

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

БИОАРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 615.371;579.8
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-1-57-70>

Поступила в редакцию 25.02.2025
Received 25.02.2025

А. Б. Саченко, Е. А. Попичева, В. В. Щур, С. А. Усанов, А. В. Янцевич

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**КОНСТРУИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО СТИМУЛЯТОРА АНГИОГЕНЕЗА
НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОГО БЕЛКА ANGPT1_VEGF165**

Аннотация. Белки VEGF165 и ANGPT1 являются ключевыми регуляторами ангиогенеза, что лежит в основе терапевтических подходов к лечению хронической ишемии нижних конечностей. Конструирование гибридного белка на их основе потенциально способно значительно усилить терапевтический эффект. Для определения оптимального расположения функциональных доменов гибридного белка (VEGF165_ANGPT1 или ANGPT1_VEGF165), а также для установления оптимальной длины и аминокислотного состава пептидного линкера между двумя белками проведен анализ траекторий молекулярной динамики и пространственных структур 134 гибридных белков. Определены оптимальные линкеры для ANGPT1_VEGF165: GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS, PAPAPAP и для VEGF165_ANGPT1: GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS, которые способствуют повышению стабильности гибридных белков. По результатам исследования отобран вариант ANGPT1_VEGF165 с линкером GGGSGGGSGGGSGGGGS для анализа его функциональной активности.

Ключевые слова: гибридный белок, хроническая ишемия нижних конечностей, молекулярная динамика, ANGPT1, VEGF165

Для цитирования. Конструирование комплексного стимулятора ангиогенеза на основе гибридного белка ANGPT1_VEGF165 / А. Б. Саченко, Е. А. Попичева, В. В. Щур [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 1. – С. 57–70. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-1-57-70>

A. B. Sachanka, E. A. Popicheva, V. V. Shchur, S. A. Usanov, A. V. Yantsevich

Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

**CONSTRUCTION OF A COMPLEX STIMULATOR OF ANGIOGENESIS BASED
ON THE FUSION PROTEIN ANGPT1_VEGF165**

Abstract. The proteins VEGF165 and ANGPT1 are key regulators of angiogenesis, which underpins therapeutic approaches for chronic lower-extremity ischemia. Designing a fusion protein based on these molecules has the potential to significantly enhance the therapeutic effect. To determine the optimal arrangement of functional domains of the fusion protein (VEGF165_ANGPT1 or ANGPT1_VEGF165) and establish the ideal length and sequence of the peptide linker between the two proteins, we performed an analysis of molecular dynamics trajectories and spatial structures of 134 fusion proteins. The optimal linkers that contribute to the increased stability of the fusion proteins were identified as follows: for ANGPT1_VEGF165, the optimal linkers are GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGGS, and PAPAPAP; for VEGF165_ANGPT1, the optimal linkers are GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS, and GGGSGGGSGGGSGGGGS. Based on the results, we selected the variant of the ANGPT1_VEGF165 protein with the GGGSGGGSGGGSGGGGS linker to analyze its functional activity.

Keywords: ANGPT1, VEGF165, fusion protein, molecular dynamic, chronic lower limb ischemia

For citation. Sachanka A. B., Popicheva E. A., Shchur V. V., Usanov S. A., Yantsevich A. V. Construction of a complex stimulator of angiogenesis based on the fusion protein ANGPT1_VEGF165. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2026, vol. 62, no. 1, pp. 57–70 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-1-57-70>

Введение. Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) в настоящее время является одной из наиболее распространенных и серьезных патологий сердечно-сосудистой системы человека [1]. Ишемия конечностей чаще всего вызвана атеросклерозом и окклюзией периферических артерий. Снижение кровоснабжения нижних конечностей представляет собой основной па-

тогенетический механизм, часто сопровождающийся хроническими инфекциями и трофическими нарушениями тканей.

Лечение ХИНК является прерогативой эндоваскулярной и реконструктивной хирургии. Однако у определенной группы пациентов (от 20 до 40 %) существуют ограничения как в отношении хирургического подхода, так и терапевтического лечения, что приводит к неудовлетворительным последствиям не только в раннем, но и в отдаленном периоде наблюдения. В связи с этим существует явная необходимость в новых эффективных методах лечения пациентов, страдающих от ишемии конечностей по всему миру [2].

Перспективным методом лечения ишемии нижних конечностей является терапевтический ангиогенез, основанный на введении в ишемизированные ткани генетических конструкций, содержащих гены факторов роста, а также стволовые или прогениторные клетки. Препараты на основе кольцевой ДНК представляют собой привлекательную альтернативу препаратам на основе белков или пептидов, которые при введении в организм могут вызывать нежелательные побочные эффекты [3].

Зарегистрированный в Российской Федерации препарат «Неоваскулген» представляет собой рекомбинантную плазмидную ДНК, кодирующую ген активатора ангиогенеза VEGF165. При проникновении молекул этой плазмиды внутрь клеток млекопитающих происходит выработка белка VEGF165 *in situ*, что приводит к росту кровеносных сосудов в области введения [4]. Эндотелиальные клетки участвуют в процессах вазоконстрикции и вазодилатации, а также служат крайне важными элементами всех кровеносных сосудов: капилляров, вен и артерий. Таким образом, стимулируя эндотелиальные клетки, VEGF165 играет центральную роль в процессе ангиогенеза [5]. Рецепторы VEGF165 расположены на поверхности эндотелиальных клеток сосудов и представляют собой рецепторные тирозинкиназы, которые после связывания с VEGF165 образуют димеры и активируются трансфосфорилированием. Активация этих рецепторов ведет к включению многочисленных внутриклеточных пострецепторных сигнальных каскадов, запускающих ангиогенез. Препараты на основе плазмидной ДНК с генами VEGF165 продемонстрировали высокую эффективность при лечении хронической ишемии IIА и IIВ степени [6] как в комплексе с хирургическим лечением, так и с классической консервативной терапией [7].

Однако использование одного гена VEGF165 приводит только к образованию незрелой неоваскулярной сети, которая в конечном итоге регрессирует. Для полноценного процесса ангиогенеза важно участие двух белков VEGF165 и ANGPT1: VEGF165 необходим для формирования первичного сосудистого сплетения, а ANGPT1 – для стабилизации и созревания эндотелиальных клеток сосудистой стенки. ANGPT1 способствует ассоциации перицитов и эндотелия, уменьшает проницаемость сосудов и стабилизирует новообразованные кровеносные сосуды [8]. Увеличенная стабильность сосудов, жизнеспособность клеток и их пролиферация и миграция связаны с активацией ANGPT1 протеинкиназы В посредством сигнального пути PI3K. ANGPT1 является лигандом для эндотелий-специфического рецептора тирозинкиназы Tie-2, связывание с которым приводит к димеризации рецептора и активации посредством фосфорилирования остатков тирозина, что обуславливает свойства эндотелиальных клеток как в физиологических, так и в патологических условиях [9]. У больных ХИНК часто уровень белка ANGPT1 снижен, что сопровождается повышенной смертностью и вероятностью ампутации конечностей [10].

Комбинированное применение препаратов на основе генов VEGF165 и ANGPT1 позволяет с большей эффективностью формировать новые сосуды для устойчивой неоваскуляризации, чем введение их по отдельности [11]. Сконструированный бицистронный вектор, экспрессирующий оба белка ANGPT1 и VEGF165, также продемонстрировал высокие показатели неоваскуляризации и без проявления образования раковых опухолей во внутренних органах [12]. Исходя из всего вышесказанного, мы предполагаем, что создание генетической конструкции, кодирующей гибридный белок ANGPT1_VEGF165 или VEGF165_ANGPT1, может существенно увеличить терапевтический эффект, расширить спектр действия препарата и увеличить пролонгированность действия за счет увеличения периода полувыведения белков из плазмы крови.

В данной работе проведен анализ траекторий молекулярной динамики и пространственных структур гомологичных моделей гибридных белков ANGPT1_VEGF165 с различными линкерами. Получен ряд генетических конструкций и проведены исследования плазмидной ДНК.

Материалы и методики исследования. Реагенты. В работе использовались: набор для ПЦР BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и набор для очистки ПЦР-продукта BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, США); Q5 Hot Start High Fidelity ДНК-полимераза, компетентные клетки *E. coli* DH5 α , Gel Loading Dye, Purple (6X) с SDS, рестриктазы NheI HF, HindIII HF, щелочная фосфатаза (rSAP), стандарт молекулярных масс 1 kb Plus DNA Ladder (NEB, Великобритания); T4 ДНК лигаза, РНКазы А, дНТФ (Thermo Scientific, США), силикагель (Serva, Германия); гидроксид натрия, хлорид натрия (ЗАО «Пять океанов», Беларусь); этидиум бромид, агароза, ацетонитрил, метанол (Sigma, США); ампициллин (ОАО «Синтез», Россия); глицерин, этиловый спирт, гуанидин тиоцианат, додецилсульфат натрия (Acrosorganic, Германия); N-трис-(гидроксиэтил)-аминометан – Tris (Melford, США), LB и TB-среда (Conda, Испания), ЭДТА (PanReac AppliChem, Германия), изопропанол, соляная кислота, уксусная кислота (АО «База № 1 Химреактивов», Россия). Для очистки продуктов ПЦР из агарозного геля использовали набор NucleoSpin Gel kit (Macherey-Nage, США).

