

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ
НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права

УДК 579.6:577.15:577.113.3:579.842.11

Винтер
Маргарита Андреевна

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СПОСОБА
ПОЛУЧЕНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО
3',5'-ДИАДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА
И ЕГО НАНОКОМПЛЕКСОВ С ХИТОЗАНОМ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности **03.01.06** – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

Минск, 2025

Работа выполнена в Государственном научном учреждении
«Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель

Зинченко Анатолий Иванович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заведующий отраслевой лабораторией молекулярных био- и нанотехнологий Государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Официальные оппоненты:

Ермишин Александр Петрович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории нехромосомной наследственности государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Курченко Владимир Петрович, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией прикладных проблем биологии биологического факультета Белорусского государственного университета

Оппонирующая организация

Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»

Защита состоится 24.06.2025 г. в 10.00 ч на заседании совета по защите диссертаций Д 01.34.01 при Государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220084, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 2, тел.: (017) 236-50-63; факс (017) 395-47-66, e-mail: microbio@mbio.bas-net.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан « 23 » мая 2025 г.

Ученый секретарь совета по защите
диссертаций, кандидат биологических наук



Т.В. Семашко

ВВЕДЕНИЕ

Одним из уроков пандемии (2019–2023 гг.), вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, является беззащитность населения многих стран мира перед даже не слишком вирулентным, но внезапно появившимся возбудителем неизвестного инфекционного заболевания (Hafez et al., 2024). Поскольку невозможно предвидеть характер возбудителя новой пандемии, наиболее рациональным представляется использовать для борьбы с вирусами так называемую систему интерферона, которая эволюционно сформировалась в качестве первой линии обороны человека и животных от любых инфекционных патогенов (Ianevski et al., 2022; Mihaescu et al., 2023).

Центральным звеном этой системы является адапторный белок STING (от англ. STimulator of INterferon Genes) (Barber, 2015; Ahn, Barber, 2019), который воспринимает молекулярные сигналы опасности в виде различных чужеродных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) и практически без промедления включает биосинтез интерферонов различных классов и других цитокинов, обеспечивающих ликвидацию возникшей угрозы.

Опыт применения интерферона в качестве лечебного и профилактического средства свидетельствует, что более рациональным является применение не самого белка, а его индукторов. В качестве возможного индуктора может выступать бактериальный циклический динуклеотид – циклический 3',5'-диаденозинмонофосфат (цикло-диАМФ). Являясь агонистом рецептора STING, этот динуклеотид должен имитировать процесс внедрения в организм человека и животных чужеродного агента и активировать универсальную интерфероновую систему противовирусной защиты. Иными словами, цикло-диАМФ может рассматриваться в качестве кандидата на роль универсального противовирусного средства.

Кроме противовирусной, цикло-диАМФ, согласно литературным данным, проявляет также и сильную адьювантную активность в отношении слизистых оболочек, способствуя как гуморальным, так и клеточным иммунным ответам (Ebensen et al., 2011). Таким образом, благодаря своей иммуногенности, цикло-диАМФ имеет перспективу использоваться в качестве иммунного адьюванта при создании новых вакцин, обеспечивающих формирование продолжительного иммунитета у привитых людей и животных (Cheng et al., 2022).

В настоящее время цикло-диАМФ получают, главным образом, с помощью трудоемкого и экологически небезопасного химического синтеза (Suzuki et al., 2011). В то же время ферментативный синтез, катализируемый бактериальной диаденилатциклазой (ДАЦ), представляет собой

одностадийный процесс конденсации двух молекул АТФ (Zheng et al., 2013). На момент начала настоящего исследования в ряде работ уже была продемонстрирована возможность использования рекомбинантной ДАЦ для получения аналитических количеств цикло-диАМФ (Mehne et al., 2013; Казловский и др., 2015), однако актуальной оставалась проблема создания высокоактивных штаммов-продуцентов этого фермента.

Следует отметить, что использование цикло-диАМФ в медицинских целях ограничено в связи с его слабой устойчивостью в отношении деградирующих ферментов крови. Этот недостаток может быть устранен путем иммобилизации цикло-диАМФ на наноразмерных частицах-переносчиках, изготовленных, например, из природного полимера хитозана (Wehbe et al., 2021; Bashir et al., 2022).

В связи с вышеизложенным, актуальной является разработка биотехнологического способа получения цикло-диАМФ (в том числе иммобилизованного на наночастицах хитозана), что позволит сделать этот динуклеотид доступным для широких медико-биологических исследований.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами. Диссертационная работа выполнена в рамках задания 3.8 «Создание рекомбинантных штаммов микроорганизмов – продуцентов потенциально иммуногенных генетических конструкций» ГПНИ «Биотехнологии-2» на 2021-2025 гг. (№ госрегистрации 20221228).

Тема исследования соответствует следующим пунктам Перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2021–2025 годы, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 07.05.2020 №156:

- биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные);

- фармацевтические субстанции, диагностические препараты и системы, лекарственные средства и иммуномодуляторы.

Цель и задачи исследования. Цель работы – разработка биотехнологического способа получения потенциального иммуностимулятора – цикло-диАМФ, иммобилизованного на хитозане.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- - конструирование рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента диаденилатциклазы, пригодной для биокаталитического получения цикло-диАМФ;
- - разработка биотехнологического способа получения цикло-диАМФ;
- - конструирование рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента полисахариддеацетилазы (ПДА), пригодной для трансформации хитина в хитозан;
- - разработка биотехнологического способа получения хитозана;
- - получение и характеристика наночастиц на основе хитозана, содержащих в качестве «гостевой» молекулы цикло-диАМФ.

Объекты исследования. Объектами исследования служили рекомбинантные штаммы *E. coli* ДАЦ-22, продуцирующий диаденилатциклазу *Bacillus thuringiensis*, и *E. coli* bPDAB, продуцирующий полисахариддеацетилазу *Bacillus licheniformis*.

Предмет исследования. Предметом исследования являлись бактериальные диаденилатциклаза и полисахариддеацетилаза; ферментативные способы получения цикло-диАМФ и хитозана; получение наночастиц хитозана, содержащих цикло-диАМФ.

Научная новизна. Создан рекомбинантный штамм *E. coli* ДАЦ-22 – продуцент полноразмерной ДАЦ *B. thuringiensis*, продуцирующая способность которого в отношении целевого фермента в 2,25 раза превышает аналогичный показатель лучшего из описанных в литературе штаммов-аналогов (Казловский и др., 2015).

Рекомбинантный штамм *E. coli* ДАЦ-22 продуцирует полноразмерную ДАЦ *B. thuringiensis* в форме каталитически активных телец включения. Установлено, что препарат ДАЦ в виде телец включения можно повторно (более 10 раз) использовать для эффективного синтеза цикло-диАМФ.

Разработана уникальная технология синтеза цикло-диАМФ, предусматривающая наработку биомассы клеток *E. coli* ДАЦ-22, выделение из нее каталитически активных телец включения и их использование для трансформации АТФ в целевой продукт, позволившая получать порядка 100 мг цикло-диАМФ за один технологический цикл.

Создан рекомбинантный штамм *E. coli* bPDAB – продуцент полноразмерной ПДА *Bacillus licheniformis*, который характеризуется высоким уровнем синтеза целевого продукта ($38,68 \pm 2,50$ ед/л культуральной жидкости (КЖ)). Фермент впервые использован для трансформации хитина в хитозан.

Впервые синтезированы наноразмерные (200–250 нм) комплексы хитозана, содержащие цикло-диАМФ. Полученные комплексы способны высвободить цикло-диАМФ в окружающую среду рН-зависимым способом.

Положения, выносимые на защиту.

