

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Комаревцев Сергей Константинович

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ СЕКРЕТИРУЕМОЙ
МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D ПРОТЕАЗЫ-
АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в лаборатории молекулярной биотехнологии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Института биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научные руководители: *Осмоловский Александр Андреевич,*
кандидат биологических наук
Мирошников Константин Анатольевич,
член-корреспондент РАН, доктор химических наук

Официальные оппоненты: *Калбина Татьяна Сергеевна,*
доктор биологических наук, профессор,
МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический
факультет, кафедра молекулярной биологии,
ведущий научный сотрудник
Кураков Александр Васильевич,
доктор биологических наук, доцент,
МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический
факультет, заведующий кафедрой микологии и
альгологии
Синеокий Сергей Павлович,
доктор биологических наук, профессор,
НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика,
директор НБЦ Всероссийская коллекция
промышленных микроорганизмов

Защита диссертации состоится 20 сентября 2022 г. в 15³⁰ часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.2(МГУ.03.13) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, аудитория 389.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/460732822/>.

Автореферат разослан «01» июля 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Способность микроскопических грибов образовывать в лабораторных условиях протеолитические ферменты, свойства которых могут иметь практическое применение в медицинских и диагностических целях, начала активно изучаться сотрудниками кафедры микробиологии биологического факультета МГУ в последние годы прошлого века (Ландау и др., 1998). Эти работы были продолжены, и позднее была показана способность секретируемых протеаз микромицета *Aspergillus ochraceus* напрямую активировать протеин С плазмы крови из неактивного предшественника (Осмоловский и др., 2012; 2014). Благодаря своим свойствам, антикоагулянтная протеаза микромицета *A. ochraceus* стала рассматриваться как перспективный аналог протеазы-активатора протеина С плазмы крови из яда южноамериканского медноголового щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*, которая широко используется в современной диагностике и медицине (Осмоловский и др., 2015; 2018). Анализ активности протеина С плазмы крови, ключевым компонентом которого является протеаза-активатор из змеиного яда, назначают при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы, сепсисе, гемодиализе, во время приема антикоагулянтных препаратов, а также при подготовке к беременности (Gempeler-Messina et al., 2001; Mohammed and Favalaro, 2017). Помимо этого, поскольку поиск новых тромболитических и антикоагулянтных ферментов продолжает оставаться актуальной задачей фармацевтической отрасли, протеаза микромицета *A. ochraceus* является перспективным кандидатом для использования в терапевтических целях в медицине и ветеринарии.

Для проведения дальнейших исследований и внедрения в практику возникла необходимость получения протеазы-активатора протеина С, образуемой *A. ochraceus*, в препаративных количествах. Известные в настоящее время способы позволяют получить ограниченное количество активного фермента, однако их масштабирование затруднительно (Батомункуева и Егоров, 2001; Осмоловский и др., 2013). Настоящая работа направлена на поиск и исследование масштабируемых биотехнологических методов для получения препаративных количеств антикоагулянтной протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было исследование способов биотехнологического получения протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой штаммом микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D на образование протеазы-активатора протеина С плазмы крови;
2. Разработать способ очистки протеазы-активатора протеина С плазмы крови из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D с использованием современных хроматографических носителей;
3. Установить и проанализировать последовательность гена, кодирующего протеазу-активатор протеина С плазмы крови, образуемую микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D;
4. Исследовать возможность бактериальной экспрессии протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, для получения функционально активного фермента.

Объектом исследования являлась секретируемая протеаза-активатор протеина С плазмы крови, образуемая почвенным микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.

Предметом исследования являлись разнообразные масштабируемые биотехнологические способы, позволяющие получать препаративное количество данного фермента.

Научная новизна работы. Впервые показана возможность многократного использования иммобилизованного в полимерных гранулах микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D для получения протеазы-активатора протеина С плазмы крови, выявлены увеличенная интенсивность образования целевого фермента при иммобилизации и повышенная стабильность продуцента по сравнению с традиционным глубинным культивированием. Разработан трехстадийный способ хроматографической очистки целевой протеазы из культуральной жидкости.

Впервые установлена и проанализирована последовательность гена протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D. Показана принадлежность исследуемой протеазы к группе протеиназы-К-подобных субтилизиновых протеаз. Установленная в работе последовательность гена депонирована в международной базе данных NCBI GenBank под регистрационным номером MW183406.

В результате бактериальной экспрессии в штамме *E. coli* BL21 и последующей хроматографической очистки была получена функционально активная форма протеазы-активатора протеина С плазмы крови, идентичная образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, изучены особенности фолдинга и созревания исследуемого фермента.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование влияния иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D на образование

протеазы-активатора протеина С плазмы крови позволяет глубже понять особенности морфологии, развития и стабильности продуцента при его росте в полимерных гранулах иммобилизирующего носителя. Выявленные особенности взаимодействия исследуемой протеазы с хроматографическими носителями расширяют имеющиеся знания о физико-химических свойствах фермента. Установленная последовательность протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, имеет важное значение для понимания происхождения, строения и функционирования исследуемого фермента.

Практическая значимость работы заключается в формировании научных подходов к промышленному получению исследуемого фермента. В работе предложены три возможные технологические схемы его производства.

Методология и методы исследования. Автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, планирование и проведение экспериментальной и биоинформатической частей работы. Полученные результаты были проанализированы и систематизированы, написаны все главы диссертации, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Иммобилизация микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D является перспективным биотехнологическим подходом, позволяющим увеличить интенсивность образования протеазы-активатора протеина С плазмы крови, повысить стабильность продуцента и сделать возможным его многократное использование в процессе культивирования;
2. Для очистки целевого фермента из культуральной жидкости рекомендуется использовать комбинацию фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной, ионообменной и гель-проникающей хроматографии;
3. Протеаза-активатор протеина С плазмы крови, образуемая микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, относится к группе протеиназы-К-подобных субтилизиновых протеаз. Ген исследуемого фермента состоит из 1394 пар оснований и имеет три коротких некодирующих участка (интрона) длиной 58, 59 и 62 пары оснований. Кодированный участок ДНК протеазы состоит из 1215 пар оснований и отвечает за синтез полипептидной цепи неактивного предшественника фермента, состоящего из 404 аминокислот. Первая 21 аминокислота (Met¹-Ala²¹) составляет сигнальную последовательность, далее располагается 101-аминокислотный пропептидный домен (Pro²²-Asp¹²²), за которым следует протеазный домен, состоящий из 282 аминокислот (Ala¹²³-Ala⁴⁰⁴). Фермент имеет два кальций-связывающих домена, каталитическую триаду формируют аминокислоты Asp¹⁶³, His¹⁹⁴ и Ser³⁵⁰;

4. Активная рекомбинантная форма исследуемого фермента, идентичная по своим свойствам нативной из культуральной жидкости продуцента, может быть получена в результате бактериальной экспрессии.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется достаточным объемом проведенных исследований, использованием в работе современных экспериментальных и биоинформатических методов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах, депонированием генетической последовательности в международную базу данных NCBI GenBank. Результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: 2-й и 3-й Российский микробиологический конгресс (Саранск, 2019; Псков, 2021), European Biotechnology Congress (Валенсия, 2019; София, 2021), ESCI 55th Annual Scientific Meeting (Нидерланды, 2021).

