕ/мл), тщательно перемешивали и инкубировали в течение 2 мин при 37°C. Добавляли 50 мкл 2 мМ раствора хромогенного субстрата *N*-*n*-тозил-Gly-Pro-*n*-нитроанилида и измеряли изменение оптического поглощения при длине волны 405 нм в течение 5 мин при 37°C на спектрофотометре Hitachi U-2900.

Масс-спектрометрия. Пептидные продукты анализировали с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1200 с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором ESI-TOF (LS/MS) Agilent 6224 LC.

Белковый электрофорез проводили в денатурирующих условиях в системе Laemmli [39]. Использовали двухступенчатый гель: верхний (концентрирующий) – 4% ПААГ, нижний (разделяющий) – 15% ПААГ.

Концентрации белка определяли по методу Лоури [40]. Содержание белка в пробе рассчитывали по калибровочным графикам, построенным с помощью стандартных растворов BSA или десульфатогирудина-1 (1 мг/мл).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schulman S., Bijsterveld N.R. // *Transfus. Med. Rev.* 2007. V. 21. P. 37–48.
2. Porshinsky B.S., Saha S., Grossman M.D., Beery I.P.R., Stawicki S.P. // *J. Postgrad. Med.* 2011. V. 57. P. 65–71.
3. Scharf M., Engels J., Tripier D. // *FEBS Lett.* 1989. V. 255. P. 105–110.
4. Tripier D. // *Fol. Haematol. Leipzig.* 1988. V. 115. P. 30–35.
5. Markwardt F. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2002. V. 28. P. 405–414.
6. Clore G.M., Sukumaran D.K., Nilges M., Zarbock J., Gronenborn A.M. // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 529–537.
7. Fenton J.W. 2nd, Villanueva G.B., Ofosu F.A., Maragone J.M. // *Haemostasis.* 1991. V. 21. P. 27–31.
8. Mengwasser K.E., Bush L.A., Shih P., Cantwell A.M., Di Cera E. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 26997–27003.
9. Stone S.R., Hofsteenge J. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 4622–4628.
10. Rydel T.J., Ravichandran K.G., Tulinsky A., Bode W., Huber R., Roitsch C., Fenton J.W. 2nd // *Science.* 1990. V. 249. P. 277–280.
11. Rydel T.J., Tulinsky A., Bode W., Huber R. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 221. P. 583–601.
12. Braun P.J., Dennis S., Hofsteenge J., Stone S.R. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 6517–6522.
13. Warkentin T.E. // *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 2004. V. 17. P. 105–125.
14. Knapp A., Degenhardt T., Dodt J. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 24230–24234.
15. Mo W., Zhang Y.L., Chen H.S., Wang L.S., Song H.Y. // *J. Thromb. Thrombolysis.* 2009. V. 28. P. 230–237.
16. Komatsu Y., Inoue Y., Goto Y., Fukazawa T., Hayashi H. // *Thromb. Haemost.* 1999. V. 81. P. 250–255.
17. Komatsu Y., Misawa S., Sukesada A., Ohba Y., Hayashi H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 196. P. 773–779.
18. Szemraj J., Stankiewicz A., Rozmyslowicz-Szermanska W., Mogielnicki A., Gromotowicz A., Buczek W., Oszejca K., Bartkowiak J., Chabielska E. // *Thromb. Haemost.* 2007. V. 97. P. 1037–1045.
19. Narayanan K., Walenga J.M., Liang M.D., Fareed J. // *Haemostasis.* 1991. V. 21. P. 168–171.
20. Vranckx P., Valgimigli M., Serruys P. // *EuroIntervention.* 2011. V. 7. P. 263–269.
21. Nafziger A.N., Bertino J.S. Jr. // *J. Clin. Pharmacol.* 2010. V. 50. P. 614–622.
22. Greinacher A. // *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2004. V. 2. P. 339–357.
23. Iqbal O., Tobu M., Aziz S., Gerdisch M., Da Valle M., Demir M., Hoppensteadt D.A., Ahmad S., Walenga J.M., Fareed J. // *J. Card. Surg.* 2005. V. 20. P. 42–51.
24. Dodt J., Schmitz T., Schafer T., Bergmann C. // *FEBS Lett.* 1986. V. 202. P. 373–377.
25. Tan S., Wu W., Liu J., Kong Y., Pu Y., Yuan R. // *Protein. Expr. Purif.* 2002. V. 25. P. 430–436.
26. Rosenfeld S.A., Nadeau D., Tirado J., Hollis G.F., Knabb R.M., Jia S. // *Protein. Expr. Purif.* 1996. V. 8. P. 476–482.