1. Рекомбинантный штамм *E. coli* ДАЦ-22 продуцирует полноразмерную ДАЦ *B. thuringiensis* в форме активных телец включения. Продуцирующая способность штамма составляет $720 \pm 6,80$ ед/л КЖ, что в 2,25 раз превышает аналогичный показатель лучшего из штаммов-продуцентов этого фермента, описанных в литературе.

2. Впервые разработанный способ получения цикло-диАМФ, предусматривающий наработку биомассы клеток *E. coli* ДАЦ-22, выделение из нее каталитически активных телец включения и их использование для трансформации АТФ в целевой продукт дает возможность получить порядка 100 мг препарата за один технологический цикл.

3. Рекомбинантный штамм *E. coli* bPDAV продуцирует полноразмерную ПДА *B. licheniformis* ($38,68 \pm 2,50$ ед/л КЖ), которая была впервые применена для получения хитозана из хитина.

4. Впервые синтезированные наноразмерные (200–250 нм) комплексы хитозана с цикло-диАМФ способны высвободить динуклеотид в окружающую среду рН-зависимым способом (при рН среды 4,5 эффективнее в 1,35, чем при рН 7,4 за 21 ч). Полученные комплексы могут быть использованы для создания рН-контролируемой пассивной системы доставки целевых соединений в иммунные клетки-мишени.

Личный вклад соискателя ученой степени в результаты диссертации с отграничением их от соавторов совместных исследований и публикаций. Диссертантом поставлены задачи и разработаны подходы к их решению, получены, проанализированы и статистически обработаны экспериментальные данные. Соавторами публикаций соискателя являются сотрудники отраслевой лаборатории молекулярных био- и нанотехнологий Института микробиологии НАН Беларуси.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Основные результаты работы были доложены на Международной научной конференции «Белорусские лекарства» (Минск, 2022); XIII Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2023); VIII Международной конференции «Химия, структура и функции биомолекул» (Минск, 2024 г.).

Результаты диссертационного исследования вошли в Топ-10 результатов деятельности ученых Национальной академии наук Беларуси в области фундаментальных и прикладных исследований за 2022 год.

Штамм бактерий *E. coli* ДАЦ-22 депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номером *E. coli* БИМ В-1915 Д и может служить объектом коммерциализации. Получен патент РБ № 24124 от 30.10.2023 на изобретение «Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий диаденилатциклазу *Bacillus thuringiensis*».

Разработаны технические нормативно-правовые акты – технологическая инструкция на производство биомассы клеток *E. coli* ДАЦ-22, содержащих ДАЦ (ТИ – 3/2023 от 02 июня 2023 г.) и лабораторный регламент на производство цикло-диАМФ (№ ЛР-2/2023 от 18.08.2023 г.).

Опубликованность результатов диссертации с указанием количества публикаций по теме диссертации и их объема в авторских листах. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, 2 статьи – в материалах конференций и конгрессов и тезисы 3 докладов. Получен 1 патент РБ.

Количество страниц опубликованных материалов – 52. Общий объем опубликованных материалов составляет 2,38 авторских листа. На статьи, соответствующие пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, приходится 1,87 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, 6 глав, заключения, списка использованных литературных источников (123 наименования на 11 страницах) и публикаций соискателя (10 наименований на 2 страницах), 11 приложений на 16 страницах. Работа изложена на 53 страницах машинописного текста, без учета иллюстраций, таблиц, библиографического списка и приложений. Работа содержит 3 таблицы на 2 страницах, 41 рисунок на 15 страницах.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обобщены литературные данные о свойствах и функциях цикло-диАМФ и хитозана и их использовании в разных областях науки и хозяйственной деятельности человека. Описаны способы получения цикло-диАМФ и хитозана, при этом особое внимание уделено биокатализаторам, участвующим в процессе их ферментативного синтеза.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили рекомбинантные штаммы *E. coli* ДАЦ-22 – продуцент диаденилатциклазы *Bacillus thuringiensis*, *E. coli* bPDAB

– продуцент полисахариддеацетилазы *B. licheniformis*, а также штаммы *E. coli* BL21(DE3) («Novagen», США), *E. coli* Rosetta pLysS («Novagen», США), *B. thuringiensis* BT407 («Novagen», США), *B. licheniformis* БИМ Б-1872 (Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов) и плазмиды pET42a(+) и pET15b.

Подбор праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием программного обеспечения SnapGene («GSL Biotech LLC», США) на основе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих ДАЦ *B. thuringiensis* и ПДА *B. licheniformis*, из базы данных GenBank.

Необходимые гены амплифицировали с помощью ПЦР. В качестве матрицы использовали геномную ДНК штаммов *B. thuringiensis* BT407 и *B. licheniformis* БИМ Б-1872.

Клонирование проводили по методикам, описанным в руководстве (Sambrook et al., 2012). При создании векторов и штаммов применяли методы продолжительной перекрывающейся ПЦР и трансформации. В результате были получены штаммы-продуценты ДАЦ (*E. coli* ДАЦ-22) и ПДА (*E. coli* bPDAB).

Для глубинного культивирования штаммов *E. coli* применяли среду LB, в которую вносили 100 мкг/мл канамицина (при использовании плазмиды pET42a+) или 100 мкг/мл ампициллина (при использовании плазмиды pET15b). Индукцию синтеза белка проводили путем внесения изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ).

Ультразвуковую дезинтеграцию клеток осуществляли с использованием прибора Sonifier-450 («Branson», США) при мощности 40–50 Вт (180 импульсов по 0,5 с).

Для выделения и очистки рекомбинантной ДАЦ нерастворимую фракцию клеточного лизата осаждали центрифугированием. Далее осадок, содержащий тельца включения, отмывали раствором мочевины с добавлением тритона X-100, после чего осадок дважды промывали 50 мМ Трис-HCl-буфером (pH 8,0), содержащим 100 мМ NaCl, и ресуспендировали в том же буфере.

Для выделения и очистки рекомбинантной ПДА лизат клеток *E. coli* bPDAB подвергали металло-аффинной хроматографии на колонке с Ni-NTA-агарозой («Qiagen», США).

Активность ДАЦ анализировали по скорости реакции превращения АТФ в цикло-диАМФ. Ход реакции контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Silica gel 60 F254 («Merck», Германия) в системе растворителей диоксан-вода-25 % аммиак (4:3:0,25). Концентрацию цикло-диАМФ измеряли спектрофотометрически с

использованием коэффициента молярной экстинкции (ϵ) при $\lambda=259$ нм, составляющем $27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Ферментативную активность ПДА анализировали по скорости деацетилирования хитина с использованием конго красного.

За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое обеспечивало образование целевого продукта в количестве 1 мкмоль за 1 мин для ДАЦ и за 1 ч для ПДА в соответствующих условиях реакции. Активность ферментов выражали в ед/л КЖ.

Белок в образцах определяли методом Брэдфорда.

Для синтеза цикло-диАМФ полученные тельца включения, содержащие ДАЦ, вносили в реакционную смесь (конечный объем 10 мл), содержащую (мМ): MgCl_2 – 10; Трис- HCl -буфер (pH 8,4) – 10; АТФ – 5, и инкубировали при 55°C в течение 2 ч.

Целевой продукт выделяли из реакционной смеси путем ионообменной хроматографии на колонке со смолой DEAE-Toyopearl 650 M («Toyo soda», Япония) в Cl^- -форме с использованием линейного градиента NaCl (0–500 мМ). Элюат упаривали и полученный раствор наносили на колонку с сефадексом G-10 («Serva», Германия). Целевой продукт элюировали водой и упаривали на ротаторном испарителе досуха. Осадок промывали охлажденным 96 %-ным этанолом и высушивали под вакуумом.