На основании предложенных в работе технологических схем на базе опытного биотехнологического производства Комплексной опытной установки (ОБП КОУ) Института биоорганической химии РАН произведено несколько экспериментальных партий лиофилизированного препарата рекомбинантной формы исследуемого фермента общей массой 25 гр., которые были использованы для проведения доклинических и клинических испытаний.

Личный вклад автора заключается в самостоятельном выполнении теоретических и экспериментальных исследований, представленных в работе, анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке полученных результатов, подготовке публикаций и научных докладов.

Объем работы. Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Работа изложена на 131 странице, содержит 29 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 200 источников, в том числе 180 иностранных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, среди них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, и 8 тезисов. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за ценные советы, неоценимую помощь и всестороннюю поддержку при выполнении работы своим научным руководителям – кандидату

биологических наук Александру Андреевичу Осмоловскому и доктору химических наук Константину Анатольевичу Мирошникову.

Автор благодарит сотрудников лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии РАН Михаила Марковича Шнейдера, Нину Николаевну Сыкилинду и Петра Владимировича Евсеева, профессора кафедры микробиологии биологического факультета МГУ Ирину Борисовну Котову и научных сотрудников Валериану Георгиевну Крейер и Марию Романовну Леонтьеву, руководителя ЦКП «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН Марселя Расимовича Кабилова, руководителя опытного биотехнологического производства Института биоорганической химии РАН Василия Николаевича Степаненко и руководителя цеха выделения и очистки Дмитрия Александровича Макарова за методическую помощь, критические замечания и поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрены современные представления о протеолитических ферментах, особое внимание уделяется секретируемым протеазам микромицетов, их классификации, строению, биотехнологическому значению, а также основным методам промышленного получения этой группы ферментов. Дана общая характеристика гемостаза, показана роль антикоагулянтной системы протеина С, приведены основные способы измерения его активности, описаны свойства и возможное практическое применение секретируемой протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Продуцент и его культивирование. Для проведения исследования была использована культура микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Поддержание культуры осуществляли на скошенном сусло-агаре при хранении в комнатных условиях. Для получения посевного материала микромицет выращивали в пробирках на скошенном сусло-агаре 3°Б в течение 7-ми суток при 28°С.

Глубинное культивирование проводили в две последовательные стадии по ранее отработанной схеме (Осмоловский и др., 2013). На предварительной стадии смыв спор микромицета вносили в посевную среду (состав в %: сусло – 6,7; глюкоза – 1; пептон – 0,1; рН 5,5-6,0) и выращивали в течение 2-х суток, после чего часть биомассы переносили в ферментационную среду (состав в %: глюкоза

– 3,5; гидролизат рыбной муки – 1,0; NaCl – 0,2; крахмал – 0,125; пептон – 0,1; KH_2PO_4 – 0,05; MgSO_4 – 0,05; pH 5,5-6,0) для основной стадии культивирования, во время которой происходит наработка протеазы-активатора протеина С. Культивирование проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды, при температуре 28°C, на орбитальной качалке при 200 об./мин в течение 2-х суток.

Иммобилизация продуцента. В качестве иммобилизирующих агентов использовали акриламид, альгинат натрия и каррагинан. С поверхности культуры микромицета делали смыв спор стерильной водой, содержащей 0,0001% Твин-80, после чего смешивали с растворами иммобилизирующих агентов. Полимеризацию акриламида проводили добавлением персульфата аммония и ТЕМЕДа, после чего разрезали полученный гель простерилизованным скальпелем на кубики с размером ребра около 3-5 мм и промывали стерильной водой. Смеси спор с растворами альгината и каррагинана по каплям добавляли к охлажденным 0,3 М CaCl_2 и 2%-ному KCl соответственно, инкубировали в течение 8 ч при 4°C для формирования гранул, после чего промывали стерильной водой. Полученные гранулы иммобилизованного продуцента вносили в питательную среду для дальнейшего культивирования.

Световую микроскопию проводили, непосредственно изучая поверхность гранул с помощью микроскопа Микромед-1 («ЛОМО», Россия), оснащенного камерой TOUPCAM UCМOS05100KPA. Для сканирующей электронной микроскопии гранулы фиксировали 2,5%-ым раствором глутарового альдегида в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,3) в течение 12-ти часов и обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации (30-96%). После окончательной дегидратации гранулы выдерживали 12 часов в 100%-ом ацетоне, высушивали на установке НСР-2 («Hitachi», Япония), напыляли смесью металлов Au-Pd (Eiko IB-3 Ion Coater, «Hitachi», Япония) и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Очистка фермента. После окончания культивирования биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через фильтровальную бумагу («ФС», Россия). Протеазу-активатор протеина С осаждали из полученного фильтрата сульфатом аммония, подбирая оптимальную для осаждения белка степень насыщения. Для этого к аликвотам культуральной жидкости медленно добавляли кристаллический сульфат аммония, получая различные степени насыщения: 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75 и 0,8 (за насыщенный раствор принимали 4,1 М раствор, содержащий 767 г соли на 1 л), инкубировали в течение 12 ч при 4°C, после чего осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 15000 g. В

супернатантах измеряли остаточную активность целевого белка для определения оптимальной для осаждения степени насыщения сульфатом аммония.

Полученный при осаждении из культуральной жидкости белок, содержащий активатор протеина С, растворяли в 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, содержащим сульфат аммония 0,35 степени насыщения, центрифугировали для удаления нерастворившихся белков, после чего супернатант наносили на колонку с фенил-сефарозой CL-4В («GE Healthcare», США), уравновешенной тем же буфером. Элюцию проводили нисходящим градиентом концентрации сульфата аммония в 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, от степени насыщения 0,35 до 0. Полученные активные фракции, содержащие активатор протеина С, объединяли и наносили на колонку с ДЭАЭ-сефарозой («GE Healthcare», Швеция), предварительно уравновешенной 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Элюцию проводили линейным градиентом концентрации NaCl от 0 до 1,0 М в стартовом буфере. Обогащенные целевым белком фракции объединяли и концентрировали на мембранном фильтре Millipore MWC0 10 кДа («Merck», Германия), после чего наносили для дальнейшей очистки на колонку с Сефадексом G-50 («Pharmacia», Швеция), уравновешенную 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Элюцию проводили тем же буфером. Активные очищенные фракции объединяли для дальнейшего анализа.