Моделирование и молекулярная динамика. Модели гибридных белков созданы методом гомологичного моделирования (комбинация онлайн-сервиса Robetta и программы Modeller 10.0) [13, 14]. В качестве шаблонов для ANGPT1 и VEGF165 использовали гомологичные модели белков, представленные в базе данных Protein Data Bank (PDB): 1DEQ, 1EI3, 1LWU, 1M1J, 1Z3U, 3GHD, 4EPU, 4JYO, 4JZC, 4ZFG, 1FZV, 1MJV, 1MKG, 1RV6, 1WQ8, 1WQ9, 3P9W, 3V2A, 3V6B, 4DEQ, 5FV1, 5O4E, 6T9D, 6ZFI. Оптимизированные аминокислотные последовательности ANGPT1 и VEGF165 синтезированы нами ранее, а использованные в работе линкеры выбраны, опираясь на данные литературных источников, где они применялись для создания гибридных белков и генотерапевтических препаратов [15, 16].

Полученные модели проверяли на правильное формирование доменов (ChimeraX v 1.6) [17] по карте распределения двугранных углов и показателю QMEANDisCo, описывающему согласованность парных расстояний между α -атомами на основе гомологичных структур (SWISS-Model Structure Assessment) [18].

Далее отобранные модели белков подготавливали для проведения молекулярной динамики (МД) в силовом поле Amber (набор параметров ff14) в программах pdb4amber и LEaP: удаление атомов водорода и молекул воды, добавление ионов Na⁺ и Cl⁻, размеры области моделирования – 5,0 Å от поверхности белка и «растворение» модели в воде (TIP3P).

Перед проведением МД в AMBER16 систему подвергали процедуре оптимизации: минимизация полной энергии, включающая в себя 20 000 шагов с использованием метода сопряженных градиентов без ограничений на движение атомов. Нагрев осуществляли в течение 1 нс до температуры 310,15 К (NVT-ансамбль). Моделирование свободной динамики проводили в течение 50 нс (NPT-ансамбль) при температуре в 310,15 К (термостат Ланжевена) и постоянном давлении в 1 атм (баростат Берендсена).

Расчеты осуществляли на вычислительном комплексе ИБОХ НАН Беларуси (2 × NVIDIA GeForce GTX TITAN; 256 GB RAM; 2 × Opteron 6378 2,4 GHz (32 ядра)). Полученные результаты МД анализировали с использованием функционала библиотек Python3: NumPy (численные расчеты), PyTraj (анализ траекторий МД), Matplotlib (графическое отображение).

Дизайн генных конструкций и плазмидной ДНК. Дизайн сборки гена осуществляли в программе SnapGene по методике OE-PCR (полимеразная цепная реакция продлением перекрытия). Для сборки генов проводили ПЦР с Q5 ДНК-полимеразой в реакционной смеси – 1-кратный реакционный буфер, 0,2 мМ дНТФ, 20 ед. акт./мл Q5 ДНК-полимеразы, 50 пг ДНК матрицы (векторы pcDNA3.1(-)-VEGF165 и pcDNA3.1(-)-Ang-1, гены белков ранее были синтезированы *de novo* из 65-звенных олигонуклеотидов, используя полимеразную цепную сборку [19]), 1,25 мкМ концевых праймеров, вода – до конечного объема в 20 мкл. Использовали следующую программу амплификации: начальная денатурация (98 °С, 30 с); 30 циклов (денатурация – 98 °С, 10 с; отжиг – 61 °С, 30 с; экстинкция – 72 °С, 20 с); последняя экстинкция (72 °С, 2 мин).

ПЦР-продукты амплификации очистили на центрифужных колонках с суспензией силикагеля. Далее перекрывающиеся фрагменты объединили методом OE-PCR, включающим в себя две реакции: объединение и амплификацию с праймерами, добавляющими сайты рестрикции.

Реакцию проводили в смеси, как описано выше, с 0,05 пмоль/мкл каждого фрагмента амплификации в качестве матрицы без праймеров. ПЦР-цикл для стадии объединения: инициирование денатурации (98 °С, 30 с); 15 циклов (денатурация – 98 °С, 5 с; отжиг – 64 °С, 10 с; элонгация – 72 °С, 10 с); последняя элонгация (72 °С, 2 мин).

Амплификацию продуктов объединения генов проводили в реакционной смеси: 1-кратный реакционный буфер, 0,2 мМ дНТФ, 20 ед. акт./мл Q5 ДНК-полимеразы, 2 мкл ПЦР-продукта после объединения генов, 1,25 мкМ каждого из 2 праймеров с сайтами рестрикции, вода – до конечного объема в 20 мкл. ПЦР-цикл для стадии: инициирование денатурации (98 °С, 30 с); 35 циклов (денатурация – 98 °С, 5 с; отжиг – 68–72 °С, 20 с; элонгация – 72 °С, 30 с); последняя элонгация (72 °С, 2 мин).

ДНК, кодирующую гибридный белок, очистили на спин-колонках с суспензией силикагеля и обработали рестриктазами NheI и HindIII. Вектор pcDNA3.1(-) обрабатывали аналогичным образом, но с последующим дефосфорилированием rSAP. После рестрикции провели очистку ДНК в 1%-м агарозном геле и лигировали в вектор pcDNA3.1(-) по соответствующим сайтам. Созданные ДНК плазмиды pcDNA3.1(-)_Ang_3G4G3G3G_VEGF, pcDNA3.1(-)_Ang_4G4G4G_VEGF; pcDNA3.1(-)_Ang_3G4G_VEGF, pcDNA3.1(-)_VEGF165_3G4G4G3G_Ang, pcDNA3.1(-)_VEGF-165_3PA_Ang, pcDNA3.1(-)_VEGF165_4G4G4G4G_Ang, pcDNA3.1(-)_VEGF165_4G5G_Ang проверяли рестрикционным картированием, используя ферменты NheI и HindIII (2 120–2 170 п. н.) и методом ПЦР (2 320–2 380 п. н.) с праймерами для секвенирования вектора pcDNA3.1(-), визуализировали методом электрофореза в 1%-м агарозном геле. Соответствие генной последовательности проверяли секвенированием по Сэнгеру.

Культивирование клеток. Созданные рекомбинантные плазмиды с генами гибридных белков трансформировали в компетентные клетки *E. coli* штамма NEB5alpha (DH5alpha). Выросшие на агаре с ампициллином колонии пересеивали в среду LB (5 мл), содержащую ампициллин (100 мкг/мл), и культивировали при 37 °С в течение 16 ч. Затем 25 мкл культуры переносили в планшет с 5 мл среды TB с ампициллином (100 мкг/мл) и культивировали при 37 °С в течение 16 ч. Собирали клетки центрифугированием при 3 500 g в течение 10 мин. Клетки ресуспендировали в буфер P1 (50 мМ Трис-НСl, 10 мМ ЭДТА, 80 мкг/мл РНКазы А, рН 8,0).

Выделение плазмидной ДНК. К суспензии клеток добавляли буфер P2 (200 мМ NaOH, 1%-й додецилсульфат натрия), через 5 мин при комнатной температуре вносили буфер N3 (16 мМ NaCl, 1,6 мМ Трис-НСl, 80%-й этанол, рН 7,5) и центрифугировали (19 000 g, 10 мин). К надосадочной жидкости добавляли 30 мкл суспензии силикагеля (0,25 г/мл), перемешивали 5 мин, центрифугировали и переносили силикагель в спин-колонку. Центрифугировали (10 000 g, 3 мин) и промывали силикагель в спин-колонке 3 раза промывочным буфером (16 мМ NaCl, 1,6 мМ Трис-НСl, 80%-й этанол, рН 7,5). Плазмидную ДНК элюировали 10 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Концентрацию плазмидной ДНК определяли на спектрофотометре DeNovix DS 11 FX + UV-Vis (США).

Содержание суперскрученной формы плазмидной ДНК проверяли в 1%-м агарозном геле при напряжении в 150 В, используя Model H4 (Gibco BRL, США). Результаты визуализировали с помощью гель-документирующей системы GelDoc Go (BioRad, США). Соотношение количества суперскрученной (11 тыс. п. о.) к релаксированной (5,5 тыс. п. о.) форме плазмидной ДНК определяли в программе Image Lab v6.1 (BioRad, США).