Аналитическую обращенно-фазовую масс-спектрометрию проводили с помощью хроматографа Agilent 1200 LC-DAD/MSD («Agilent», США). Стандартный маркер цикло-диАМФ был приобретен у фирмы «Jena Bioscience» (Германия). Инфракрасную спектроскопию с Фурье-преобразованием проводили на приборе «Tensor 27» («Bruker», США) в Институте химии новых материалов НАН Беларуси.

Для синтеза наночастиц хитозана, содержащих в своем составе цикло-диАМФ, использовали метод ионного гелеобразования. Эффективность включения цикло-диАМФ в состав хитозановых наночастиц оценивали спектрофотометрически ($\lambda=259$ нм) по содержанию цикло-диАМФ в супернатанте после осаждения центрифугированием наночастиц. Для элюции цикло-диАМФ из наночастиц применяли растворы цитрат-фосфатного буфера (pH 1,5, 4,5 и 7,4). Суспензии инкубировали при комнатной температуре, отбирая аликвоты через определенные промежутки времени. Степень элюции цикло-диАМФ оценивали путем спектрофотометрического ($\lambda = 259$ нм) определения его концентрации в супернатанте после осаждения центрифугированием частиц комплекса.

Для статистической обработки данных использовали методы, принятые в биологии (Зверев, 2013). Большинство экспериментальных данных представляют собой усредненные величины 3–7 опытов. Доверительный

интервал среднего арифметического рассчитывали для 95 % уровня вероятности. Разность двух средних величин считалась достоверной при отсутствии перекрывания их доверительных интервалов. Для расчетов использовалась компьютерная программа «Microsoft Excel».

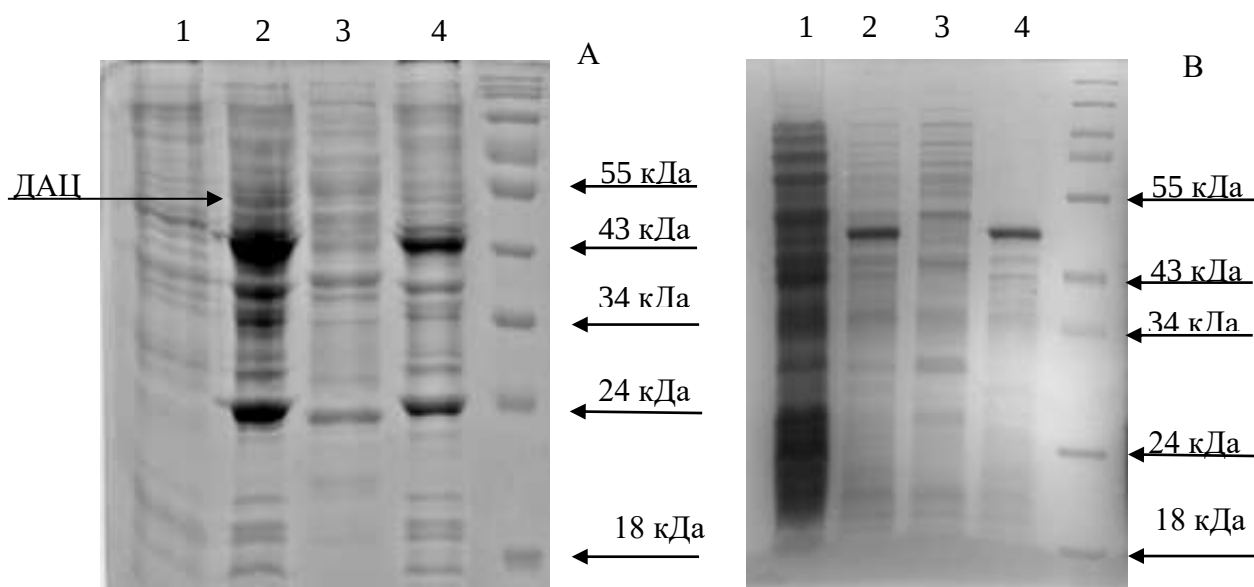
СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ДИАДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛУЧЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Для создания рекомбинантных штаммов *E. coli*, продуцирующих ДАЦ *B. thuringiensis*, ген, кодирующий ДАЦ, амплифицировали методом ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК *B. thuringiensis* BT407. Ампликоны, соответствующие по размеру целевому гену, встраивали в векторы pET42a+ и pET15b. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* Rosetta PlysS и *E. coli* BL21(DE3) соответственно. В результате сконструированы новые рекомбинантные штаммы *E. coli* – продуценты ДАЦ *B. thuringiensis* (*E. coli* Rosetta PlysS, несущие генетическую конструкцию pET-intDisA, и *E. coli* BL21 (DE3), несущие генетическую конструкцию pET15-DisAbthur).

Из электрофореграммы, представленной на рисунке 1, видно, что в клетках обоих рекомбинантных штаммов после индукции ИПТГ значительно увеличивалось количество белка молекулярной массой 47 кДа, что соответствует целевому ферменту. Основная часть (до 90 %) целевых белков находится в нерастворимой фракции клеточного лизата, т.е. продуцируется в форме телец включения.

Продуцирующую способность штаммов рассчитывали для ферментов в составе телец включения. Активность штамма *E. coli* BL21 (DE3), несущего плазмиду pET15-DisAbthur, составила $625 \pm 3,15$ ед/л КЖ, что меньше, чем активность штамма *E. coli* Rosetta PlysS с плазмидой pET-intDisA, которая составила $720 \pm 6,80$ ед/л КЖ. Для дальнейшей работы был выбран штамм на основе экспрессионной системы *E. coli* Rosetta PlysS, несущий плазмиду pET-intDisA [1-A, 2-A, 6-A]. Штамм был обозначен *E. coli* ДАЦ-22 и депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов как *E. coli* БИМ В-1915 Д. Получен патент на изобретение РБ № 24124 от 30.10.2023 [11-A].

Разработана технологическая инструкция на производство биомассы клеток *E. coli* ДАЦ-22 с получением из 1 л КЖ 50 мл клеточной суспензии (ТИ – 3/2023).



1 – клеточный лизат до индукции; 2 – клеточный лизат после индукции; 3 – супернатант клеточного лизата; 4 – тельца включения; М – маркер молекулярной массы белков «BlueEye Prestained Protein Marker»

Рисунок 1. Электрофореграмма внутриклеточных белков полученных штаммов на основе системы *E. coli* Rosetta PlysS (A) и *E. coli* BL21 (DE3) (B)

Оптимизированы условия культивирования штамма *E. coli* ДАЦ-22 с целью повышения его продуцирующей способности. Оптимизируемыми являлись такие параметры, как конечная концентрация ИПТГ, температура и время культивирования штамма после индукции синтеза ДАЦ. В результате культивирования был выбран следующий режим: конечная концентрация ИПТГ – 0,1 мМ, температура культивирования штамма после индукции синтеза белка – 37 °С, время культивирования – 18 ч. При этом продуцирующая способность штамма *E. coli* ДАЦ-22 составила $1004,00 \pm 16,99$ ед/л КЖ, что в 1,39-1,43 раза выше по сравнению с аналогичным показателем в неоптимизированных условиях.

Показано, что максимальную каталитическую активность фермент проявляет в следующих условиях: температура – 75 и 55 °С (для очищенного фермента и фермента в составе телец включения соответственно, рисунок 2).

Были изучены физико-химические свойства ДАЦ в составе телец включения. Показано, что кофактором в реакции синтеза цикло-диАМФ для ДАЦ выступают только ионы магния. Установлено, что максимальную активность фермент в составе телец включения проявляет в следующих условиях: температура 55 °С, pH 8,4 (Трис-HCl-буфер) (рисунок 3), 10 мМ $MgCl_2$ (рисунок 4).