Секвенирование и анализ последовательности. Выделение геномной ДНК из мицелия проводили по стандартной методике (Rodrigues et al., 2007). Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора реактивов ExtractRNA («Евроген», Россия). Синтез первой цепи кДНК проводили при помощи модифицированной MMLV-ревертазы Mint («Евроген», Россия). Амплификацию концевых фрагментов кДНК протеазы-активатора протеина С плазмы крови проводили методом Step-Out RACE (Siebert et al., 1995; Matz et al., 1999) с селективной супрессией ПЦР (Лукьянов и др., 1999) на матрице тотальной кДНК с использованием ДНК-полимеразы Encyclo («Евроген», Россия), набором праймеров Mint RACE («Евроген», Россия) и вырожденными ген-специфическими праймерами к консервативным участкам субтилизиновых протеаз микромицетов рода *Aspergillus* (Morya et al., 2012; 2016). Амплифицированные концевые фрагменты очищали на спин-колонках Cleanup S-Cap («Евроген», Россия), клонировали в pAL2-T вектор («Евроген», Россия) и секвенировали по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе в компании «Евроген», Россия. На основе результатов секвенирования проводили дизайн встречных концевых ген-специфических праймеров, амплификацию и секвенирование полноразмерной последовательности кДНК и гена исследуемого фермента. Трансляцию нуклеотидной последовательности в аминокислотную проводили при помощи сервера EMBOSS Translation Tools, также анализировали

полученные результаты на сервере NCBI BLAST. Аминокислотные последовательности гомологичных протеаз для анализа загружали из базы данных UniProtKB, множественные выравнивания проводили с использованием серверов EBI Clustal Omega и EBI EMBOSS Needle. Расчет сайтов трипсинолиза и масс получаемых фрагментов при масс-спектрометрии проводили с использованием сервера ExPasy PeptideMass.

Получение рекомбинантной формы фермента. Для получения плазмиды для экспрессии целевого белка, несущего С-концевой 6xHis-tag, клонировали фрагмент кДНК исследуемого фермента, кодирующий пропептидный и протеазный домены, в вектор pET23d («Novagen», США) по рестриктным сайтам *NcoI* и *XhoI*. Свежетрансформированные экспрессионной плазмидой клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3) выращивали на среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при температуре 37°C до достижения оптической плотности OD₆₀₀ ≈ 0,6, после чего проводили индукцию белкового синтеза добавлением IPTG до конечной концентрации 0,25-1 мМ. Синтез белка проводили в двух вариантах: в течение 18 часов при 16°C и 4 часов при 37°C, затем биомассу осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 g, ресуспендировали в 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂ и гомогенизировали ультразвуком при охлаждении на льду, после чего центрифугировали гомогенат в течение 20 мин при 15000 g и анализировали полученные фракции. Для аффинной очистки фракции наносили на Ni-NTA-сефарозу («GE Healthcare», США), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили ступенчатым градиентом имидазола с концентрациями 20, 60 и 200 мМ.

Аналитические методы. Ферментативную активность исследуемого определяли по реакциям специфического расщепления бесцветных хромогенных пептидных субстратов, имеющих в качестве хромофора *n*-нитроанилидную группу (-pNA), гидролиз которых сопровождается накоплением окрашенного в желтый цвет свободного *n*-нитроанилина, за единицу ферментативной активности (Ед.) принимали количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом по оптическому поглощению при 280 нм на приборе BioSpectrometer («Eppendorf», Германия). Электрофоретический анализ белковых фракций проводили по методу Лэммли (Laemmly, 1970).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Имобилизация продуцента. В результате имобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D в 4,0%-м полиакриламиде, 3,5%-м альгинате кальция и 3,0%-м каррагинане были получены однородные гранулы с размером около 3-5 мм, механически устойчивые, не склонные к агрегации или

распаду в процессе культивирования и подготовительных к нему манипуляций. Рост мицелия во время культивирования иммобилизованного микромицета происходил внутри и на поверхности гранул носителя, без образования пеллет, характерных для свободнорастущего гриба. При иммобилизации микромицета в использованных полимерных материалах наблюдали инкорпорацию структур гриба в полимерный носитель, сопровождающийся ростом мицелия как внутри, так и на поверхности гранул носителя, без образования флоккул в питательной среде, характерных для роста неиммобилизованной культуры.

Наибольшую активность протеазы-активатора протеина С, превысившую соответствующее значение в экспериментах с неиммобилизованным микромицетом, наблюдали при культивировании иммобилизованного в альгинате кальция продуцента. При этом наилучшие результаты были достигнуты при культивировании в ферментационной среде без предварительного выращивания в посевной среде. Активность целевого фермента при культивировании иммобилизованного микромицета в каррагинане была также высока, однако ниже, чем при иммобилизации в альгинате кальция. Полиакриламид, в опытах с которым активность протеазы-активатора протеина С оказалась существенно ниже по сравнению с неиммобилизованным продуцентом, показал худшие результаты среди всех остальных носителей.

На рисунке 1А приведена динамика образования протеазы-активатора протеина С при глубинном культивировании иммобилизованного в альгинате кальция и свободнорастущего микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D в течение 14 суток. Видно, что активность целевого фермента достигла своего максимального значения на 3-4-е сутки культивирования свободнорастущего продуцента, после чего снизилась примерно вдвое на 6-7-е сутки и вчетверо – на 10-е сутки. В то же время, при культивировании иммобилизованного микромицета выход на максимальный уровень значений активности целевого фермента также происходил к 4-м суткам культивирования, однако он практически не изменялся в течение последующих 10-ти суток, что свидетельствует о стабильности синтеза целевого продукта иммобилизованным продуцентом по сравнению со свободнорастущим.

Для исследования потенциала иммобилизованного в альгинате кальция микромицета к многократному использованию в биотехнологических процессах провели пять циклов полунепрерывного культивирования с заменой питательной среды на свежую перед каждым циклом. Активности целевого фермента в культуральной жидкости, полученные в процессе полунепрерывного культивирования, показаны на рисунке 1Б. Наибольшую активность наблюдали в первых трех циклах, после чего произошло снижение примерно на треть от

первоначальных значений. Полученные результаты указывают на возможность многократного культивирования иммобилизованного в альгинате кальция продуцента для получения протеазы-активатора протеина С плазмы крови.