27. Weydemann U., Keup P., Piontek M., Strasser A.W., Schweden J., Gellissen G., Janowicz Z.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. V. 44. P. 377–385.
28. Elleuche S., Poggeler S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 479–489.
29. Sharma S.S., Chong S., Harcum S.W. // J. Biotechnol. 2006. V. 125. P. 48–56.
30. Sharma S.S., Chong S., Harcum S.W. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2005. V. 126. P. 93–118.
31. Esipov R.S., Stepanenko V.N., Gurevich A.I., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. // Protein. Pept. Lett. 2006. V. 13. P. 343–347.
32. Esipov R.S., Stepanenko V.N., Chupova L.A., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Miroshnikov A.I. // Protein. Expr. Purif. 2008. V. 61. P. 1–6.
33. Zaneveld J., Hamady M., Sueoka N., Knight R. // Methods. Mol. Biol. 2009. V. 537. P. 207–232.
34. Mathys S., Evans T.C., Chute I.C., Wu H., Chong S., Benner J., Liu X.Q., Xu M.Q. // Gene. 1999. V. 231. P. 1–13.
35. Iyer L., Fareed J. // Thromb. Res. 1995. V. 78. P. 259–263.
36. Eric D. // Thromb. Res. 1990. V. 60. P. 433–443.
37. Kochanowski R., Kotlowski R., Szweda P. // Protein. Expr. Purif. 2006. V. 50. P. 25–30.
38. Sambrook J., Russell D.W. // Molecular cloning: a laboratory manual / Second Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. P. 1.85–1.86.
39. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
40. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.

Biotechnological Production of Recombinant Analogs of Hirudin-1 from *Hirudo medicinalis*

M. A. Kostromina, R. S. Esipov[#], and A. I. Miroshnikov

[#]Phone: +7 (495) 336-68-33; fax +7 (495) 330-74-10; e-mail: esipov@ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia*

Hirudin-1 is a highly selective inhibitor of thrombin secreted by salivary glands of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. This direct anticoagulant is used for the treatment and prevention of disorders in blood coagulation system. Apart from the existing recombinant analog of hirudin-1 (63-desulfatohirudin-1, desirudin) its modified analogs possessing higher activity and stability are of medical value. In this study artificial genes of hirudin and two its analogs (hirudin-1, [Leu¹, Thr²]-hirudin-1 and [Leu¹, Thr²]-hirudin-1/3) were synthesized and cloned in an expression vector pTWIN1 in frame with the gene of mini-intein *SspDnaB* from *Synechocystis* sp. Producing strains of the corresponding fusion proteins were constructed using *E. coli* strain ER2566. Biotechnological schemes for the production of 63-desulfatohirudin-1 and its analogs were developed. The scheme includes the following stages: isolation of the fusion protein after the desintegration of the cell biomass, refolding of the target peptide within the fusion protein, pH-inducible cleavage of the fusion protein, and chromatographic purification of the target product. Antithrombotic activity of the obtained peptides was determined by a standard amidolytic assay. The developed methods for the production of 63-desulfatohirudin-1, [Leu¹, Thr²]-desulfatohirudin-1 и [Leu¹, Thr²]-desulfatohirudin-1/3 allowed to obtain these peptides with high yields (14, 25 and 24 mg per liter of cell culture respectively) and high activity (13423, 33333 and 19802 ATU/mg respectively).

Keywords: 63-desulfatohirudin-1, intein, antithrombotic activity.