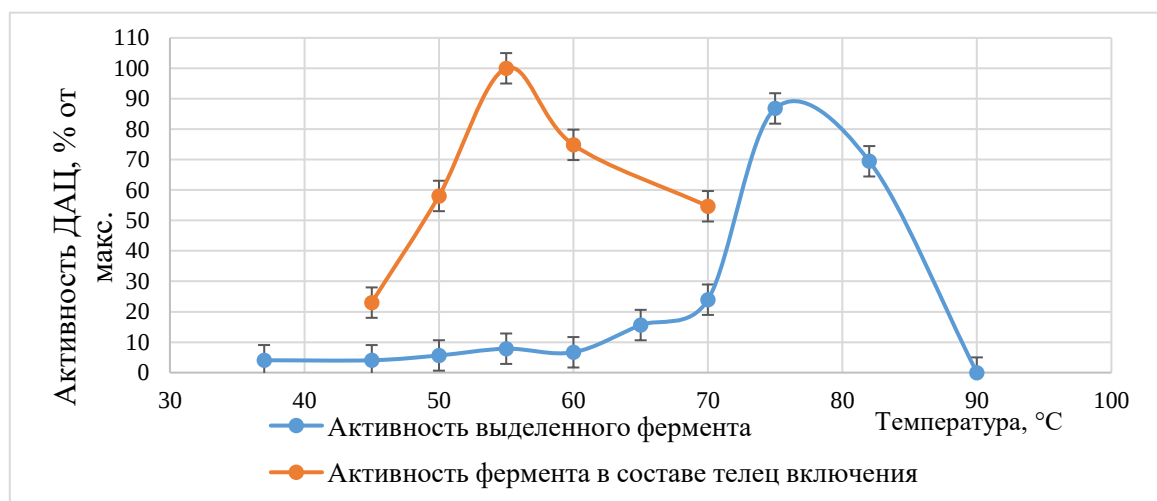


Рисунок 2. – График зависимости активности ДАЦ от температуры

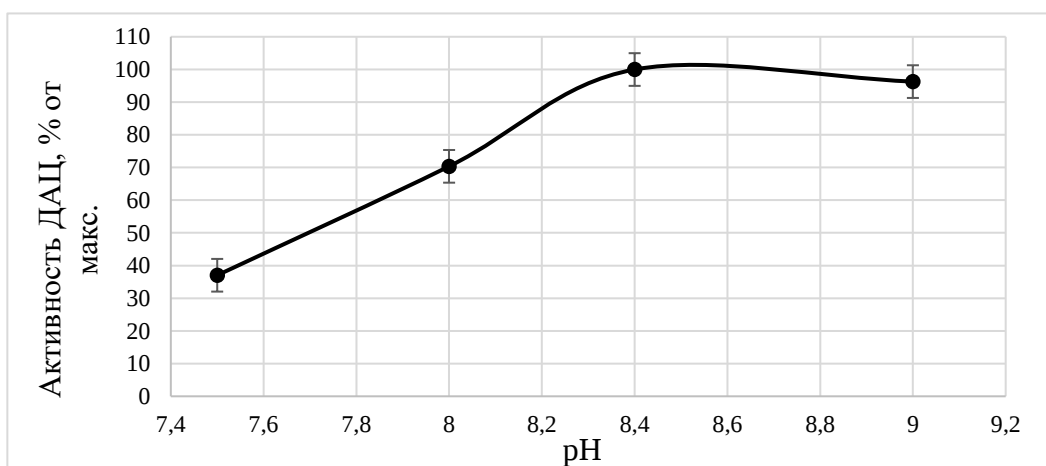


Рисунок 3. – График зависимости активности ДАЦ в составе телец включения от pH реакционной среды

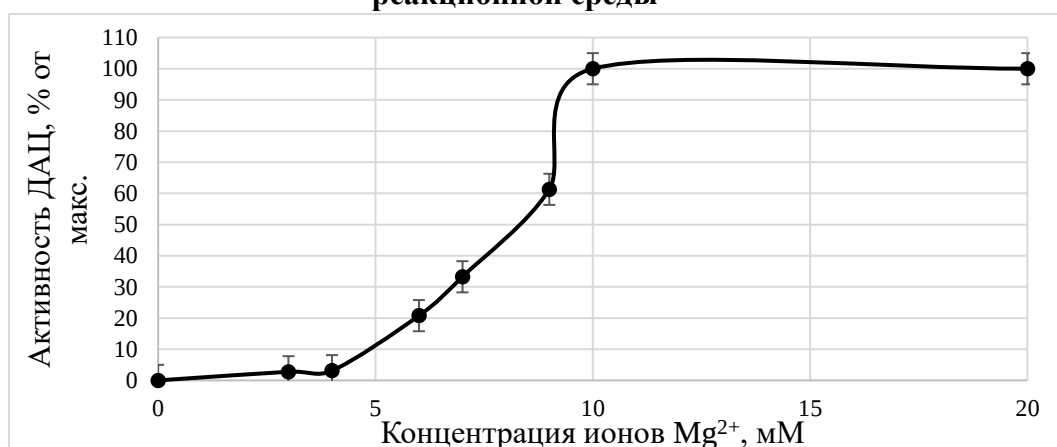


Рисунок 4. – График зависимости активности ДАЦ от концентрации ионов магния

Так как ДАЦ в составе телец включения находится в иммобилизованном состоянии, представляла интерес возможность

повторного использования телец включения в реакции синтеза цикло-диАМФ (рисунок 5). Как следует из рисунка 5, ДАЦ в составе телец включения можно использовать до 10 раз для эффективного синтеза цикло-диАМФ. Снижение активности при повторном использовании может быть связано с неполным осаждением фермента в тельцах включения [2-А, 6-А, 8-А, 9-А].

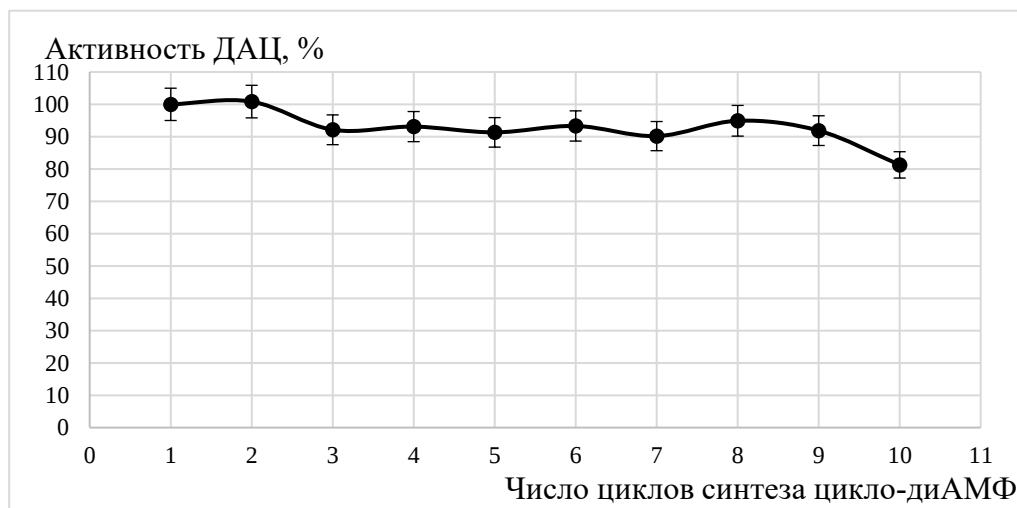


Рисунок 5. – Операционная стабильность ДАЦ, иммобилизованной в составе телец включения

В сравнительных экспериментах показано, что в течение 10 циклов синтеза цикло-диАМФ ДАЦ в составе телец включения сохраняет больший процент остаточной активности (80 %), чем ДАЦ, иммобилизованная на никель-сефарозе (67 %), которая используется для иммобилизации ферментов с целью их многократного использования в реакциях синтеза (He, 2021). Это, в совокупности с отсутствием дополнительных стадий очистки и более низкой оптимальной температурой каталитической реакции, позволяет сделать вывод, что использование ДАЦ в составе телец включения будет более экономически рентабельным.