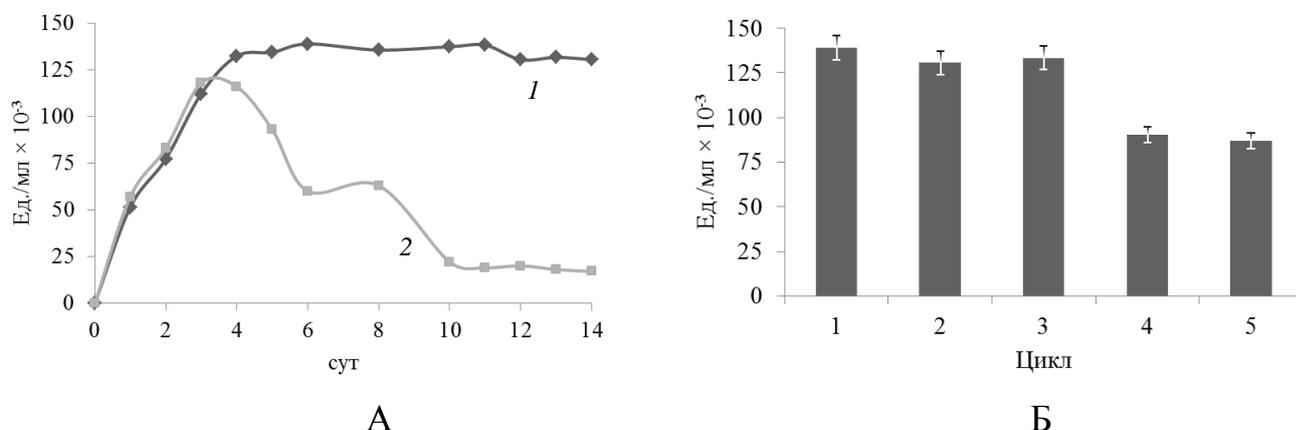


Рис. 1. Результаты исследования влияния иммобилизации микромицета *A.ochraceus* ВКМ-F4104D на образование протеазы-активатора протеина С плазмы крови:

А – динамика образования целевого фермента при глубинном культивировании иммобилизованного в альгинате кальция (1) и свободнорастущего (2) продуцента;

Б – образование целевого фермента в нескольких циклах полунепрерывного культивирования иммобилизованного в альгинате кальция продуцента.

3.2. Очистка протеазы-активатора протеина С плазмы крови из культуральной жидкости. Культуральная жидкость микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, полученная по окончании срока культивирования продуцента, после удаления биомассы представляла собой прозрачную жидкость коричневого цвета, содержащую остатки компонентов питательной среды и различные, в том числе окрашенные, метаболиты микромицета. На первой стадии очистки использовали высаливание сульфатом аммония, для определения оптимальной концентрации которого измеряли ферментативную активность в культуральной жидкости до и после высаливания с различными степенями насыщения. Значительное снижение остаточной активности до минимальных значений наблюдали в опытах со степенями насыщения сульфата аммония 0,7, 0,75 и 0,8. Анализ полученных фракций показал, что степень насыщения 0,7 является оптимальной для осаждения целевого фермента, поскольку использование более высоких концентраций сульфата аммония не приводит к существенному увеличению выхода целевого белка, но повышает количество соосаждающихся с ним примесей.

В качестве следующей стадии очистки выбрали гидрофобную хроматографию на фенил-сефарозе. Использованный хроматографический буфер,

содержавший сульфат аммония 0,35 степени насыщения, обеспечил растворение протеазы-активатора протеина С из осадка и его хорошую сорбцию на фенил-сефарозе, в то время как значительное количество примесей в этих условиях не связалось с носителем и элюировалось в первых фракциях. Элюция целевого белка произошла в конце снижающегося градиента сульфата аммония, что обеспечило его эффективную грубую очистку. Полученные активные фракции имели желтый оттенок, удельная активность целевого белка в нем возросла в 100 раз по сравнению с первоначальной (таблица).

Таблица. Очистка протеазы-активатора протеина С плазмы крови из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Суммарный белок, мг	Удельная активность, Ед./мг	Степень очистки, раз	Суммарная активность, Ед.	Выход по активности, %
Культуральная жидкость	740	5,7	4218	0,02	1	84	100
Гидрофобная хроматография	35	0,7	24,5	2	100	49	58
Ионообменная хроматография (после концентрирования)	1	5,6	5,6	5,5	275	31	37
Гель-фильтрация	7,5	0,4	3	7,5	375	23	27

При дальнейшей очистке с использованием ДЭАЭ-сефарозы произошло прочное связывание большого количества оставшихся примесей с хроматографическим носителем. На этом этапе наблюдали эффективное разделение целевого белка, элюировавшегося в первых фракциях, и примесей, элюция которых произошла только при значительном увеличении концентрации NaCl в хроматографическом буфере. Фракции целевого фермента после данного этапа очистки имели бледно-желтый цвет, удельная активность при этом возросла в 275 раз по отношению к первоначальной (таблица).

На заключительном этапе очистки использовали гель-фильтрацию на Сефадексе G-50, предварительно сконцентрировав наносимый препарат на

мембранном фильтре. Элюция протеазы-активатора протеина С произошла в первых фракциях, что обеспечило практически полное его отделение от оставшихся примесей. Полученные после данного этапа очистки фракции были бесцветны и содержали высокоочищенный целевой фермент, его удельная активность возросла в 375 раз по сравнению с первоначальной (таблица).

Суммарный выход активатора протеина С после всех стадий очистки составил 27%, что незначительно ниже по сравнению с ранее опубликованным способом очистки протеазы другого штамма – *A. ochraceus* 513, основанном на использовании бациллихин-силохрома, где он составил 35% (Батомункуева и Егоров, 2001). Однако возрастание итоговой степени очистки целевого белка в 375 раз, достигнутое при использовании нового способа, значительно превышает ранее полученные результаты, где степень очистки возросла в 36 раз. Это, а также труднодоступность бациллихин-силохрома в настоящее время, делают новый метод очистки более перспективным и легкодоступным для получения протеазы-активатора протеина С, образуемой *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.

3.3. Изучение последовательности протеазы-активатора протеина С плазмы крови. В результате работы установлено, что кодирующий участок ДНК исследуемого фермента состоит из 1215 пар оснований и отвечает за синтез его полипептидной цепи. Соответствующий этому участку ген содержит 1394 пар оснований и имеет три коротких некодирующих участка (интрона) длиной 58, 59 и 62 пар оснований соответственно. Данная последовательность была депонирована в международную биоинформатическую базу данных NCBI GenBank под записью с номером MW183406.

Результаты анализа последовательности протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, выполненного с использованием вычислительных ресурсов сервера NCBI BLAST, свидетельствуют о принадлежности исследуемого фермента к семейству протеиназы-К-подобных (proteinase-K-like) субтилизиновых протеаз. Это семейство секретируемых субтилизиновых протеаз микроорганизмов (главным образом, мицелиальных грибов), обладающих разнообразной субстратной специфичностью, структурно гомологичных протеиназе К из гриба *Tritirachium album* (UniProt P06873). Идентичность аминокислотных последовательностей протеазы-активатора протеина С, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, и протеиназы К из *T. album* составляет 41%, доля сходных аминокислот – 53%.

Были установлены наиболее близкие к протеазе микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D ферменты, которые ранее были подробно изучены в других лабораториях. Это протеазы микромицетов *A. fumigatus* ATCC MYA-4609 (UniProt P28296), *A. oryzae* ATCC 42149 (UniProt P12547) и *A. flavus* 28 (UniProt

P35211). Все эти протеазы принадлежат к семейству протеиназы-K-подобных субтилизиновых протеаз и имеют в своих последовательностях соответственно 80, 77 и 74% идентичных, или 89, 88 и 85% сходных аминокислот с последовательностью протеазы *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.

