

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Институт природных ресурсов
Направление подготовки «Химическая технология»
Кафедра Физической и аналитической химии

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Получение рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅

УДК 604

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4Г	Ащеулова Дарья Олеговна		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ФАХ, ИПР	Пестряков Алексей Николаевич	д-р.хим.наук, профессор		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент кафедры менеджмента ИСГТ	Креницына Зоя Васильевна	канд.техн.наук		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент, ИНК, каф. ЭБЖ	Шеховцова Наталья Сергеевна	канд.хим.наук		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Зав. кафедрой	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
ФАХ, ИПР	Пестряков Алексей Николаевич	д-р.хим.наук, профессор		

Планируемые результаты по программе

Код результата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
<i>Профессиональные компетенции</i>	
P1	Применять <i>глубокие</i> естественно-научные, математические и инженерные <i>знания</i> для создания <i>новых</i> материалов
P2	Применять <i>глубокие знания</i> в области современных технологий химического производства для решения <i>междисциплинарных</i> инженерных задач
P3	Ставить и решать <i>инновационные</i> задачи <i>инженерного анализа</i> , связанные с созданием материалов и изделий, с использованием системного анализа и моделирования объектов и процессов химической технологии
P4	Разрабатывать химико-технологические процессы, <i>проектировать</i> и использовать <i>новое</i> оборудование для создания материалов, конкурентоспособных на <i>мировом</i> рынке
P5	Проводить теоретические и экспериментальные <i>исследования</i> в области создания <i>новых</i> материалов, современных химических технологий, нанотехнологий
P6	Внедрять, <i>эксплуатировать</i> современные высокотехнологичные линии автоматизированного производства, обеспечивать их <i>высокую эффективность</i> , соблюдать правила охраны здоровья и безопасности труда на химическом производстве, выполнять требования по защите окружающей среды
<i>Универсальные компетенции</i>	
P7	Использовать <i>глубокие знания</i> по <i>проектному менеджменту</i> для ведения <i>инновационной</i> инженерной деятельности с учетом юридических аспектов защиты интеллектуальной собственности
P8	<i>Активно</i> владеть <i>иностранным языком</i> на уровне, позволяющем работать в иноязычной среде, разрабатывать

	документацию, презентовать и защищать результаты инновационной инженерной деятельности
P9	Эффективно работать индивидуально, в качестве <i>члена и руководителя группы</i> , состоящей из специалистов различных направлений и квалификаций, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность <i>следовать корпоративной культуре</i> организации
P10	Демонстрировать <i>глубокие знания социальных, этических и культурных аспектов</i> инновационной инженерной деятельности, компетентность в вопросах <i>устойчивого развития</i>
P11	<i>Самостоятельно учиться</i> и непрерывно <i>повышать квалификацию</i> в течение всего периода профессиональной деятельности

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»



Институт природных ресурсов
Направление подготовки 18.04.01 Химическая технология
Кафедра физической и аналитической химии

УТВЕРЖДАЮ:
Зав. кафедрой
_____ Пестряков А.Н.
(Подпись) (Дата) (Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ

на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Магистерской диссертации

(бакалаврской работы, дипломного проекта/работы, магистерской диссертации)

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4Г	Ащеуловой Дарье Олеговне

Тема работы:

Получение рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅

Утверждена приказом проректора-директора
(директора) (дата, номер)

А.Ю. Дмитриев, Приказ №3358/с
от 06.05.2016

Срок сдачи студентом выполненной работы:

30.05.2016

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

Исходные данные к работе

(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).

Объект исследования: рекомбинантные технологии получения антимикробных пептидов в бактериальной системе.

Литературные данные: статьи и книги по рекомбинантной технологии получения белков и пептидов, методам их выделения, очистки и анализа.

<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p> <p><i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i></p>	<p>Анализ литературных источников.</p> <p>Осуществление комплекса биохимических и молекулярно-биологических методик для выполнения исследования.</p> <p>Анализ и обсуждение результатов проведенной работы.</p> <p>Анализ экономической и ресурсо-эффективности проекта.</p> <p>Анализ рисков и опасностей проведения исследования и составления перечня нормативов для их регулирования.</p> <p>Формулировка выводов и заключений по работе.</p>
<p>Перечень графического материала</p> <p><i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>	
<p>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</p> <p><i>(с указанием разделов)</i></p>	
<p style="text-align: center;">Раздел</p>	<p style="text-align: center;">Консультант</p>
<p>Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</p>	<p>Креницына З.В.</p>
<p>Социальная ответственность</p>	<p>Шеховцова Н.С.</p>
<p>Названия разделов, которые должны быть написаны на иностранном языке:</p>	
<p>2. Материалы и методы; 3. Результаты</p>	

<p>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</p>	
--	--

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Пестряков А.Н.	Д.х.н., профессор		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4Г	Ащеулова Д.О.		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4Г	Ащеуловой Дарье Олеговне