Результаты и их обсуждение. *Дизайн и молекулярная динамика.* При разработке нового препарата, основанного на гибридном белке, важную роль играет его дизайн: оптимальное положение присоединенных доменов, обеспечивающее стабильность и доступность интерфейса взаимодействия с соответствующими рецепторами. В отличие от однодоменных белков у рекомбинантных гибридных белков чаще наблюдается нарушение фолдинга доменов или их неправильная трехмерная структура из-за несовместимости доменов. Выбор линкера и положения для его присоединения влияет на экспрессию, стабильность и функциональную активность белков вплоть до полной ее потери. Оценка влияния линкеров на структуру и фолдинг гибридных белков посредством рационального проектирования специфических линкеров и проведения молекулярной динамики считается важнейшей, но недостаточно изученной стратегией в биофармацевтике при разработке новых лекарственных препаратов.

Известно об успешном создании и выделении гибридных белков VEGF165 с присоединением как по N-концу, что существенно повысило его растворимость, экспрессию и количество выделенного белка [20], так и по C-концу белка с сохранением его функциональной активности и повышением активности добавленного домена [21]. В то же время гибридные белки, основанные на ANGPT1, продемонстрировали более высокую эффективность при присоединении по обоим концам белка. Однако при присоединении на N-конец белка ANGPT1 гибридный белок обладал более высоким уровнем экспрессии и активности [22]. Изоэлектрическая точка обоих нативных белков находится в районе 5,8–5,9. Следовательно, у гибридного белка она тоже будет находиться в том же диапазоне. Можно предположить, что агрегационная способность гибридных белков не должна существенно измениться по сравнению с нативными белками.

Для поиска оптимального полипептидного линкера и порядка объединения доменов в работе создано 316 моделей методом гомологичного моделирования с гибкими, негибкими и расщепляемыми линкерами. Предварительный анализ моделей показал, что лучшее значение QMEANDisCo и расположение доменов при присоединении белка VEGF165 к N-концу белка ANGPT1 наблюдалось у гибких линкеров длиной не менее 10 аминокислот, что соответствует результатам, полученным ранее [21]. Это обусловлено нахождением N-конца белка ANGPT1 внутри белковой глобулы (рис. 1, *a*), что существенно усложняет фолдинг гибридного белка. C-конец белка ANGPT1 более доступен (рис. 1, *b*), что позволяет использовать линкеры длиной от 5 аминокислот.

На данном этапе были исключены линкеры длиной менее 4 аминокислот (кроме GGS и GGG), которые не позволяли осуществить правильный фолдинг доменов белка. Линкеры смешанного состава, состоящие из гибких и жестких участков полипептидной цепи (GGGGSEAAAK, PAPAPGGSGSGGS, GGSPAPAPGGSGGS и др.), почти не исследовались МД из-за существенного увеличения размеров белка, нарушений фолдинга белка и низких показателей QMEANDisCo ($< 0,70$), что могло привести к низкой экспрессии и активности белков. По аналогичному принципу не рассматривали варианты с негибкими линкерами длиной более 20 аминокислот, за исключением нескольких вариантов для проверки гипотезы. В остальных случаях на данном этапе анализа при одинаковой длине линкеров существенной разницы между различными типами линкеров не наблюдалось. В результате первичного анализа моделей выбраны 66 линкеров (табл. 1) для дальнейшей их проверки методом МД.

Для определения стабильности и конформационных колебаний белков проводили МД в течение 50 нс. Для выявления оптимального линкера рассчитывали: среднеквадратическое отклонение относительно начального положения (СКО), среднеквадратичную флуктуацию атомов (СКФ), радиус гирации (ГР), расстояние между доменами (РМД) и количество образованных и разрушенных водородных связей (ВС).

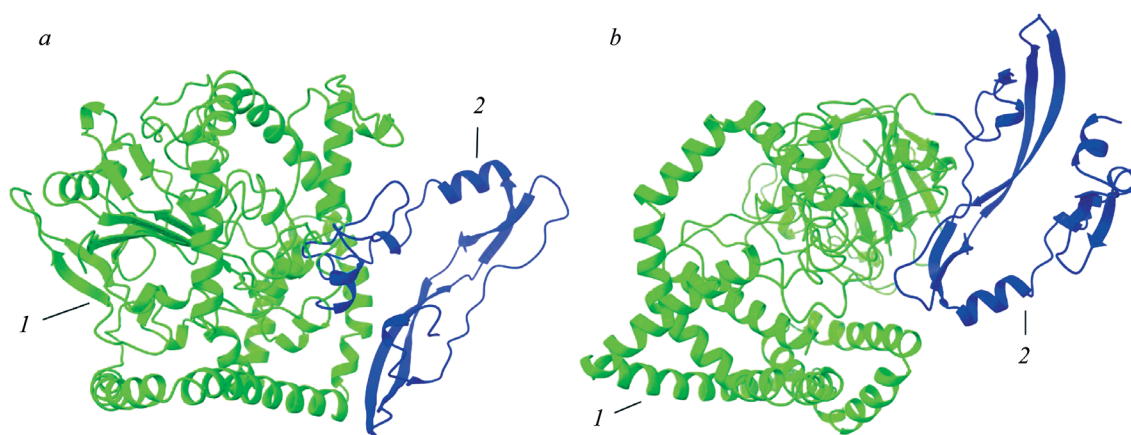


Рис. 1. Модели гибридных белков: *a* – с присоединением VEGF165 (1) по N-концу ANGPT1 (2) и *b* – с присоединением VEGF165 (1) по C-концу ANGPT1 (2)

Fig. 1. Models of fusion proteins: *a* – with VEGF165 (1) attached to the N-terminus of ANGPT1 (2) and *b* – with VEGF165 (1) attached to the C-terminus of ANGPT1 (2)

Таблица 1. Модели гибридных белков и результаты молекулярной динамики

Table 1. Fusion proteins models and results of molecular dynamic calculation

| Номер модели | Аминокислотная последовательность линкера | Среднее количество образованных и разрушенных водородных связей | | Среднеквадратическое отклонение относительно начального положения, Å | | Среднеквадратичная флуктуация атомов, Å | |
|--------------|---|---|----------------|--|----------------|---|----------------|
| | | ANGPT1_VEGF165 | VEGF165_ANGPT1 | ANGPT1_VEGF165 | VEGF165_ANGPT1 | ANGPT1_VEGF165 | VEGF165_ANGPT1 |
| 1 | Без линкера | 12 | 13 | 3,86 | 4,20 | 4,34 | 5,26 |
| 2 | (EAAAK) ₂ | 14 | 12 | 5,12 | 4,83 | 5,14 | 5,42 |
| 3 | (PA) ₂ | 16 | 17 | 4,02 | 5,81 | 5,16 | 5,02 |
| 4 | (EAAAK) ₃ | 16 | 16 | 5,13 | 4,69 | 6,27 | 4,53 |
| 5 | (GGGS) ₄ | 13 | 15 | 4,01 | 4,06 | 6,66 | 4,86 |
| 6 | GGSGGGGS(GGGS) ₂ | 13 | 15 | 3,51 | 4,32 | 4,10 | 4,78 |
| 7 | GGGS(GGGGS) ₂ GGGS | 14 | 14 | 5,21 | 3,77 | 6,73 | 5,11 |
| 8 | (PA) ₃ | 13 | 15 | 4,37 | 3,10 | 4,38 | 5,05 |
| 9 | GGGSGGGSGGGGS | 15 | 14 | 4,69 | 4,10 | 5,21 | 4,50 |
| 10 | (GGGGS) ₃ | 13 | 14 | 3,79 | 4,26 | 3,53 | 5,06 |
| 11 | (GGGGS) ₄ | 17 | 15 | 5,31 | 4,07 | 5,42 | 3,88 |
| 12 | (PA) ₄ | 16 | 15 | 3,34 | 3,88 | 5,80 | 6,96 |
| 13 | (PA) ₅ | 15 | 15 | 5,84 | 3,27 | 4,84 | 4,40 |
| 14 | (PA) ₆ | 14 | 14 | 4,50 | 3,25 | 4,28 | 4,90 |
| 15 | (EAAAK) ₈ | 16 | 15 | 4,98 | 4,55 | 5,35 | 4,88 |
| 16 | (PA) ₇ | 17 | 16 | 5,02 | 3,53 | 4,30 | 4,33 |
| 17 | AGNRVRRSVG | 16 | 13 | 5,50 | 3,90 | 5,92 | 4,31 |
| 18 | EAAAK | 14 | 19 | 4,22 | 6,10 | 5,27 | 6,23 |
| 19 | EDVVCCSMSY | 15 | 12 | 5,71 | 4,42 | 5,44 | 4,73 |
| 20 | GGIEGRGS | 14 | 14 | 3,83 | 6,06 | 4,63 | 4,94 |
| 21 | GSSGVD | 14 | 14 | 4,42 | 5,37 | 4,32 | 4,82 |
| 22 | GTGSGT | 15 | 15 | 3,97 | 6,45 | 4,54 | 5,00 |
| 23 | PLGLWA | 13 | 14 | 3,53 | 5,91 | 4,36 | 4,67 |
| 24 | RVLAEA | 13 | 17 | 5,16 | 5,36 | 5,84 | 5,99 |
| 25 | TRHRQPRGWE | 13 | 16 | 4,97 | 4,48 | 5,93 | 5,21 |
| 26 | VSQTSKLTRAETVFPDV | 15 | 16 | 5,57 | 5,32 | 5,80 | 4,28 |
| 27 | GGSGGGSGGS | 13 | 15 | 4,08 | 5,78 | 5,24 | 4,92 |
| 28 | GGSGGGSGGGGS | 15 | 14 | 4,11 | 4,22 | 5,78 | 6,48 |
| 29 | GGSGGGSGGGGS | 16 | 13 | 5,27 | 4,26 | 4,91 | 5,21 |
| 30 | GGS | 15 | 15 | 4,28 | 5,96 | 6,01 | 5,52 |
| 31 | GGG | 14 | 14 | 3,92 | 5,46 | 5,81 | 5,13 |
| 32 | GGGSGGGSGGS | 14 | 14 | 4,24 | 4,28 | 4,23 | 5,25 |
| 33 | (GGGS) ₃ | 15 | 17 | 4,15 | 4,30 | 4,33 | 4,29 |
| 34 | GGGS | 16 | 15 | 3,93 | 6,07 | 4,21 | 4,86 |
| 35 | GGGG | 15 | 15 | 4,68 | 5,33 | 5,41 | 4,93 |
| 36 | GGGGS | 13 | 13 | 3,97 | 4,69 | 5,22 | 4,71 |
| 37 | GGGGG | 13 | 15 | 4,93 | 5,99 | 4,25 | 6,11 |
| 38 | GGGGGS | 15 | 14 | 4,48 | 5,69 | 4,98 | 5,30 |
| 39 | GGGGGG | 16 | 15 | 4,57 | 5,21 | 3,81 | 5,31 |
| 40 | GGGGGGGS | 13 | 14 | 4,38 | 5,95 | 5,41 | 5,21 |
| 41 | GGGGGGG | 15 | 13 | 3,85 | 6,29 | 6,17 | 5,64 |
| 42 | GGGGGGGG | 15 | 20 | 5,70 | 4,33 | 4,09 | 6,35 |
| 43 | GGSGGS | 16 | 16 | 5,99 | 5,88 | 4,28 | 5,45 |
| 44 | GGSGGGGS | 14 | 15 | 5,64 | 5,98 | 5,77 | 5,26 |
| 45 | GGSGGGGS | 14 | 17 | 5,04 | 6,43 | 5,26 | 5,85 |
| 46 | GGGSGGS | 15 | 16 | 3,78 | 6,15 | 6,26 | 5,95 |