СИНТЕЗ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИАДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА

Разработан способ получения цикло-диАМФ, предусматривающий трансформацию АТФ в целевой циклический динуклеотид под действием рекомбинантной ДАЦ *B. thuringiensis* (ЛР-2/2023). Основные стадии получения представлены на рисунке 6.

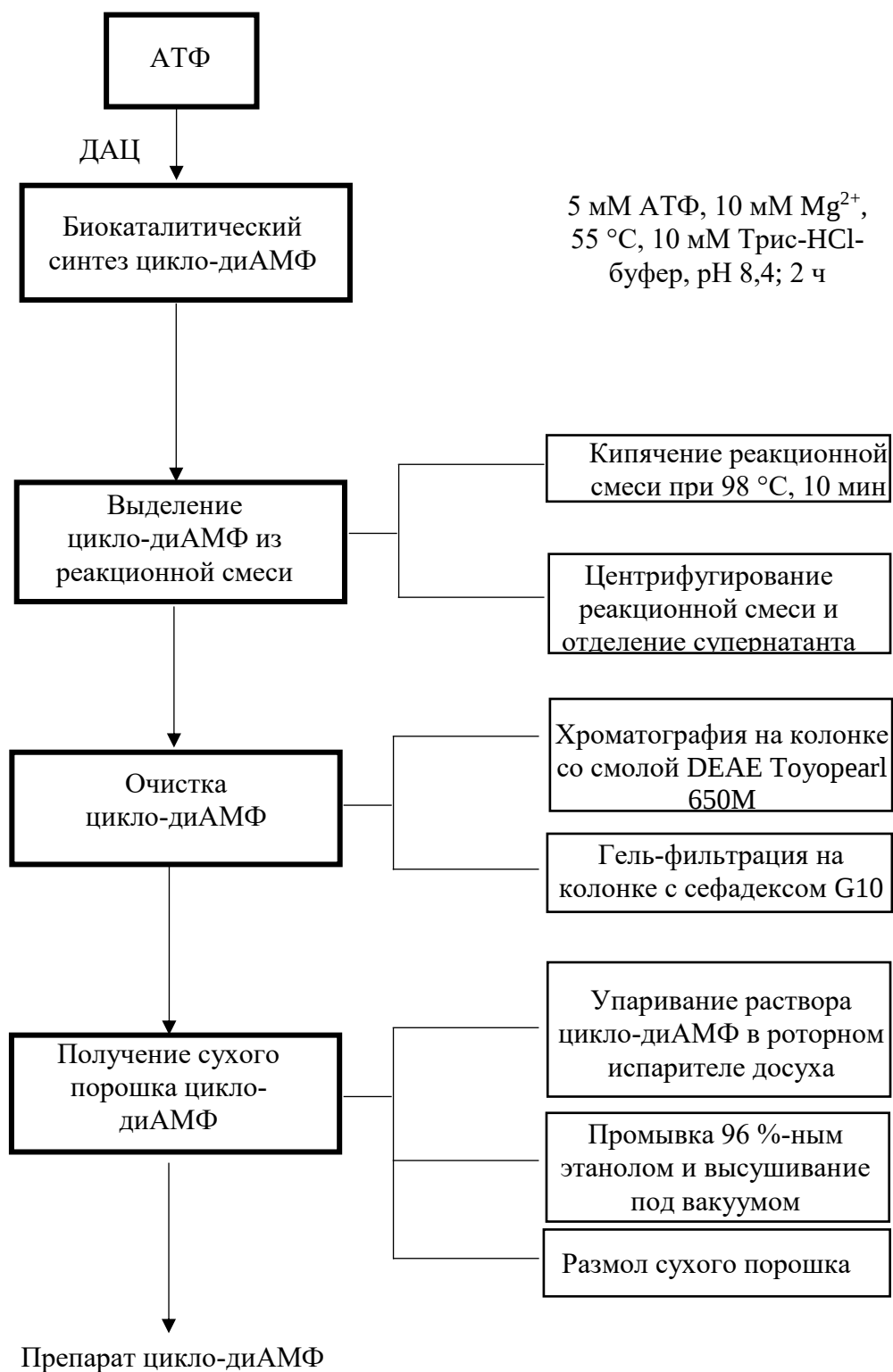


Рисунок 6. – Схема получения препарата цикло-диАМФ

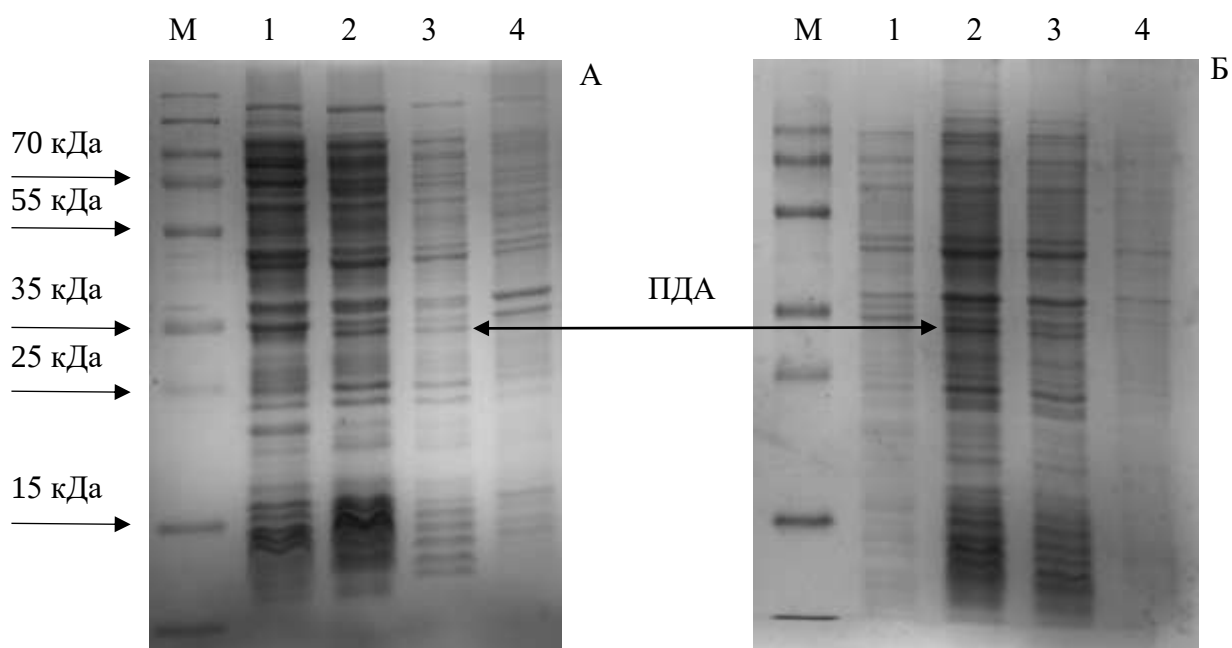
Разработан способ очистки цикло-диАМФ из реакционной смеси с использованием комбинации хроматографических приемов, которая для выделения цикло-диАМФ ранее не применялась.