Институт	ИПР	Кафедра	ФАХ
Уровень образования	магистрант	Направление/специальность	Химическая технология/Инжиниринг в биотехнологических и фармацевтических производствах

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

1. <i>Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	Стоимость материально-технических ресурсов при проведении работ по получению рекомбинантного антимикробного пептида.
---	--

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. <i>Оценка коммерческого и инновационного потенциала НТИ</i>	Оценить коммерческий и инновационный потенциал технологии получения рекомбинантного антимикробного пептида для его последующего применения в области радиофармацевтики
2. <i>Разработка устава научно-технического проекта</i>	Разработать устав для проекта
3. <i>Планирование процесса управления НТИ: структура и график проведения, бюджет, риски</i>	Обозначить структуру и график проведения проекта (диаграмма Гантта), риски, связанные с выполнением проекта
4. <i>Определение ресурсной, финансовой, экономической эффективности</i>	Определить показатели ресурсной, финансовой, экономической эффективности проекта

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

1. <i>Сегментирование рынка</i>
2. <i>Оценка конкурентоспособности технических решений</i>
3. <i>Матрица SWOT</i>
4. <i>График проведения и бюджет НТИ (диаграмма Гантта)</i>
5. <i>Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НТИ</i>
6. <i>Потенциальные риски</i>

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент кафедры менеджмента ИСГТ	Креницына Зоя Васильевна	канд.техн.наук		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4Г	Ащеулова Дарья Олеговна		

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РАБОТ
ПО ПОЛУЧЕНИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЕПТИДОВ»**

Студенту:

Группа	ФИО
2ДМ4Г	Ащеуловой Дарье Олеговне

Институт	ИПР	Кафедра	ФАХ
Уровень образования	магистрант	Направление/специальность	Химическая технология/Инжиниринг в биотехнологических и фармацевтических производствах

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

<p>1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения</p>	<p><i>Объектом исследования является методика получение рекомбинантного антимикробного пептида для последующего использования в области радиофармацевтики. Рабочая зона в которой осуществляется исследование представлено семью отдельными вентилируемыми секциями (кабинетами) с возможностью их обеззараживания при помощи ультрафиолета.</i></p>
--	--

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<p>1. Производственная безопасность 1.1. Анализ выявленных вредных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения. 1.2. Анализ выявленных опасных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения.</p>	<p>1. Производственная безопасность 1.1. Выявление и анализ вредных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности: 1) Отклонение показателей микроклимата в помещении; 2) Недостаточная освещенность рабочей зоны; 3) Повышенная температура поверхностей, оборудования, материалов; 4) Повышенный уровень ультрафиолетовой радиации; 5) Патогенные микроорганизмы (бактерии) и продукты их жизнедеятельности; 6) Повышенный уровень ультразвука. 1.2. Выявление и анализ опасных факторов при разработке и эксплуатации проектируемого решения в следующей последовательности:</p>
---	--

	<p>1) Электробезопасность; 2) Пожаровзрывоопасность.</p>
<p>2. Экологическая безопасность:</p> <ul style="list-style-type: none"> – защита селитебной зоны – анализ воздействия объекта на атмосферу (выбросы); – анализ воздействия объекта на гидросферу (сбросы); – анализ воздействия объекта на литосферу (отходы); – разработать решения по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды. 	<p>2. Экологическая безопасность:</p> <ul style="list-style-type: none"> – анализ воздействия разрабатываемой методики на атмосферу – попадание в атмосферу молекул ДНК, а также бактериальных клеток; – анализ воздействия разрабатываемой методики на гидросферу – попадание обезвреживающих агентов, а также непосредственно бактериальной культуры в канализацию; – анализ воздействия разрабатываемой методики на литосферу - бактериальное заражение почв при неправильной утилизации отходов; – разработка решений по обеспечению экологической безопасности со ссылками на НТД по охране окружающей среды.
<p>3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</p> <ul style="list-style-type: none"> – перечень возможных ЧС при разработке и эксплуатации проектируемого решения; – выбор наиболее типичной ЧС; – разработка превентивных мер по предупреждению ЧС; – разработка действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий. 	<p>3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:</p> <p>Перечень наиболее вероятных ЧС:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Пожар; 2) Взрыв. <p>Разработка плана действий в результате возникшей ЧС и мер по ликвидации её последствий.</p>

<p>4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</p> <ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны. 	<p>4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:</p> <ul style="list-style-type: none"> – специальные: должностная инструкция работника; – перечень организационных мероприятий при компоновке рабочей зоны.
--	---

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
---	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент, ИНК, каф. ЭБЖ	Шеховцова Наталья Сергеевна	Канд.хим.наук		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
2ДМ4Г	Ащеулова Дарья Олеговна		

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа 112 листов, 18 рисунков, 34 таблицы, 68 источников.

Ключевые слова: рекомбинантные белки, антимикробные пептиды, убиквицидин, бактериальная система.