Окончание табл. 1

| Номер модели | Аминокислотная последовательность линкера | Среднее количество образованных и разрушенных водородных связей | | Среднеквадратическое отклонение относительно начального положения, Å | | Среднеквадратичная флуктуация атомов, Å | |
|--------------|---|---|----------------|--|----------------|---|----------------|
| | | ANGPT1_VEGF165 | VEGF165_ANGPT1 | ANGPT1_VEGF165 | VEGF165_ANGPT1 | ANGPT1_VEGF165 | VEGF165_ANGPT1 |
| 47 | GGGSGGGS | 13 | 13 | 4,20 | 5,06 | 5,50 | 5,52 |
| 48 | GGGSGGGGS | 15 | 15 | 3,56 | 5,47 | 3,97 | 4,70 |
| 49 | GGGSGGGGGS | 16 | 17 | 5,18 | 5,73 | 4,87 | 4,80 |
| 50 | GGGSGGGGS | 15 | 15 | 4,34 | 4,56 | 4,46 | 6,40 |
| 51 | GGGSGGGGGS | 17 | 14 | 3,98 | 3,43 | 4,62 | 7,09 |
| 52 | GGGSGGGGGS | 17 | 14 | 4,95 | 3,75 | 5,55 | 5,21 |
| 53 | GGGGSGGGGGS | 15 | 13 | 3,79 | 3,80 | 4,17 | 4,71 |
| 54 | GGGGSGGGGGS | 15 | 14 | 3,84 | 4,94 | 5,31 | 4,00 |
| 55 | (GGGGGS) ₃ | 16 | 14 | 4,50 | 4,81 | 4,17 | 5,99 |
| 56 | GGGGSGGGGG | 15 | 15 | 4,84 | 4,54 | 5,76 | 4,75 |
| 57 | (GGGGGS) ₂ | 16 | 17 | 5,21 | 3,87 | 5,63 | 4,77 |
| 58 | (GGGGGS) ₂ | 18 | 17 | 4,88 | 3,67 | 6,67 | 4,49 |
| 59 | (GGGS) ₅ | 19 | 19 | 4,43 | 6,35 | 7,35 | 4,21 |
| 60 | GGGGS(GGGGS) ₄ | 19 | 19 | 4,70 | 3,79 | 6,12 | 5,56 |
| 61 | (GGGS) ₅ | 20 | 21 | 5,18 | 3,44 | 6,78 | 4,96 |
| 62 | (GGGS) ₆ | 21 | 19 | 3,87 | 4,46 | 6,15 | 5,05 |
| 63 | (GGGGGS) ₄ GGGGS | 21 | 20 | 5,14 | 3,45 | 6,31 | 5,64 |
| 64 | (GGGGGS) ₆ | 22 | 23 | 4,21 | 6,20 | 6,23 | 6,40 |
| 65 | (GGGS) ₇ | 21 | 18 | 4,91 | 4,58 | 6,16 | 6,31 |
| 66 | (GGGS) ₆ | 20 | 19 | 4,46 | 3,90 | 6,67 | 5,99 |
| 67 | (GGGS) ₈ | 18 | 22 | 5,11 | 3,56 | 6,02 | 5,64 |

Результаты МД (рис. 2) подтвердили предположение о влиянии длины линкеров (GGGGSEAAAK и GGSPAPAPGGSGGS) на структуру белка и его стабильность. Линкеры длиной менее 5 аминокислот приводили не только к нарушению пространственной структуры белков, но и к низкой стабильности структуры белка (колебание СКФ > 2 Å, СКО не выходило на плато) при присоединении домена по обоим концам белка ANGPT1. Модели с линкером длиной более 20 аминокислот проявляли низкую стабильность (существенное колебание СКО и невыход на плато) и высокую подвижность как полипептидной цепи (СКФ > 5 Å), так и между доменами белков, что обуславливало резкое изменение количества ВС. У линкеров смешанного состава наблюдалось высокое значение ГР (около 5 Å), а также его флуктуации, что указывает на низкую стабильность белковой структуры.

Анализ моделей с присоединением по С-концу белка ANGPT1. Гибкие линкеры длиной от 5 до 10 аминокислотных остатков (GGGGGS, GGSAGGS, GGGGGGGG, GGSAGGSAGGS и др.) в большинстве случаев существенно снижали время, необходимое для выхода на плато СКО, а также его колебание и СКФ, но при этом в ряде случаев (GGSAGGS, GGGGGGGG и GGSAGGSAGGS) они приводили к потере пространственной структуры белка (рис. 3, а). Линкеры GGGGGGS, GGGGGGGG, GGSAGGSAGGS повышали подвижность полипептидной цепи, что способствовало резким изменениям ГР белка и негативно сказывалось на общей стабильности белка. Частое чередование аминокислот в линкере (например, GGSAGGSAGGS) способствует увеличению ГР и СКФ. Несмотря на одно из самых низких значений СКО (3,8 Å) у линкеров GGGSGGGGS и GGGSGGGGS, они не достигли плато. Это связано с повышенной подвижностью между доменами, что приводит к значительной амплитуде ГР. Среди всех линкеров длиной от 5 до 10 аминокислот самые высокие показатели стабильности (СКО $2,56 \pm 0,83$ нс и ГР $4,03 \pm 0,14$ Å) наблюдались у линкера GGSAGGSAGGS.