По продолжительности биокаталитической стадии синтеза (2 ч) и выходу реакции (94–97 %), а также выходу чистого цикло-диАМФ (70–77 %)

разработанный процесс не уступает лучшим из описанных в литературе (Казловский, 2015). Нарботанный образец цикло-диАМФ является хроматографически чистым (более 85 %) и пригоден для дальнейшего исследования его биологической активности. Структура полученного соединения подтверждена методами УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии [1-А, 9-А].

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПОЛИСАХАРИДДЕАЦЕТИЛАЗЫ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛУЧЕННОГО ФЕРМЕНТА

Для создания рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцирующего ПДА *B. licheniformis*, ген, кодирующий ПДА, амплифицировали методом ПЦР с использованием в качестве матрицы геномной ДНК *B. licheniformis*. Ампликоны, соответствующие по размеру целевому гену, встраивали в вектор рЕТ42а+. Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* Rosetta PlysS и *E. coli* BL21(DE3). Показано, что полученные штаммы продуцируют ПДА в растворимой форме (рисунок 7).



1 – клеточный лизат до индукции; 2 – клеточный лизат после индукции; 3 – супернатант клеточного лизата; 4 – тельца включения; М – маркер молекулярной массы белков «BlueEye Prestained Protein Marker»

Рисунок 7. – Электрофореграмма внутриклеточных белков до и после индукции полученных штаммов на основе системы клеткок *E. coli* BL21 (DE3) (А) и *E. coli* Rosetta pLysS (Б)

Продуктивность штаммов в расчете на синтезируемый белок составила $1,77 \pm 0,22$ мг/л КЖ для *E. coli* BL21 (DE3) и $3,46 \pm 0,18$ мг/л КЖ для *E. coli* Rosetta pLysS. В дальнейшей работе мы использовали штамм-продуцент ПДА, полученный при трансформации клеток *E. coli* Rosetta pLysS, обозначенный *E. coli* bPDAB – продуцент рекомбинантной ПДА *B. licheniformis*, образуемой преимущественно в растворимой форме [5-А].

Были подобраны концентрации конго красного и хитозана, которые при взаимодействии позволяют определить степень деацетилирования хитозана по степени деколоризации конго красного в диапазоне исследуемых значений. Показано, что концентрация ПДА и N-ацетилглюкозаминных групп не влияет на деколоризацию красителя [10-А].

Разработана методика определения концентрации хитозана с помощью конго красного а также метод выделения хитозана из реакционной смеси с получением сухого порошка [5-А, 10-А].

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СТРУКТУР, СОДЕРЖАЩИХ ЦИКЛО-диАМФ И ХИТОЗАН

Для доставки цикло-диАМФ к клеткам-мишеням впервые проведена иммобилизация указанного соединения на хитозане методом ионного гелеобразования.

Оптимизированы основные параметры процесса получения комплексов цикло-диАМФ с хитозаном, такие как соотношение хитозана и цикло-диАМФ. Медианный размер полученных в подобранных условиях наночастиц, определенных методом динамического рассеивания света, находится в диапазоне 200-250 нм с полидисперсностью (Pdi) менее 0,05 (рисунок 8) [4-А].

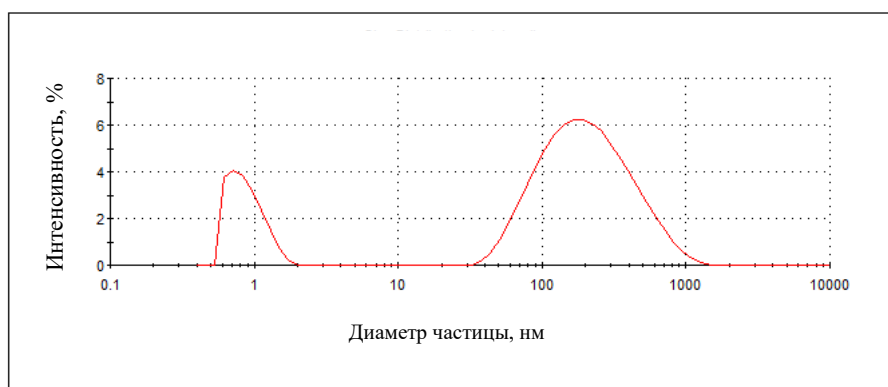
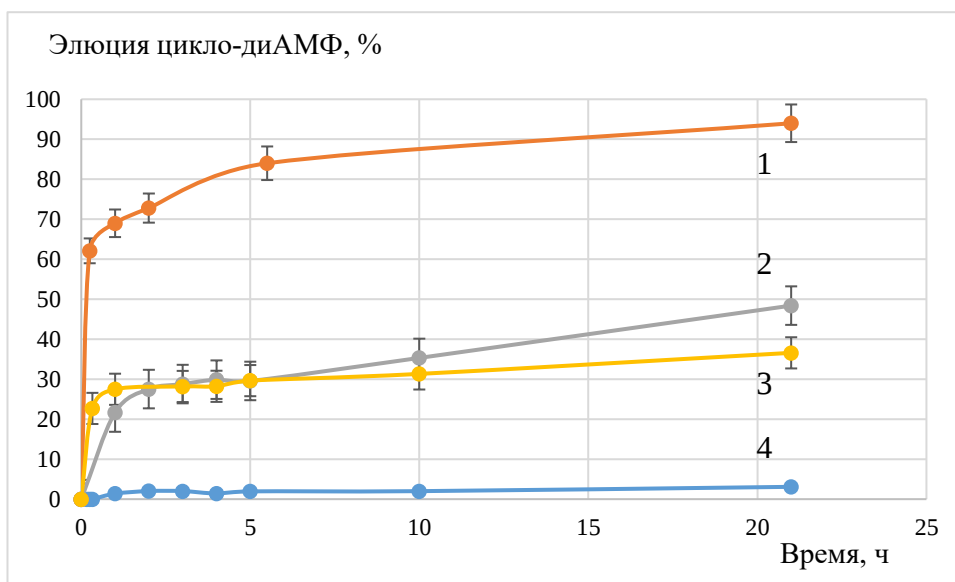


Рисунок 8. – Размер комплексов хитозана и цикло-диАМФ

С целью установления возможности использования комплексов хитозан/цикло-диАМФ в качестве системы для доставки этого соединения в клетки-мишени изучена динамика высвобождения цикло-диАМФ из

комплекса с хитозаном при различных значениях pH (1,5; 4,5 и 7,4). Такие значения pH были выбраны в связи с тем, что pH крови имеет значение около 7,4 (Gu et al., 2008), а pH внутри лизосом находится в диапазоне значений от 4 до 5 (Kwak et al., 2004). Полученные данные отражены на рисунке 9.

Установлено, что скорость высвобождения цикло-диАМФ из комплекса с хитозаном повышается при снижении pH [3-А, 4-А, 7-А].



1 – 0,05 М Фосфат-цитратный буфер, pH 1,5; 2 – 0,05 М Фосфат-цитратный буфер, pH 4,5;
3 – 0,05 М Фосфат-цитратный буфер, pH 7,4; 4 – дистиллированная вода

Рисунок 9. – Динамика элюции цикло-диАМФ из комплекса с хитозаном в различных средах

С использованием исходного и высвобожденного из комплексов цикло-диАМФ установлено, что образование комплексов с хитозаном не влияет на структуру цикло-диАМФ. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования комплексов цикло-диАМФ/хитозан в качестве pH-контролируемой пассивной системы доставки данных соединений в места воспаления и к раковым клеткам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Создан рекомбинантный штамм *E. coli* ДАЦ-22 – продуцент полноразмерной диаденилатциклазы (ДАЦ) *B. thuringiensis*. Его продуцирующая способность в отношении целевого фермента составляет $720 \pm 6,80$ ед/л КЖ, что в 2,25 раза превышает аналогичный показатель лучшего из описанных в литературе штаммов. Оптимизированы условия культивирования штамма *E. coli* ДАЦ-22, что позволило повысить уровень синтеза ДАЦ до 1000 ед/л КЖ. Полученный штамм продуцирует целевой фермент в форме каталитически активных телец включения, что позволяет повторно (до 10 раз) использовать ДАЦ для синтеза цикло-диАМФ без потери активности. Определены оптимальные физико-химические параметры для проявления каталитической активности ДАЦ в форме телец включения – 55 °С, рН 8,7, концентрации ионов магния – 10 мМ [1-А–2-А, 6-А, 8-А, 9-А].