Поскольку доменное строение перечисленных гомологичных протеаз мицелиальных грибов подробно исследовано и основано на многочисленных экспериментальных данных, по результатам множественного выравнивания была предсказана доменная структура протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D. Согласно полученным данным, первая 21 аминокислота исследуемого фермента (Met¹-Ala²¹) составляет сигнальную последовательность, далее располагается 101-аминокислотный пропептидный домен (Pro²²-Asp¹²²), за которым следует протеазный домен, состоящий из 282 аминокислот (Ala¹²³-Ala⁴⁰⁴). Зрелая форма протеазы *A. ochraceus* ВКМ-F4104D содержит два кальций-связывающих домена, стабилизирующих ее молекулу, каталитическая триада сформирована аминокислотами Asp¹⁶³, His¹⁹⁴ и Ser³⁵⁰. Предсказанная доменная структура фермента представлена на рисунке 2.

Для проверки правильности предсказанной по результатам множественного выравнивания доменной структуры протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D при помощи сервера ExPasy PeptideMass провели расчет сайтов трипсинолиза и масс получаемых фрагментов при масс-спектрометрическом анализе предполагаемой зрелой формы фермента. Полученные в результате расчета массы фрагментов совпали с данными ранее выполнявшегося экспериментального масс-спектрометрического анализа зрелого фермента из культуральной жидкости (Осмоловский, 2013). В частности, полностью совпала расчетная масса начального фрагмента протеазного домена ALTTQTGATWGLGSISHK, что свидетельствует о правильности выполненного предсказания границ доменов протеазы микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.

3.4. Получение протеазы-активатора протеина С плазмы крови в бактериальной экспрессионной системе. Для проведения белковой экспрессии была получена молекулярно-генетическая конструкция на основе вектора pET23d, несущего кДНК протеазы-активатора протеина С микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, лишенной участка сигнальной последовательности. Встраивание кДНК в вектор было проведено по сайтам рестрикции *NcoI* и *XhoI*, чтобы С-концевая часть получаемой рекомбинантной формы фермента несла шесть остатков гистидина (6xHis-tag) для аффинной очистки. Элиминация сигнальной последовательности выполнена для предотвращения возможного подавления белковой экспрессии в бактериальной системе. Полученной экспрессионной плазмидой были трансформированы клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3).

10 20 30 40 50 60
MPSFKQTLLLLGAMLPVFGAPVENTRRASEKIAGKYIVTFKNGIDTAKIEQHTTWATNI
 70 80 90 100 110 120
 HKRNLARRDGSDDSDLPVGIKFKIKDFAAYFGSFDDSTIEEIRKSADVAHIEEDQVWH
 130 140 150 160 170 180
 LDALTTQTGATWGLGSIHKGESSTSYVYDSSAGEGTYGYVVDTGINVDHSEFGGRASLA
 1 10 20 30 40 50
 190 200 210 220 230 240
 YNAVGGQHVDSVGEHGTHTVAGTIGGKTYGVSKKANLLSVKVFQGESSTSIILDGYNWAAN
 60 70 80 90 100 110
 250 260 270 280 290 300
 DIVSKSRTGKAAINLSLGGGYSYAFNQAVENAFDEGVLTVAAGNENSDAGNTSPASAPN
 121 130 140 150 160 170
 310 320 330 340 350 360
 ALTVAASTNRNARASFSNYGSVVDVFPAGQDIKSAWIGGSSATNTISGTSMATPHIVGLA
 181 190 200 210 220 230
 370 380 390 400
 IYLALEGLTSPAAVTKRIKELATSGVVTDVKGSPNLLAYNGAA
 241 250 260 270 280

Рис. 2. Аминокислотная последовательность и предполагаемая доменная структура протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D. Участок полипептидной цепи, отщепляющийся в процессе созревания фермента, показан шрифтом серого цвета, сигнальная последовательность подчеркнута. На последовательности протеазного домена выделены аминокислоты каталитической триады. Нумерация сверху аминокислотной цепи выполнена от начала всей последовательности, снизу – от начала протеазного домена.

Для проведения первых экспериментов по изучению разных режимов экспрессии свежетрансформированные клетки выращивали в условиях глубинного культивирования в жидкой питательной среде LB до оптической плотности культуры $OD_{600} \approx 0,6$, после чего индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ. После этого выполняли инкубацию культуры при 37°C в течение 3 часов (режим стандартной экспрессии) и 16°C в течение 15 часов (режим холодной экспрессии). Результаты анализа белкового состава биомассы экспрессирующих клеток до и после индукции методом SDS-PAGE по Леммли представлены на рисунке 3.

По результатам анализа хорошо заметно отсутствие целевого фермента в биомассе экспрессионных клеток до добавления индуктора белкового синтеза IPTG (рис. 3А и 3Б, дорожка 2). После индукции белкового синтеза в режиме

стандартной экспрессии произошло обильное накопление продукта с молекулярной массой около 45 кДа, а в режиме холодной экспрессии – менее интенсивное образование продукта с молекулярной массой около 35 кДа (рис. 3А и 3Б, дорожка 3). Кроме этого, в режиме холодной экспрессии отчетливо заметно появление протеолитической деградации белков домашнего хозяйства клеток штамма-продуцента, проявляющейся в виде исчезновения белков высокомолекулярной массы с одновременным возникновением широкой зоны продуктов протеолиза в низкомолекулярной области («низкомолекулярный шмер»).

Полученные результаты свидетельствуют о накоплении целевого фермента в виде неактивного предшественника с пропептидным доменом массой около 45 кДа при стандартной экспрессии, в то время как в режиме холодной экспрессии происходит расщепление пропептидного домена с образованием зрелой формы фермента массой около 35 кДа. При этом синтез и накопление целевого фермента в режиме стандартной экспрессии происходит значительно интенсивнее.

Расщепление белков домашнего хозяйства клеток штамма-продуцента свидетельствует о появлении протеолитической активности синтезируемого фермента. Подобные различия в режимах экспрессии можно объяснить тем, что при стандартном режиме происходит быстрый и интенсивный синтез белка, который не успевает правильно свернуться, созреть и приобрести активность, в то время как при холодном режиме скорость белкового синтеза существенно ниже, что позволяет получать правильно свернутую созревшую активную форму фермента.

Фракционирование биомассы продуцирующих клеток после экспрессии показало, что при стандартном режиме целевой белок находится в нерастворимой форме в виде осадка тел включения и полностью отсутствует в растворимой фракции супернатанта (рис. 3А, дорожки 4 и 5). Для получения растворимой активной формы целевого фермента при стандартном режиме экспрессии необходима солубилизация нерастворимого осадка в хаотропирующих агентах с последующим рефолдингом и хроматографической очисткой (рис. 3А, дорожки 6 и 7). После этого наблюдается полное расщепление пропептидного домена и переход целевого фермента в зрелую форму (рис. 3А, дорожки 8 и 9).