Увеличение длины гибких линкеров до 15 аминокислот сопровождалось быстрым выходом на плато СКО в диапазоне 2–4 нс, при этом минимальные размеры белка сохранялись (ГР 4–4,2 Å) и амплитуда СКФ оставалась умеренной в большинстве случаев (4,3–4,5 Å). Для ряда линкеров (GGGGSGGSAGGS и GGGSGGGGGGS) характерна высокая неравномерная подвижность

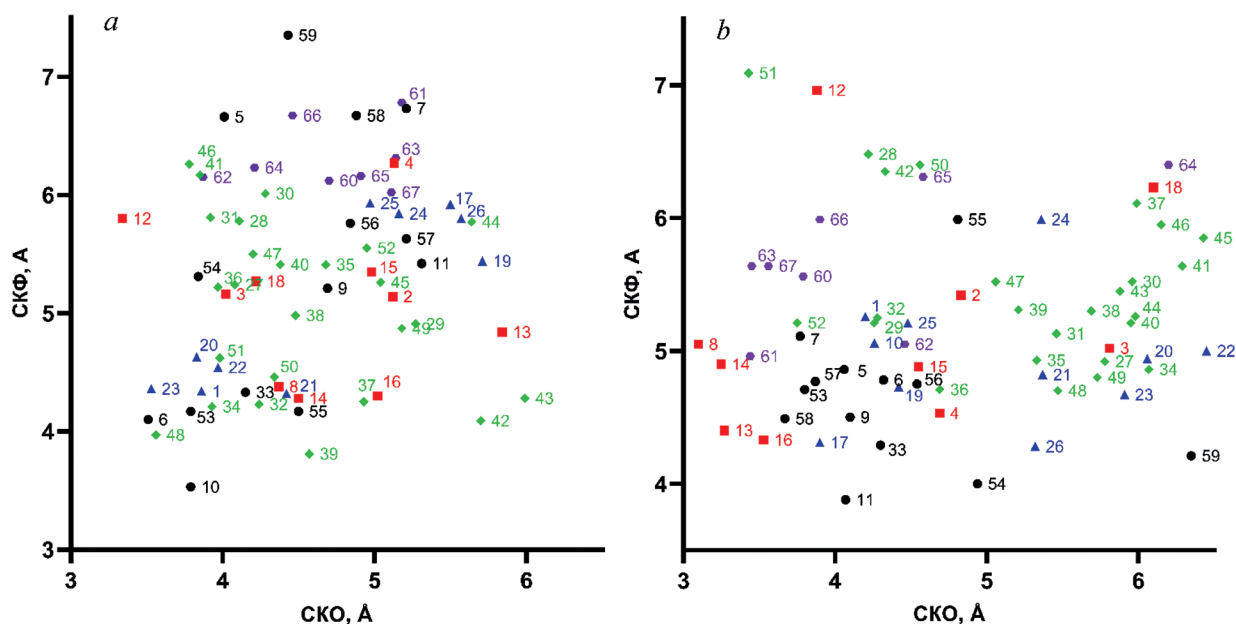


Рис. 2. Результаты расчета средневквдратического отклонения относительно начального положения и средневквдратичной флуктуации атомов для ANGPT1_VEGF165 (а) и VEGF165_ANGPT1 (б) с линкерами: гибкими длиной 10–20 аминокислот (точка), жесткими (квадрат), расщепляемыми (треугольник), гибкими длиной до 10 аминокислот (ромб) и гибкими длиной более 20 аминокислот (шестиугольник) (номера точек соответствуют номерам моделей табл. 1)

Fig. 2. Results of calculating the root-mean-square deviation relative to the initial position and root-mean-square fluctuation of atoms for ANGPT1_VEGF165 (a) and VEGF165_ANGPT1 (b) with linkers: flexible 10–20 amino acids long (dot), rigid (square), cleavable (triangle), flexible up to 10 amino acids long (rhombus) and flexible more than 20 amino acids long (hexagon) (point numbers correspond to model numbers in table 1)

пептидной цепи ДНК ($СКФ > 5 \text{ \AA}$) при относительно небольшом ГР ($4,2\text{--}4,3 \text{ \AA}$) и выходе на плато СКО в районе $3,5\text{--}4$ нс. При этом для последующего создания гибридного белка использовали линкер GGGSGGGSGGGGS (рис. 3, b), который позволяет получить наиболее компактный белок (ГР 4 \AA) с низким колебанием СКО ($3,79 \pm 0,79 \text{ \AA}$) и СКФ ($3,5 \text{ \AA}$).

Гибкие линкеры длиной до 20 аминокислот позволяли максимально быстро выйти на плато СКО ($1,5\text{--}3$ нс) при сохранении компактности структуры белка (ГР $4,1\text{--}4,3 \text{ \AA}$) и низком колебании СКФ ($4,4\text{--}4,6 \text{ \AA}$). Однако линкеры GGGGGSGGGGGGS, GGGGGSGGGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS и GGGSGGGSGGGSGGGGS, наоборот, существенно дестабилизировали белок, увеличивая СКФ до $6\text{--}7 \text{ \AA}$, что сопровождалось увеличением ГР до 5 \AA .

Линкеры с негибкой структурой (PAPAPAP, EAAAKEAAAK) длиной от 5 до 10 аминокислот обеспечивали большее РМД по сравнению с гибкими линкерами, а также наименьшее время для выхода на плато СКО ($0,5\text{--}2$ нс) среди всех линкеров. Однако они отличались высоким значением ГР ($4,5 \text{ \AA}$ и более) и резким ростом СКО после $20\text{--}30$ нс расчетов, что делает их неподходящими для создания гибридного белка. Дальнейшее увеличение длины негибкого линкера ($10\text{--}35$ аминокислот) сопровождалось резким снижением стабильности (невыход на плато и резкое изменение СКО) белка, при этом флуктуация СКФ и ГР оставались низкими, а РМД была максимальной по сравнению с другими типами линкеров при одинаковой длине. При этом линкеры состава PAP, PAPAP демонстрировали более высокую стабильность (ниже значения СКО и СКФ) по сравнению с линкерами состава EAAAK, EAAAKEAAAK при сходной длине и РМД.

Стабильность моделей белка с расщепляемыми линкерами оказалась ниже, чем у гибких и негибких линкеров и существенно зависела от их аминокислотного состава. Ни один из исследованных линкеров не позволял СКО выйти на плато, а для линкеров AGNRVRRSVG, RVLAEA, TRHRQPRGWE, VSQTSKLTRAETVFPDV и EDVVCCSMSY значения СКО и СКФ превышали 5 \AA . В то же время для линкеров PLGLWA, GTGSGT и GGIEGRGS значения СКО и СКФ не превышали 4 \AA , а их колебания были незначительными, что почти позволило выйти на плато СКО к концу расчетов.

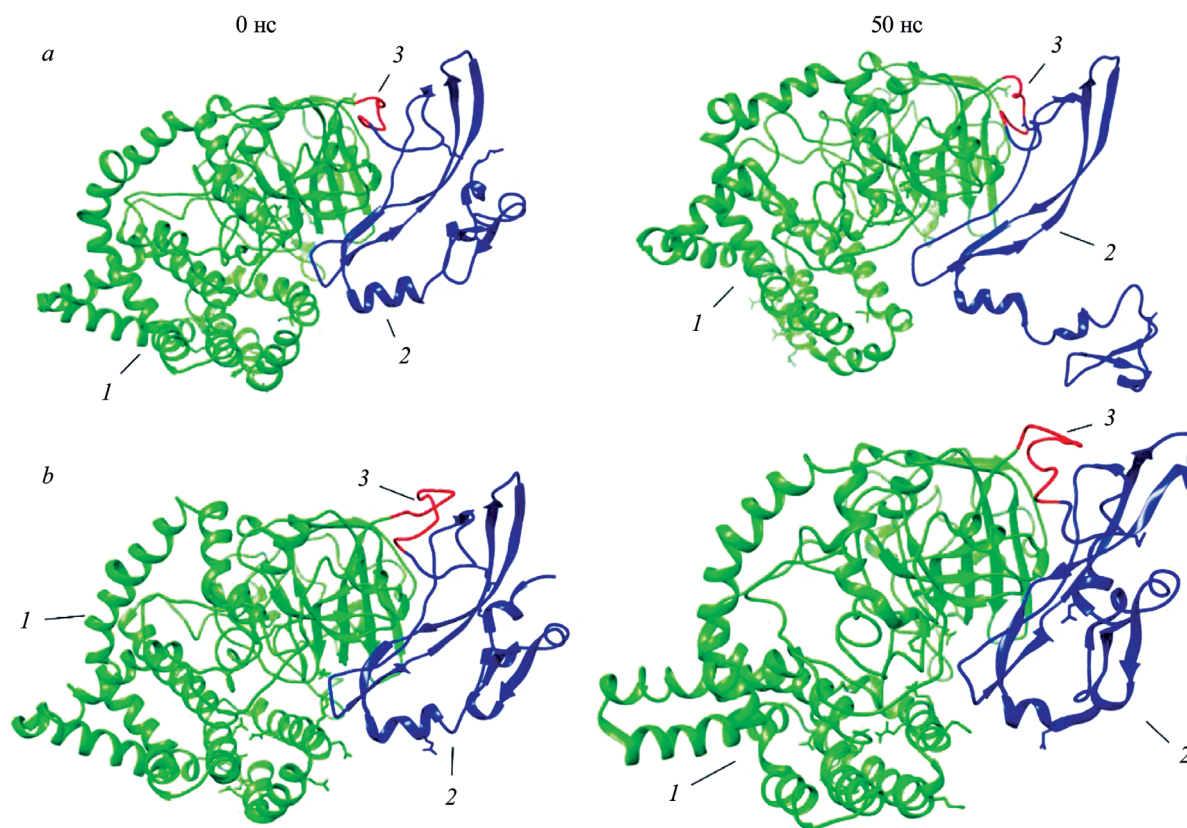


Рис. 3. Модели гибридных белков с присоединением VEGF165 (1) по C-концу ANGPT1 (2) и линкерами (3) GGGSGGGGS (a) и GGGSGGGSGGGGS (b)

Fig. 3. Models of fusion proteins with VEGF165 (1) attached to the C-terminus of ANGPT1 (2) and linkers (3) GGGSGGGGS (a) and GGGSGGGSGGGGS (b)

Анализ моделей с присоединением по N-концу белка ANGPT1. Исходя из пространственной затрудненности N-конца белка ANGPT1, гибкие и расщепляемые линкеры длиной менее 10 аминокислот приводят к низкой стабильности гибридного белка (СКО и СКФ более 5 Å) и потере третичной структуры. В то же время линкеры с негибкой структурой позволяют доменам белков располагаться на большем расстоянии, что, в свою очередь, способствует увеличению стабильности гибридного белка при использовании линкеров длиной от 7 аминокислотных остатков.