2. Разработана технология получения цикло-диАМФ, предусматривающая наработку биомассы клеток *E. coli* ДАЦ-22, выделения из нее каталитически активных телец включения и их использование для трансформации АТФ в целевой продукт с получением 100 мг препарата за один технологический цикл. По продолжительности биокаталитической стадии (2 ч) и выходу реакции синтеза цикло-диАМФ (94–97 %), а также выходу изолированного цикло-диАМФ (70–77 %) разработанный процесс не уступает лучшим из описанных в литературе. Структура и чистота цикло-диАМФ (более 85 %) подтверждена методами ТСХ, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии [1-А, 9-А].

3. Создан рекомбинантный штамм *E. coli* bPDAB – продуцент полноразмерной полисахариддеацетилазы (ПДА) *B. licheniformis*, продуцирующая способность которого составляет $38,68 \pm 2,50$ ед/л КЖ. Установлено, что рекомбинантный фермент в качестве субстрата может использовать как высокополимерный коллоидный хитин, так и хитин в олигомерной форме. Показано, что ПДА способна катализировать реакцию деацетилирования как в водно-буферной среде, так и в двухфазной системе хлороформ: 10 мМ Трис-НСl-буфер. Структура биокаталитически получаемого хитозана подтверждена методами УФ-спектроскопии, тонкослойной хроматографии и ИК-спектроскопии [5-А, 10-А].

4. Впервые синтезированы наноразмерные (200–250 нм) комплексы цикло-диАМФ с хитозаном. Показано, что максимальный процент связывания (62 %) хитозана и цикло-диАМФ достигается при массовом соотношении 1:1 и 1:2, при этом емкость полученных комплексов составила 55 % и 63 % соответственно. Установлено рН-зависимое высвобождение цикло-диАМФ из

комплексов с хитозаном, которое происходит более активно при pH, равном 4,5, характерном для очагов воспалений и областей развития опухолей, чем при pH 7,4 (в 1,35 раза через 21 ч). Кроме того, показано, что образование комплексов с хитозаном не влияет на химическую структуру цикло-диАМФ. Полученные результаты свидетельствуют в пользу возможности использования наноконкомплексов хитозан:цикло-диАМФ в качестве pH-контролируемой пассивной системы доставки данных соединений в клетки-мишени [3-А, 4-А, 7-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

К практическому использованию рекомендуется рекомбинантный штамм *E. coli* ДАЦ-22 в качестве продуцента диаденилатциклазы и *E. coli* bPDAB в качестве продуцента полисахариддеацетилазы, технология культивирования штамма *E. coli* ДАЦ-22 (ТИ – 3/2023 на производство биомассы клеток *E. coli* ДАЦ-22, акт от 16 июня 2023 г.), лабораторная технология производства цикло-диАМФ (ЛР-2/2023, акт от 31 августа 2023 г.), а также наноконкомплексов хитозан:цикло-диАМФ (акт 12 декабря 2023 г.), а также способ получения препаратов ПДА и хитозана.

Результаты исследований внедрены в учебный процесс МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ (акт внедрения № 29 от 27.10.2022).

Получен патент РБ № 24124 от 30.10.2023 на изобретение «Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий диаденилатциклазу *Bacillus thuringiensis*» [11-А].

Получено положительное заключение от 21 октября 2024 г. аккредитованного отдела контроля качества ОАО «БелВитунифарм» о возможности использования цикло-диАМФ, выделенного в отраслевой лаборатории молекулярных био- и нанотехнологий, как потенциального усилителя вакцин (адьюванта) в ветеринарии.

Список публикаций соискателя ученой степени

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1-А. **Винтер, М. А.** Гетерологичная экспрессия диаденилатциклазы в виде телец включения, обладающих ферментативной активностью / **М. А. Винтер**, И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 5. – С. 509–516.

2-А. **Vinter, M. A.** Construction of bacterial strain forming inclusion bodies, exhibiting diadenylate cyclase activity / **M. A. Vinter**, I. S. Kazlouski, A. I. Zinchenko // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Ин-та генетики и цитологии НАН Беларуси, 2022. – Т. 33. – С. 105–109.

3-А. **Винтер, М. А.** Получение комплексов хитозана с 3',5'-циклическим диаденозинмонофосфатом / **М. А. Винтер**, И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 206–212.

4-А. **Vinter, M. A.** Production of chitosan nanoparticles containing 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate / **M. A. Vinter**, A. I. Zinchenko // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. Ин-та генетики и цитологии НАН Беларуси, 2023. – Т. 35. – С. 151–156.

5-А. **Винтер, М. А.** Создание штамма-продуцента полисахариддеацетилазы, пригодной для превращения хитина в хитозан / **М. А. Винтер**, А. И. Зинченко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2024. – Т. 16. – С. 10–26.

Статьи в изданиях, не входящих в перечень ВАК, и материалах конференций:

6-А. **Vinter, M. A.** Synthesis of cyclic diadenosine 3',5'-monophosphate using inclusion bodies exhibiting diadenylate cyclase activity / **M. A. Vinter**, I. S. Kazlouski, A. I. Zinchenko // Белорусские лекарства: матер. Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 23–25 ноября 2022 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – С. 46–48.

7-А. **Винтер, М. А.** Получение наночастиц хитозана в комплексе с 3',5'-циклическим диаденозинмонофосфатом / **М. А. Винтер**, И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: материалы XIII Междунар. науч. конф. (Минск, 6–9 июня 2023 г.) / орг. ком. конф.: А. А. Шепшелев (пред.) и [др.]. – Минск: Беларуская навука, 2023. – С. 357–358.

Тезисы докладов:

8-А. **Винтер, М. А.** Синтез циклического димерного аденозин-3',5'-монофосфата под действием телец включения, образованных рекомбинантной диаденилатциклазой / **М. А. Винтер**, И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Фундаментальные и прикладные науки – медицине: тез. докл. Междунар. науч. конф., Минск, 7 октября 2022 г. / Институт физиологии НАН Беларуси. – С. 12–13.

9-А. **Vinter, M.** Construction of bacterial strain forming inclusion bodies exhibiting diadenylate cyclase activity / **M. Vinter**, I. Kazlouski, A. Zinchenko // Актуальные экологические проблемы: материалы XII Междунар. науч. конф. молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов (на англ. языке), Минск, 1–2 декабря 2022 г. / МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ; под ред. Т. В. Беляевой и др. – С. 107.

10-А. **Vinter, M.** Creation of a strain-producer of polysaccharide deacetylase suitable for converting chitin into chitosan / **M. Vinter**, A. Zinchenko // Chemistry, structure and function of biomolecules: матер. Междунар. науч.-практ конф., Минск, 1–5 октября 2024 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – С. 187.