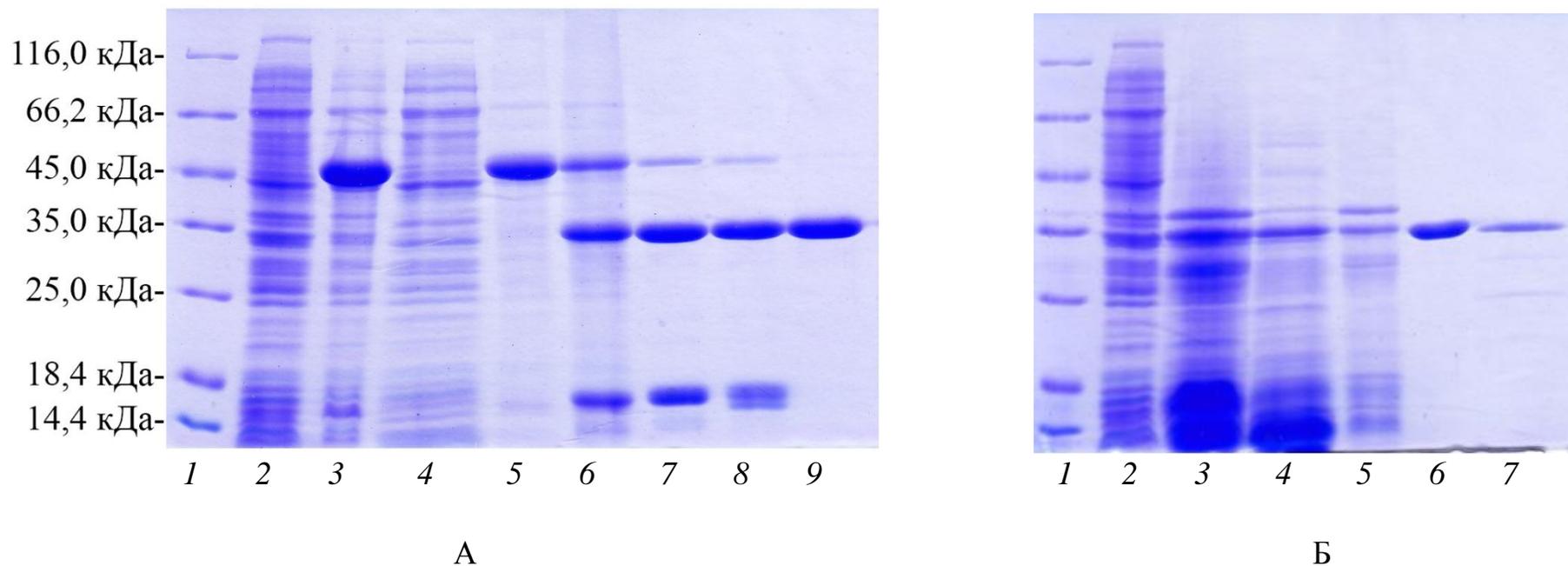


Рис. 3. Электрофоретический анализ белкового состава фракций, полученных в процессе экспрессии, фракционирования и очистки рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови:

А – режим стандартной экспрессии: 1 – маркеры молекулярных масс, 2 – бактериальная культура до индукции белкового синтеза, 3 – бактериальная культура после индукции, 4 – растворимая фракция биомассы, 5 – нерастворимая фракция биомассы, 6 – рекомбинантная протеаза-активатор протеина С после рефолдинга, 7 – после аффинной очистки и диализа, 8 – в процессе созревания, 9 – после созревания;

Б – режим холодной экспрессии: 1 – маркеры молекулярных масс, 2 – бактериальная культура до индукции белкового синтеза, 3 – бактериальная культура после индукции, 4 – растворимая фракция биомассы, 5 – нерастворимая фракция биомассы, 6 – рекомбинантная протеаза-активатор протеина С плазмы крови после аффинной очистки, 7 – протеаза-активатор протеина С плазмы крови, полученная из культуральной жидкости микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.

В то же время, при холодной экспрессии получаемый фермент находится преимущественно в растворимой фракции (рис. 3Б, дорожки 4 и 5). Для получения препарата высокоочищенного активного фермента в этом режиме экспрессии достаточно провести аффинную очистку растворимой фракции биомассы. Это существенно упрощает и ускоряет технологический процесс получения фермента и является преимуществом холодной экспрессии перед стандартным вариантом, требующим предварительного рефолдинга.

Поскольку рекомбинантная форма фермента имеет 6xHis-tag на С-конце полипептидной цепи, она прочно связывается с металлохелатными аффинными сорбентами, что позволяет выполнять эффективную одностадийную очистку. При выполнении нативной аффинной очистки растворимой фракции биомассы после холодной экспрессии на Ni-NTA-агарозе элюцию высокоочищенного целевого фермента наблюдали при концентрации имидазола в хроматографическом буфере 200 мМ (рис. 3Б, дорожка 6). Предварительное промывание хроматографической колонки более низкими концентрациями имидазола в 20 и 60 мМ позволило эффективно отделить примесные белки, неспецифично связавшиеся с сорбентом. Выход очищенного активного фермента при холодной экспрессии составил около 50 мг с 1 литра бактериальной культуры.

Полученная рекомбинантная форма протеазы-активатора С плазмы крови обладала идентичной электрофоретической подвижностью по сравнению с нативным ферментом, очищенным из культуральной жидкости продуцента (рис. 3Б, дорожки 6 и 7). Ферментативные свойства рекомбинантной и нативной форм фермента оказались также одинаковы: обе формы расщепляли хромогенные пептидные субстраты протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA) и фактора X (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA) в сопряженных реакциях, плазмина (H-d-Val-Leu-Lys-pNA) и тромбина (Tos-Gly-Arg-pNA) в прямых, и не расщепляли другие исследованные субстраты. Данные результаты свидетельствуют о том, что получение исследуемого фермента в рекомбинантной форме не привело к изменению его ферментативных свойств.

Таким образом, получение рекомбинантной формы протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, может применяться при производстве препаративных количеств исследуемого фермента. Ферментные препараты, получаемые таким способом, обладают идентичными свойствами по сравнению с нативными и могут быть использованы для проведения дальнейших доклинических и клинических исследований. Данный способ получения исследуемого фермента может быть применим на биотехнологических производствах, которые не предназначены для культивирования микромицетов, что диверсифицирует производственные

возможности и потенциально увеличивает доступность фермента для конечных потребителей.

Поскольку в процессе исследования экспрессии протеазы-активатора протеина С плазмы крови было установлено, что целевой фермент способен в больших количествах накапливаться в нерастворимой форме в виде тел включения, использование методов рефолдинга может повысить эффективность его получения. Отсутствие остатков цистеина и дисульфидных связей в молекуле фермента дает возможность избежать этапов восстановления и окисления в процессе рефолдинга, что снижает сложность выполнения этого процесса. В связи с этим исследование особенностей рефолдинга протеазы-активатора протеина С плазмы крови имеет большую научно-прикладную значимость.