Гибкие линкеры длиной от 10–15 остатков с частым чередованием аминокислот (GGSGGSGGS, GGSGGSGGS, GGGSGGSGGS) приводят к потере третичной структуры белка (рис. 4, a), что, скорее всего, связано с близким расположением доменов. В свою очередь, линкеры с меньшей подвижностью GGGSGGGGS, GGGGSGGGGS, GGGGGSGGGGS, GGGGGSGGGGS уже позволяли выйти на плато СКО после 5–10 нс, а ГР находился в пределах 4,4–4,7 Å, что делает их перспективными кандидатами для создания гибридного белка. Дальнейшее увеличение длины линкера до 20 аминокислот способствовало повышению стабильности белка (выход на плато СКО 2–3 нс) благодаря снижению флуктуации цепи (СКФ менее 4,5 Å). Причем линкер GGGSGGGSGGGSGGGGS обладал одним из самых низких значений СКО (3,77 Å) и ГР (4 Å), что делает его оптимальным линкером для слияния по N-концу (рис. 4, b).

Нахождение между белками негибкого линкера длиной 10–20 аминокислот существенно снижало значение СКО (3,3–3,5), но при этом сохранялась высокая флуктуация некоторых участков цепи и повышенный ГР (более 4,8 Å) белка, что особенно проявлялось у линкера RARARARARAR. Данный негативный эффект, скорее всего, связан с низкой взаимной подвижностью между доменами, из-за чего они занимают невыгодные конформационные состояния. Увеличение длины расщепляемых линкеров незначительно повысило стабильность гибридного белка, а в случае с VSQTSKLTRAETVFPDV, наоборот, привело к увеличению СКО до 5,32 Å.

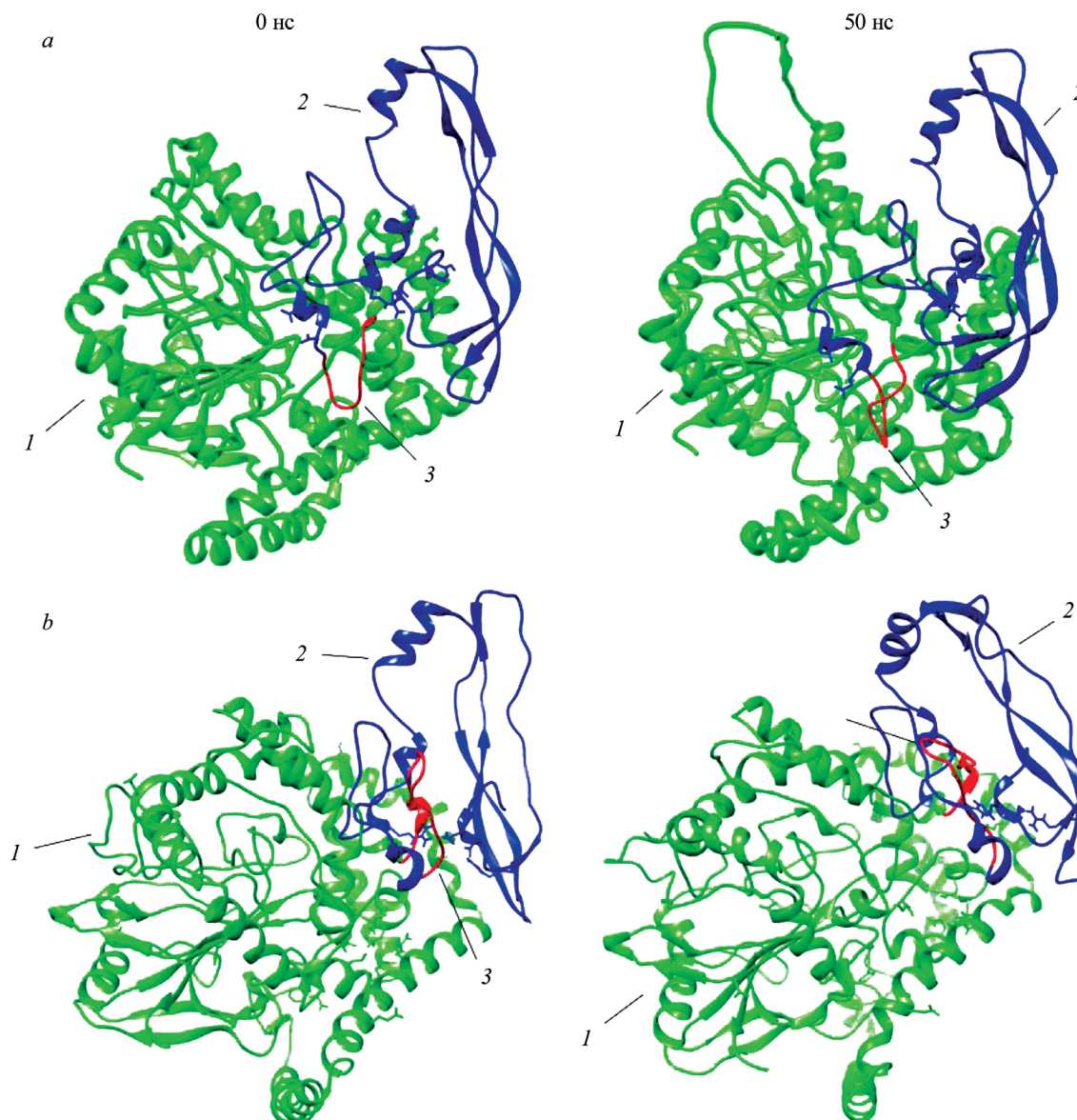


Рис. 4. Модели гибридных белков с присоединением VEGF165 (1) по N-концу ANGPT1 (2) и линкерами (3) GGS SGG SGG S (a) и GGG SGG SGG SGG SGG S (b)

Fig. 4. Models of fusion proteins with VEGF165 (1) attached to the N-terminus of ANGPT1 (2) and linkers (3) GGS SGG SGG S (a) and GGG SGG SGG SGG SGG S (b)

Слияние по N-концу белка ANGPT1 (VEGF165_ANGPT1) менее предпочтительно для создания гибридного белка, что связано с низкой доступностью аминоконцевой последовательности, которая находится в глубине белковой глобулы.

В результате анализа траекторий МД и пространственных структур полученных моделей определены оптимальные, обеспечивающие высокую стабильность гибридного белка, гибкие линкеры GGG SGG SGG SGG SGG S (3G4G3G3G), GGG SGG SGG SGG SGG S (4G4G4G), GGS SGG SGG S (3G4G) для ANGPT1_ VEGF165 гибридного белка и PAPAPAP (3PA, негибкий линкер), GGG SGG SGG SGG S (4G5G), GGG SGG SGG SGG SGG SGG S (3G4G4G3G), GGG SGG SGG SGG SGG SGG SGG S (4G4G4G4G) для VEGF165_ANGPT1 гибридного белка.

Количественный анализ генетических конструкций. Гены гибридных белков с различными линкерами были получены методом OE-PCR, при этом каждый этап контролировался с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле. Полученные гены лигировали в вектор pcDNA3.1(-) с CMV-промотором-энхансером, который благодаря своей высокой эффективности позволяет

экспрессировать целевой белок в больших количествах в клетках млекопитающих. Вектор pсDNA3.1(-) успешно использовался нами ранее для наработки и трансфекции в клетки млекопитающих плазмид с нативными белками VEGF165 и ANGPT1 [23], встроенными по тем же сайтам рестрикции (NheI и HindIII), что и гибридные белки. Все полученные плазмидные конструкции одновременно трансформировали при одинаковых условиях в одинаковые компетентные клетки DH5α.

Для валидации полученных вариантов и условий культивирования клеток проводили тестовое выделение плазмидных ДНК в малых объемах. Колонии из агаризованной среды переносили в среду LB, культивировали в воспроизводимых условиях и инокулировали в трех повторах в среду ТВ. Культивирование в среде ТВ и выделение ДНК проводили в одинаковых условиях.