Патенты:

11-А. Патент BY 24124, МПК С 12 N 1/21 (2006.01). Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli*, продуцирующий диаденилатциклазу *Bacillus thuringiensis* : № ф 20220205 : заявлено 22.08.2022 : опубл. 30.10.2023 / **Винтер М. А.**, Казловский И. С., Зинченко А. И. ; заявители: Государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси». – 8 с.

РЭЗІЮМЭ

Вінтэр Маргарыта Андрэеўна

**РАСПРАЦОЎКА БІЯТЭХНАЛАГІЧНАГА СПАСАБУ
АТРЫМАННЯ ЦЫКЛІЧНАГА 3',5'-
ДЫАДЭНАЗІНМАНАФАСФАТУ І ЯГО НАНАКОМПЛЕКСАЎ
З ХІТАЗАНАМ**

Ключавыя словы: дыадэнілатцыклаза (ДАЦ), поліцукрыддэацэцілаза (ПДА), цыкла-дыАМФ, *Escherichia coli*, генетычная інжынерыя, ферментатыўны сінтэз, хітазан, наначасціцы.

Мэта даследавання: распрацоўка біятэхналагічнага спосабу атрымання патэнцыяльнага імунастымулятара - цыкла-дыАМФ, імабілізаванага на хітазане.

Метады даследавання: стандартныя метады геннай інжынерыі, культываванне мікраарганізмаў, электрофарэз, храматаграфія, УФ-спектрафотаметрыя.

Выкарыстаная апаратура: спектрафатометр Solar UV-VIS PB2201 (ЗАТ «Солар»), ампліфікатар T100™ Thermal Cycler (BioRad) і інш.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Сканструяваны штамы *E. coli* ДАЦ-22, які прадукуюць ДАЦ *B. thuringiensis* з прадуктыўнасцю ($720 \pm 6,80$ адз/л КВ) у 2,25 разы якая перавышае аналагічны паказчык лепшага з апісаных у літаратуры штамаў-аналагаў. З выкарыстаннем ДАЦ у "цельцах ўключэння" распрацаваны эфектыўны (94–97 % выхад мэтавага прадукту за 2 гадзіны рэакцыі) спосаб атрымання фармакалагічна перспектыўнага злучэння – цыкла-дыАМФ.

Сканструяваны штамы *E. coli* bPDAB – прадукцэнт ПДА *B. licheniformis* (прадуктыўнасць па адносінах да ПДА $38,68 \pm 2,50$ адз/л КВ), якая ўпершыню была выкарыстана для трансфармацыі хітыну ў хітазан.

Упершыню сінтэзаваны комплексы цыкла-дыАМФ з нананамернымі часціцамі хітазану, здольныя вызваляць малекулы цыкла-дыАМФ рН-залежным спосабам.

Рэкамендацыі па выкарыстанню. Новыя рэкамбінантныя штамы ў якасці прадукцэнтаў ДАЦ і ПДА. Лабараторная тэхналогія вытворчасці імунастымулятара цыкла-дыАМФ. Эксперыментальныя ўзоры свабоднага і імабілізаванага на хітазане цыкла-дыАМФ – для правядзення медыка-біялагічных выпрабаванняў.

Вобласць выкарыстання: біятэхналогія, мікрабіялогія, энзімалогія, фармакалогія.

РЕЗЮМЕ

Винтер Маргарита Андреевна

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СПОСОБА
ПОЛУЧЕНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО 3',5'-
ДИАДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА И ЕГО
НАНОКОМПЛЕКСОВ С ХИТОЗАНОМ**

Ключевые слова: диаденилатциклаза (ДАЦ), полисахариддеацетилаза (ПДА), цикло-диАМФ, *Escherichia coli*, генетическая инженерия, ферментативный синтез, хитозан, наночастицы.

Цель исследования: разработка биотехнологического способа получения потенциального иммуностимулятора – цикло-диАМФ, иммобилизованного на хитозане.

Методы исследования: стандартные методы генной инженерии, культивирование микроорганизмов, электрофорез, хроматография, УФ-спектрофотометрия.

Использованная аппаратура: спектрофотометр Solar UV-VIS PB2201 (ЗАО «Солар»), амплификатор T100™ Thermal Cycler (BioRad) и др.

Полученные результаты и их новизна. Сконструирован штамм *E. coli* ДАЦ-22, продуцирующий ДАЦ *B. thuringiensis* с продуктивностью ($720 \pm 6,80$ ед/л КЖ) в 2,25 раза превышающей аналогичный показатель лучшего из описанных в литературе штаммов-аналогов. С использованием ДАЦ в «тельцах включения» разработан эффективный (94–97 % выход целевого продукта за 2 ч реакции) способ получения фармакологически перспективного соединения – цикло-диАМФ.

Сконструирован штамм *E. coli* bPDAB - продуцент ПДА *B. licheniformis* (продуктивность по отношению к ПДА $38,68 \pm 2,50$ ед/л КЖ), которая впервые была использована для трансформации хитина в хитозан.

Впервые синтезированы комплексы цикло-диАМФ с наноразмерными частицами хитозана, способные высвобождать молекулы цикло-диАМФ Рн-зависимым способом.

Рекомендации по использованию. Новые рекомбинантные штаммы – как продуценты ДАЦ и ПДА. Лабораторная технология производства иммуностимулятора цикло-диАМФ. Экспериментальные образцы свободного и иммобилизованного на хитозане цикло-диАМФ – для проведения медико-биологических испытаний.

Область применения: биотехнология, микробиология, энзимология, фармакология.

SUMMARY

Vinter Marharyta

DEVELOPMENT OF A BIOTECHNOLOGICAL METHOD FOR OBTAINING CYCLIC 3',5'-DIADENOSINE MONOPHOSPHATE AND ITS NANOCOMPLEXES WITH CHITOSAN

Key words: diadenylate cyclase (DAC), polysaccharide deacetylase (PDA), cyclic diAMP, *Escherichia coli*, genetic engineering, enzymatic synthesis, chitosan, nanoparticles, immunostimulant.

Aim of investigation: is a development of a biotechnological method for synthesis of a potential immunostimulant – cyclic diAMP, immobilized on chitosan.

Methods of investigation: standard genetic engineering techniques, cultivation of microorganisms, electrophoresis, chromatography, UV-spectroscopy.

Research equipment: spectrophotometer Solar UV-VIS PB2201 (Closed joint stock company «SOLAR»), thermal cycler T100™ (BioRad), etc.

Obtained results and their novelty. The strain *E. coli* DAC-22 has been constructed, producing *B. thuringiensis* DAC with productivity ($720 \pm 6,80$ U/l CL) 2.25 times higher than the similar indicator of the best of the analogous strains described in the literature. Using DAC in "inclusion bodies", an effective (94-97 % yield of the target product in 2 hours of reaction) method for obtaining a pharmacologically promising compound – cyclic diAMP - has been developed.

A strain of *E. coli* bPDAB was constructed as a producer of PDA *B. licheniformis* (productivity in relation to PDA 38.68 ± 2.50 U/l CL), which was used for the first time to transform chitin into chitosan.

For the first time, complexes of cyclic diAMP with nanosized chitosan particles have been synthesized, capable of releasing cyclo-diAMP molecules in a pH-dependent manner.

Recommendation for application. New recombinant strains can be used as DAC and PDA producers. The laboratory technology for cyclic diAMP production may be scaled up to pilot plant level. The experimental samples of free and chitosan-immobilized cyclic diAMP can be used for biomedical tests.

Application area: biotechnology, microbiology, enzymology, pharmacology.

Подписано в печать 22.05.2025 Формат 60x84_{1/16} Бумага офсетная
Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4 Тираж 60 экз. Заказ 7362
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2 Тел. 8 029 684 18 66
Отпечатано на издательской системе Gestetner в ИООО «Право и экономика»
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185