При разработке методов рефолдинга целевого фермента учитывали описанные в литературе данные по особенностям рефолдинга субтилизиновых протеаз (Sone et al., 2005; Ni et al., 2016). Поскольку образование нерастворимых тел включения является результатом неправильного сворачивания молекулы, неактивная форма фермента до рефолдинга состоит из пропептидного и ферментативного доменов и на SDS-электрофореze визуализируется как одна полоса с массой около 45 кДа. В процессе рефолдинга восстанавливается правильная конформация молекулы фермента, в результате чего происходит автокаталитическое расщепление полипептидной цепи на границе пропептидного и протеазного доменов. На SDS-электрофореze этот процесс выглядит как расщепление исходной полосы массой около 45 кДа на две полосы: зрелого ферментативного домена массой около 35 кДа и пропептидного домена массой около 18 кДа. По интенсивности расщепления исходной полосы незрелого предшественника фермента в процессе рефолдинга оценивали эффективность проведения этого процесса.

На первоначальном этапе провели скрининговую оценку эффективности различных соединений как аддитивов для рефолдинга протеазы-активатора протеина С плазмы крови. В качестве кандидатных рефолдирующих агентов для исследования использовали доступные для масштабного применения в промышленности вещества, такие как сульфат аммония, аргинин, глицерин, сахароза, твин и тритон X-100. Наиболее активное расщепление исходного предшественника произошло при использовании сульфата аммония, глицерина и сахарозы в качестве аддитивов для рефолдинга. В то же время, аргинин и детергенты оказали отрицательное влияние на выход правильно свернутого фермента в процессе рефолдинга.

На следующем этапе оптимизации рефолдинга оценивали его эффективность при различных концентрациях аддитивов, отобранных на первом

этапе, чтобы установить наиболее оптимальные условия его проведения. Для этого выполняли процесс в присутствии 5-50% глицерина и сахарозы, а также 0,25-1,5 М сульфата аммония при комнатной температуре. Наилучшие результаты были получены при проведении рефолдинга в присутствии глицерина и сахарозы в концентрациях более 30%, в остальных опытах выход правильно свернутого фермента был ниже. Таким образом, дальнейшие эксперименты по исследованию и оптимизации рефолдинга решили проводить в присутствии 1 М (34,2%-й) сахарозы в качестве аддитива.

Было исследовано влияние степени разведения исходного солюбилизата тел включения при рефолдинге на его эффективность. Установлено, что формирование правильно свернутого фермента происходит при разбавлении в 10 раз и более. При меньших разбавлениях фермент остается преимущественно в денатурированной форме, что свидетельствует о необходимости снижения концентрации мочевины ниже 0,8 М для проведения успешного рефолдинга. Исходя из полученных результатов, на дальнейших этапах оптимизации рефолдинга использовали разбавление в 10 раз.

Далее исследовали влияние температуры на эффективность протекания рефолдинга, для чего провели процесс при температурах +37°C и +4°C. При температуре +4°C наблюдали более интенсивное расщепление полипептидной цепи фермента между протеазным и пропептидным доменами, которое свидетельствует о повышении выхода правильно свернувшегося фермента во время проведения рефолдинга при сниженной температуре. В то же время, из результатов данного эксперимента установлено, что первоначальное расщепление полипептидной цепи между протеазным и пропептидным доменами происходит сразу после разбавления, и в ходе дальнейшей инкубации деградации пропептидного домена не наблюдается. Это свидетельствует о том, что созревание фермента после рефолдинга в буфере с сахарозой не происходит, из чего следует необходимость дополнительной стадии очистки исследуемой протеазы после проведения рефолдинга.

Для выполнения очистки целевого фермента после рефолдинга использовали аффинную хроматографию на Ni-NTA-агарозе, после которой провели диализ элюата против 50 mM Трис-HCl, pH 8,0, 10 mM CaCl₂ для удаления имидазола и NaCl, которые в высоких концентрациях могут оказывать влияние на созревание фермента. В процессе диализа очищенного фермента произошло выпадение в осадок фрагментов пропептидного домена, а также продолжилось созревание исследуемой протеазы. Полное созревание фермента наблюдали между вторым и четвертым часами инкубации при температуре +37°C после диализа.

Выход активного фермента при использовании оптимизированных в настоящей работе методов рефолдинга составил 250 мг с 1 литра бактериальной культуры. Это делает привлекательным использование рефолдинга для получения препаративных количеств исследуемой протеазы в биотехнологической промышленности.

3.5. Возможные технологические схемы производства протеазы-активатора протеина С плазмы крови. Любое биотехнологическое производство является комплексом помещений, содержащих специализированное оборудование, для работы которого необходима слаженная работа коллектива высококвалифицированных специалистов разных профилей. С этим связана необходимость привлечения большого объема инвестиционных средств для открытия, отладки и запуска биотехнологических производств, что является существенным лимитирующим фактором для развития биотехнологической промышленности. Это обуславливает экономическую целесообразность получения биофармацевтических субстанций для первичных этапов клинических исследований с использованием ресурсов уже имеющихся биотехнологических производств. Поскольку существующие производства имеют разный состав оборудования и специалистов, возможность наработки исследуемой субстанции на различных производствах за счет гибкости и адаптируемости методики ее получения снижает временные и финансовые затраты на внедрение такой субстанции в промышленное использование.

Результаты выполненных в ходе настоящей работы исследований позволяют предложить три возможные технологические схемы производства протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A.ochraceus* ВКМ-F4104D, которые представлены на рисунке 4. Данные схемы позволяют получать исследуемую протеазу как на производствах, специализированных на работе с продуцирующими штаммами мицелиальных грибов, так и с бактериальными системами экспрессии белков. Это существенно расширяет спектр возможностей для препаративного получения фермента.

Схема получения исследуемой протеазы на производствах, специализированных на культивировании мицелиальных грибов (рис. 4А), включает в себя иммобилизацию спор продуцента *A. ochraceus* ВКМ-F4104D в гранулы альгината кальция с последующим культивированием полученных гранул в ферментационной среде. Культуральную жидкость, получаемую после отделения биомассы продуцента, фракционируют сульфатом аммония для осаждения целевого фермента. После осаждения проводят трехстадийную хроматографическую очистку фермента с подобранными в настоящей работе условиями, получаемый ферментный препарат стабилизируют осаждением или



Рис. 4. Возможные технологические схемы производства протеазы-активатора протеина С плазмы крови: с использованием иммобилизованного микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D (А), получение рекомбинантного фермента в бактериальной системе экспрессии в растворимой форме (Б) и через тела включения (В).

(и) лиофилизацией. Преимуществами данного метода является возможность многократного использования иммобилизованного продуцента в производственном процессе.