Как и ожидалось, все варианты плазмидной ДНК были успешно выделены с высоким выходом. Небольшие различия в размерах вставки и последовательности не оказали значительного влияния (в пределах погрешности) на общее количество выделенной ДНК, однако отразились на содержании сверхспирализованной формы ДНК, что может свидетельствовать об изменении топологии плазмидной ДНК (табл. 2) [24]. Исходя из полученных данных можно предположить, что более высокое содержание сверхспирализованной формы для белка ANGPT1_VEGF165 может быть связано с изменением средства плазмидной ДНК к топоизомеразам. Различие в линкерах в 12 аминокислот не оказывает влияния на количество выделенной ДНК и содержание сверхспирализованной формы.

Содержание сверхспирализованной формы плазмидной ДНК в генотерапевтическом препарате имеет огромное значение, так как она обладает более высокой стабильностью и обуславливает сроки хранения препарата [25]. На основе анализа пространственных структур и траекторий МД для дальнейшего крупномасштабного синтеза опытного генотерапевтического препарата выбран вариант ANGPT1_VEGF165 с гибким линкером GGGSGGGSGGGGS.

Таблица 2. Выход плазмидной ДНК

Table 2. Plasmid DNA yield

| Белок | ANGPT1_VEGF165 | | | VEGF165_ANGPT1 | | | |
|---|----------------|------------|------------|----------------|------------|--------------|------------|
| | 3G4G 3G3G | 4G4G4G | 3G4G | 3G4G 4G3G | 3PA | 4G4G 4G4G | 4G5G |
| Выход плазмидной ДНК с литра среды ТВ, мг | 18,3 ± 1,5 | 20,4 ± 0,7 | 17,8 ± 1,2 | 18,2 ± 0,6 | 18,7 ± 0,4 | 17,4 ± 1,3 | 18,0 ± 0,8 |
| Содержание сверхспирализованной формы, % | 89,5 ± 0,2 | 90,8 ± 1,6 | 88,4 ± 0,3 | 82,8 ± 2,4 | 84,0 ± 1,4 | 84,3 ± 0,6 | 82,7 ± 1,3 |

Заключение. Низкая расчетная стабильность гибридного белка VEGF165_ANGPT1, связанная с положением аминоконцевой последовательности ANGPT1 внутри белка, может быть компенсирована использованием гибкого линкера длиной более 10 аминокислот. Линкеры длиной менее 5 и более 20 аминокислот приводят не только к низкой расчетной стабильности структуры белка, но и к нарушению его пространственной организации, что делает их неподходящими для создания гибридных белков. Гибкие линкеры длиной 10–20 аминокислот способствуют снижению СКФ и флуктуации СКО, а оптимальными среди них являются линкеры GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGGS для ANGPT1_VEGF165 и GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGSGGGGS для VEGF165_ANGPT1. Негибкие и расщепляемые линкеры в меньшей степени стабилизируют домены белков и в ряде случаев могут приводить к потере третичной структуры белка.

Небольшие различия в размерах вставки и последовательности не оказывают значительного влияния на выход ДНК, однако это отражается на содержании сверхспирализованной формы ДНК и может свидетельствовать об измененной топологии плазмидной ДНК.

Таким образом, основываясь на полученных результатах, для дальнейшего *in vivo* исследования и синтеза опытного образца стимулятора ангиогенеза выбран вариант ANGPT1_VEGF165 с линкером GGGSGGGSGGGSGGGGS.

Благодарности. Работа выполнена в рамках отдельного проекта НАН Беларуси НИР «Разработка новых модуляторов ангиогенеза на основе кольцевых ДНК с целью создания перспективных генотерапевтических средств для лечения ишемии конечностей» (2022–2024 гг.).

Acknowledgements. The study was financially supported by the National Academy of Sciences of Belarus, as part of a separate project “Development of new angiogenesis modulators based on circular DNA in order to create promising gene therapy agents for the treatment of limb ischemia” (2022–2024).

Список использованных источников

- ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction) / T. J. Ryan, J. L. Anderson, E. M. Antman [et al.] // *Circulation*. – 1996. – Vol. 94, № 9. – P. 2341–2350. <https://doi.org/10.1161/01.cir.94.9.2341>
- Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response / D. C. Tang, M. DeVit, S. A. J. N. Johnston // *Nature*. – 1992. – Vol. 356, № 6365. – P. 152–154. <https://doi.org/10.1038/356152a0>
- DNA vaccines approach: from concepts to applications / V. B. Pereira, M. Zurita-Turk, T. D. L. Saraiva [et al.] // *World Journal of Vaccines*. – 2014. – Vol. 4, № 2. – P. 50–71. <https://doi.org/10.4236/wjv.2014.42008>
- Local intramuscular administration of ANG1 and VEGF genes using plasmid vectors mobilizes CD34+ cells to peripheral tissues and promotes angiogenesis in an animal model / J. P. Skóra, M. Antkiewicz, D. Kupczyńska [et al.] // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 143. – P. 112–186. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112186>
- Червяков, Ю. В. Эффективность генной терапии и стандартного консервативного лечения хронической ишемии нижних конечностей атеросклеротического генеза / Ю. В. Червяков, О. Н. Власенко // *Вестник хирургии имени И. И. Грекова*. – 2018. – Т. 177, № 2. – С. 64–71. <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2018-177-2-64-69>
- Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial / R. J. Lederman, F. O. Mendelsohn, R. D. Anderson [et al.] // *The Lancet*. – 2002. – Vol. 359, № 9323. – P. 2053–2058. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)08937-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)08937-7)
- Морфогенетические механизмы клеточных взаимодействий в процессе ангиогенеза / М. В. Мнихович, Д. Гершон, М. Брикман [и др.] // *Журнал анатомии и гистопатологии*. – 2012. – Т. 1, № 3. – С. 53–65.
- Yoder, M. C. Human Endothelial Progenitor Cells / M. C. Yoder // *Journal Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2012. – Vol. 9, № 2. – P. 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006692>
- Nanocomposite scaffolds for accelerating chronic wound healing by enhancing angiogenesis / H. Nosrati, R. A. Khouy, A. Nosrati [et al.] // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00755-7>
- Plasma angiopoietin-1 is lower after ischemic stroke and associated with major disability but not stroke incidence / J. Golledge, P. Clancy, J. Maguire [et al.] // *Stroke*. – 2014. – Vol. 45, № 4. – P. 1064–1068. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.004339>
- Combination of VEGF(165)/Angiopoietin-1 gene and endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization / F. Chen, Z. Tan, Ch. Yu. Dong [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2007. – Vol. 568, № 1. – P. 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.047>
- A combination of VEGF 165 / HGF genes is more effective in blood vessels formation than ANGPT 1 / VEGF 165 genes in an in vivo rat model / P. Barc, T. Plonek, D. Baczynska [et al.] // *Journal of Clinical and Experimental Medicine*. – 2016. – Vol. 9, № 7. – P. 12737–12744.
- Kim, D. E. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server / D. E. Kim, D. Chivian, D. Baker // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – P. 526–531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>
- Šali, A. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints / A. Šali, T. L. Blundell // *Journal of Molecular Biology*. – 1993. – Vol. 234, № 3. – P. 779–815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>
- Shamriz, S. Effect of linker length and residues on the structure and stability of a fusion protein with vaccine application / S. Shamriz, H. Ofoghi, N. Moazami // *Computers in Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 76, № 1. – P. 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2016.06.015>
- Peptide linker increased the stability of pneumococcal fusion protein vaccine candidate / L. Zane, St. Kraschowetz, M. M. Trentini [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1–18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1108300>
- UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers / E. F. Pettersen, Th. D. Goddard, C. C. Huang [et al.] // *Protein Science*. – 2021. – Vol. 30, № 1. – P. 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation / G. Studer, C. Rempfer, A. M. Waterhouse [et al.] // *Bioinformatics*. – 2020. – Vol. 36, № 8. – P. 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
- Yantsevich, A. V. Oligonucleotide Preparation Approach for Assembly of DNA Synthons / A. V. Yantsevich, V. V. Shchur, S. A. Usanov // *SLAS Tech*. – 2019. – Vol. 24, № 6. – P. 556–568. <https://doi.org/10.1177/2472630319850534>
- Effective production of human growth factors in *Escherichia coli* by fusing with small protein 6HFh8 / Y. S. Kim, H.-J. Lee, M.-H. Han [et al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2021. – Vol. 20, № 9. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01502-1>
- Preparation and functional characterization of human vascular endothelial growth factor-melittin fusion protein with analysis of the antitumor activity in vitro and in vivo / D. Wang, L. Hu, M. Su [et al.] // *International Journal of Oncology*. – 2015. – Vol. 47, № 3. – P. 1160–1168. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3078>