Для получения рекомбинантной формы фермента культивируют экспрессирующую линию клеток *E. coli* BL 21, затем проводят индукцию и синтез фермента. Полученную биомассу гомогенизируют и фракционируют, после чего сразу приступают к очистке на Ni-NTA-агарозе в случае индукции синтеза растворимой формы (рис. 4Б) либо проводят дополнительные стадии солубилизации и рефолдинга перед очисткой, а также созревания после очистки – при индукции образования нерастворимых тел включения (рис. 4В). Как и в первой схеме, очищенный активный ферментный препарат стабилизируют осаждением и (или) лиофилизацией. Преимуществом схем производства рекомбинантной формы исследуемого фермента является больший выход с литра бактериальной культуры, недостатком – невозможность работы с *E. coli* на некоторых биотехнологических производствах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были разработаны и исследованы методы, позволяющие получать препаративные количества протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, что необходимо для проведения дальнейших испытаний фермента и последующего его внедрения в практику. Следует заметить, что выявленные закономерности позволят в будущем значительно ускорить исследование и получение других протеолитических ферментов, образуемых микромицетами.

В результате анализа полученных данных предложены три возможные технологические схемы получения протеазы-активатора протеина С плазмы крови, которые могут быть адаптированы к различным биотехнологическим производствам. На основании предложенных в работе технологических схем на базе опытного биотехнологического производства Комплексной опытной установки (ОБП КОУ) Института биоорганической химии РАН произведено несколько экспериментальных партий лиофилизированного препарата рекомбинантной формы исследуемого фермента общей массой 25 гр., которые были использованы для проведения доклинических и клинических испытаний. Таким образом, все поставленные в работе задачи были выполнены, а главная цель работы – успешно достигнута.

ВЫВОДЫ

1. Иммунизация микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D увеличивает интенсивность образования протеазы-активатора протеина С плазмы крови, повышает стабильность продуцента и делает возможным его многократное использование в процессе культивирования.
2. Разработан метод очистки протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D, с использованием комбинации фракционирования сульфатом аммония и гидрофобной, ионообменной и гель-проникающей хроматографии.
3. Установлена и проанализирована последовательность гена протеазы-активатора протеина С плазмы крови, образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.
4. В результате бактериальной экспрессии в штамме *E. coli* BL21 и последующей хроматографической очистки на Ni-NTA-агарозе была получена функционально активная форма протеазы-активатора протеина С плазмы крови, идентичная образуемой микромицетом *A. ochraceus* ВКМ-F4104D.
5. Исследованы особенности фолдинга и созревания рекомбинантной протеазы-активатора протеина С плазмы крови после экспрессии фермента в нерастворимой форме.
6. Предложены три возможные технологические схемы для получения исследуемой протеазы-активатора протеина С плазмы крови на различных биотехнологических производствах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI:

1. **Komarevtsev S.K.**, Evseev P.V., Shneider M.M., Popova E.A., Tupikin A.E., Stepanenko V.N., Kabilov M.R., Shabunin S.V., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A. Gene analysis, cloning, and heterologous expression of protease from a micromycete *Aspergillus ochraceus* capable of activating protein C of blood plasma // *Microorganisms*. 2021. 9, 1936, 1-13. IF: 4.128. DOI: 10.3390/microorganisms9091936.
2. **Комаревцев С.К.**, Тиморшина С.Н., Леонтьева М.Р., Шабунин С.В., Лобакова Е.С., Осмоловский А.А. Влияние иммобилизации микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D на полимерных носителях на образование фибринолитической протеазы-активатора протеина С плазмы крови // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021. 57, 4, 374-379. IF: 1.579. DOI: 10.31857/S0555109921030077 [Komarevtsev S.K., Timorshina S.N., Leontieva M.R., Shabunin S.V., Lobakova E.S., Osmolovskiy A.A. Effect of immobilization of the micromycete *Aspergillus ochraceus*

VKM-F4104D in polymeric carriers on the production of the fibrinolytic protease activator of blood plasma protein C // Applied Biochemistry and Microbiology. 2021. 57, 4, 475-480. IF: 1.022. DOI: 10.1134/S0003683821030078].

3. **Комаревцев С.К.**, Попова Е.А., Крейер В.Г., Мирошников К.А., Осмоловский А.А. Очистка протеазы-активатора протеина С плазмы крови человека, продуцируемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D // Прикладная биохимия и микробиология. 2020. 56, 1, 39-44. IF: 1.579. DOI:10.31857/S0555109920010092 [Komarevtsev S.K., Popova E.A., Kreyer V.G., Osmolovskiy A.A., Miroshnikov K.A. Purification of the protease activator of protein C of human blood plasma produced by the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. 56, 1, 32-36. IF: 0.886. DOI: 10.1134/S0003683820010093].

Тезисы докладов:

1. **Komarevtsev S.**, Evseev P., Osmolovskiy A., Shabunin S., Miroshnikov K. Gene and cDNA investigation of anticoagulant protease from micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D capable of activating protein C of blood plasma // The EuroBiotech Journal. 2021. 5, s2, 65.
2. Evseev P., **Komarevtsev S.**, Osmolovskiy A., Shabunin S., Miroshnikov K. Bioinformatic studies clarify the origin of fungal subtilisins and underline the role of horizontal transfer in the subtilisin evolution // The EuroBiotech Journal. 2021. 5, s2, 103.
3. **Комаревцев С.К.**, Осмоловский А.А., Шабунин С.В., Мирошников К.А. Получение и исследование рекомбинантной формы антикоагулянтной протеазы-активатора протеина С плазмы крови, продуцируемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. Псков, 2021. 202.
4. Байдамшина Д.Р., Рафия Наср А., **Комаревцев С.К.**, Осмоловский А.А., Каюмов А.Р. Новая сериновая протеиназа РАРС из *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D для разрушения биопленок, образованных клетками *Staphylococcus aureus* // 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сентября – 1 октября 2021 г.): материалы конгресса. Псков, 2021. 142-143.
5. Rafea Nasr A., Baidamshina D., Mahmoud R., Sulaiman R., **Komarevtsev S.**, Osmolovskiy A., Kayumov A. The new serine proteinase РАРС from *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D for targeting *Staphylococcus aureus* biofilms // European Journal of Clinical Investigation. 2021. 51, s1, 153-154.
6. **Комаревцев С.К.**, Кабилов М.Р., Шнейдер М.М., Попова Е.А., Мирошников К.К., Осмоловский А.А., Мирошников К.А. Клонирование фибринолитической протеазы-активатора протеина С плазмы крови, продуцируемой микромицетом *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D // 2-й Российский микробиологический конгресс (г. Саранск, 23-27 сентября 2019 г.): материалы конгресса. Саранск, 2019. 115.
7. **Komarevtsev S.**, Osmolovskiy A. Finding an appropriate carrier for immobilization of *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D to obtaining protease activating protein C of blood plasma // Journal of Biotechnology. 2019. 305, S, 60.
8. **Комаревцев С.К.**, Осмоловский А.А. Подбор условий иммобилизации микромицета *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D, продуцента активатора протеина С плазмы крови человека // Успехи медицинской микологии. 2018. 19, 135-137.