22. New soluble angiopoietin analog of Hepta-ANG1 prevents pathological vascular leakage / P. Liu, M. Ryczko, X. Xie [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2021. – Vol. 118, № 1. – P. 423–432. <https://doi.org/10.1002/bit.27580>
23. Ангиогенные и антиноцицептивные эффекты генотерапевтической конструкции pcDNA_VEGF165 в условиях хронической ишемии конечности в эксперименте *in vivo* / В. Г. Богдан, А. С. Доронькина, И. П. Жаворонок [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 2. – С. 138–147. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-2-138-147>
24. Higgins, N. P. Topological Behavior of Plasmid DNA / N. P. Higgins, A. V. Vologodskii // *Microbiology Spectrum*. – 2015. – Vol. 3, № 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0036-2014>
25. Influence of plasmid DNA topology on the transfection properties of DOTAP/DOPE lipoplexes / K. Remaut, N. N. Sanders, F. Fayazpour [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2006. – Vol. 115, № 3. – P. 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.08.009>

Reference

- Ryan T. J., Anderson J. L., Antman E. M., Braniff B. A., Brooks N. H., Califf R. M., Hillis L. D., Hiratzka L. F., Rapaport E., Riegel B. J., Russell R. O., Smith E. E., Weaver W. D. ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). *Circulation*, 1996, vol. 94, no. 9, pp. 2341–2350. <https://doi.org/10.1161/01.cir.94.9>
- Tang D. C., DeVit M., Johnston S. A. J. N. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 1992, vol. 356, no. 6365, pp. 152–154. <https://doi.org/10.1038/356152a0>
- Pereira V. B., Zurita-Turk M., Saraiva T. D. L., Castro C. P. De, Souza B. M., Agresti P. M., Lima F. A., Pfeiffer V. N., Azevedo M. S. P., Rocha C. S., Pontes D. S., Azevedo V., Miyoshi A. DNA vaccines approach: from concepts to applications. *World Journal of Vaccines*, 2014, vol. 4, no. 2, pp. 50–71. <https://doi.org/10.4236/wjv.2014.42008>
- Skóra J. P., Antkiewicz M., Kuńczyńska D., Kulikowska K., Strzelec B., Janczak D., Baré P. Local intramuscular administration of ANG1 and VEGF genes using plasmid vectors mobilizes CD34⁺ cells to peripheral tissues and promotes angiogenesis in an animal model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2021, vol. 143, pp. 112–186. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112186>
- Chervyakov Yu. V., Vlasenko O. N. Efficiency of gene therapy and standard conservative treatment of chronic lower limb ischemia of atherosclerotic genesis. *Vestnik khirurgii imeni I. I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery*, 2018, vol. 177, no. 2, pp. 64–71 (in Russian). <https://doi.org/10.24884/0042-4625-2018-177-2-64-69>
- Lederman R. J., Mendelsohn F. O., Anderson R. D., Saucedo J. F., Tenaglia A. N., Hermiller J. B., Hillegass W. B., Rocha-Singh K., Moon T. E., Whitehouse M. J., Annex B. H. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *The Lancet*, 2002, vol. 359, no. 9323, pp. 2053–2058. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)08937-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)08937-7)
- Mnikhovich M. V., Gershzon D., Brickman M., Davidzon Ya., Gavrilyuk A. A., Fomina L. V., Guminsky Yu. I., Vernigorodsky S. V., Miglas V. G. Morphogenetic mechanisms of cellular interactions during angiogenesis. *Journal of Anatomy and Histopathology*, 2012, vol. 1, no. 3, pp. 53–65 (in Russian).
- Yoder M. C. Human Endothelial Progenitor Cells. *Journal Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2012, vol. 9, no. 2, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006692>
- Nosrati H., Khouy R. A., Nosrati A., Khodaei M., Banitalebi-Dehkordi M., Ashrafi-Dehkordi K., Sanami S., Alizadeh Z. Nanocomposite scaffolds for accelerating chronic wound healing by enhancing angiogenesis. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, vol. 19, no. 1, pp. 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00755-7>
- Golledge J., Clancy P., Maguire J., Lincz L., Koblar S., McEvoy M., Attia J., Levi Chr., Sturm J., Almeida O. P., Yeap B. B., Flicker L., Norman P. E., Hankey Gr. J. Plasma angiopoietin-1 is lower after ischemic stroke and associated with major disability but not stroke incidence. *Stroke*, 2014, vol. 45, no. 4, pp. 1064–1068. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.004339>
- Chen F., Tan Z., Dong Ch.Yu., Li X., Xie You., Wu Yu., Chen X., Guo Sh. Combination of VEGF(165)/Angiopoietin-1 gene and endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *European Journal of Pharmacology*, 2007, vol. 568, no. 1, pp. 222–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.04.047>
- Barc P., Plonek T., Baczynska D., Radwanska A., Witkiewicz W., Halon A., Kupczynska-Markiewicz D., Strozec-ki L., Korta Krz., Skora Ja. A combination of VEGF 165 / HGF genes is more effective in blood vessels formation than ANGPT 1 / VEGF 165 genes in an in vivo rat model. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2016, vol. 9, no. 7, pp. 12737–12744.
- Kim D. E., Chivian D., Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32, pp. 526–531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>
- Šali A., Blundell T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 1993, vol. 234, no. 3, pp. 779–815. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.162610.1006/jmbi.1993>
- Shamriz S., Ofoghi H., Moazami N. Effect of linker length and residues on the structure and stability of a fusion protein with vaccine application. *Computers in Biology and Medicine*, 2016, vol. 76, no. 1, pp. 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2016.06.015>
- Zane L., Kraschowetz St., Trentini M. M., Alves V. D. S., Araujo S. C., Goulart C., De Cerqueira Leite L. C., Gonçalves V. M. Peptide linker increased the stability of pneumococcal fusion protein vaccine candidate. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, vol. 11, pp. 1–18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1108300>

17. Pettersen E. F., Goddard Th. D., Huang C. C., Meng E. C., Couch Gr. S., Croll Tr. I., Morris J. H., Ferrin Th. E. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 2021, vol. 30, no. 1, pp. 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
18. Studer G., Rempfer C., Waterhouse A. M., Gumienny R., Haas J., Schwede T. QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 2020, vol. 36, no. 8, pp. 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
19. Yantsevich A. V., Shchur V. V., Usanov S. A. Oligonucleotide Preparation Approach for Assembly of DNA Synthons. *SLAS Technology*, 2019, vol. 24, no. 6, pp. 556–568. <https://doi.org/10.1177/2472630319850534>
20. Kim Y. S., Lee H.-J., Han M.-H., Yoon N.-K., Kim Yeu-Ch., Ahn J. Effective production of human growth factors in *Escherichia coli* by fusing with small protein 6HFh8. *Microbial Cell Factories*, 2021, vol. 20, no. 9, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01502-1>
21. Wang D., Hu L., Su M., Wang Ju, Xu T. Preparation and functional characterization of human vascular endothelial growth factor-melittin fusion protein with analysis of the antitumor activity in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, 2015, vol. 47, no. 3, pp. 1160–1168. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3078>
22. Liu P., Ryczko M., Xie X., Baardsnes J., Lord-Dufour S., Duroche Y., Hicks E. A., Taiyab A., Sheardown H., Quaggin S. E., Jin J. New soluble angiopoietin analog of Hepta-ANG1 prevents pathological vascular leakage. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, vol. 118, no. 1, pp. 423–432. <https://doi.org/10.1002/bit.27580>
23. Bogdan V. G., Doronkina A. S., Zhavoronok I. P., Fedorova E. V., Filippovich T. A., Lepeshko S. G., Mankovskaya S. V. Angiogenic and antinociceptive effects of the gene therapy construct pcDNA_VEGF165 under conditions of chronic limb ischemia in vivo experiment. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 2, pp. 138–147 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-2-138-147>
24. Higgins N. P., Vologodskii A. V. Topological Behavior of Plasmid DNA. *Microbiology Spectrum*, 2015, vol. 3, no. 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0036-2014>
25. Remaut K., Sanders N. N., Fayazpour F., Demeester J., De Smedt S. C. Influence of plasmid DNA topology on the transfection properties of DOTAP/DOPE lipoplexes. *Journal of Controlled Release*, 2006, vol. 115, no. 3, pp. 335–343. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jconrel.2006.08.009>

Информация об авторах

Саченко Антон Борисович – научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: antosuk@yandex.ru

Попичева Екатерина Александровна – аспирант. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ekaterinapopicheva@mail.ru

Щур Вероника Владимировна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shchur931@gmail.com

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.by

Янцевич Алексей Викторович – кандидат химических наук, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al.yantsevich@gmail.com

Information about the authors

Sachanka Antos B. – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antosuk@yandex.ru

Popicheva Ekaterina A. – Postgraduate Student. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ekaterinapopicheva@mail.ru

Shchur Veronika V. – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shchur931@gmail.com

Usanov Sergei A. – Corresponding Member, Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Chief Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.by

Yantsevich Aliaksei V. – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al.yantsevich@gmail.com