Объектом исследования является рекомбинантная технология получения антимикробных пептидов.

Цель работы: получить очищенный препарат антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅.

В процессе исследования проводились работы по экспрессии целевого пептида в составе белка-слияния в бактериальной системе *E.coli*, выделению и очистке белка-слияния, качественной и количественной оценке белка, отщеплению пептида от белка-партнера, выделению целевого пептида из смеси и его анализу.

В результате исследования был получен рекомбинантный антимикробный пептид UBI₁₈₋₃₅ в бактериальной системе.

Область применения: дифференциальная диагностика бактериального воспаления на ранней стадии, с использованием радиоактивно-меченного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅.

Экономическая эффективность: описываемый в работе метод получения антимикробных пептидов (рекомбинантные технологии) представляются экономически более выгодными, чем применяемый в настоящее время твердофазный синтез.

В будущем планируется провести оценку антимикробной активности полученного пептида, создать диагностическую конструкцию на его основе.

Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки

В настоящей работе использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.4.009-83 ССБТ. Пожарная техника для защиты объектов.

Основные виды. Размещение и обслуживание.

В данной работе применены следующие термины с соответствующими определениями:

Рекомбинантная ДНК: искусственно созданная человеком последовательность ДНК, части которой могут быть синтезированы химическим путём, с помощью ПЦР (полимеразной цепной реакции) или клонированы из ДНК различных организмов. Рекомбинантные ДНК могут быть трансформированы в клетки живых организмов в составе плазмид или вирусных векторов.

Протеолитическая деградация пептида: разрушение биомолекулы под действием клеточных протеаз.

Экспрессия генов: процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок.

Тельца включения: нерастворимые белковые агрегаты, образующиеся при суперэкспрессии рекомбинантных белков у бактерий.

Сокращения и обозначения, использованные в работе:

АМП – антимикробные пептиды

UBI – убиквицидин

KSI – кетостероидизомераза

His-tag – участок представленный шестью остатками гистидина

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

Оглавление

РЕФЕРАТ	10
Введение.....	16
1. Обзор литературы	19
1.1. Актуальность своевременной диагностики гнойных инфекций	19
1.2. Механизм действия антимикробных пептидов при воспалении.....	21
1.3. Дифференцирование воспаления и инфекции.....	22
1.4. Контрастные агенты и методы ядерной медицины для визуализации бактериальных инфекций.....	23
1.5. Меченные противомикробные препараты для дифференциальной диагностики инфекций	25
1.6. Твердофазный синтез антимикробных пептидов.....	27
1.7. Получение антимикробных пептидов с использованием рекомбинантных технологий	30
2. Объект и методы исследования	34
2.1. Материалы	34
2.1.1. Приборы.....	34
2.1.2. Расходные материалы.....	34
2.1.3. Рабочие материалы	34
2.2. Методы.....	36
2.2.1. Стерилизация посуды.....	36
2.2.2. Приготовление сред.....	37
2.2.3. Индукция экспрессии пептида UBI ₁₈₋₃₅ в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой (KSI).....	37
2.2.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	37
2.2.5. Вестерн-блот анализ	38
2.2.6. Определение концентрации белка методом Брэдфорда	38

2.2.7. Аффинная хроматография	39
2.2.8. Отмывка телец включения	40
2.2.9. Химическое отщепление UBI ₁₈₋₃₅ от белка-партнера с использованием CNBr	41
2.2.10. Электрофорез низкомолекулярных белков и пептидов.....	41
2.2.11. Выделение пептида из смеси после отщепления от белка-партнера	42
2.2.12. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация времяпролетная масс-спектрометрия	42
2.2.13. Твердофазный синтез антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅ с использованием Fmoc-защищенных аминокислот.....	43
3. Результаты и обсуждение	46
3.1. Экспрессия пептида UBI ₁₈₋₃₅ в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой (KSI)	46
3.2. Очистка пептида в составе белка-слияния (KSI-UBI ₁₈₋₃₅) методом металл-аффинной хроматографии.....	48
3.3. Отмывка телец включения KSI-UBI ₁₈₋₃₅	50
3.4. Химическое отщепление пептида от белка-слияния	52
3.5. Выделение и анализ индивидуального рекомбинантного пептида UBI ₁₈₋₃₅ из смеси	54
3.6. Твердофазный синтез антимикробного пептида UBI ₁₈₋₃₅	56
4. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	59
4.1. Предпроектный анализ	59
4.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования	59
4.1.2. Сегментирование рынка.....	60
4.1.3. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	62
4.1.4. SWOT-анализ	64

4.1.5. Оценка готовности проекта к коммерциализации	65
4.1.6. Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования	66
4.2. Инициация проекта	67
4.2.1. Цели и результат проекта	67
4.2.2. Организационная структура проекта	69
4.2.3. Ограничения и допущения проекта.....	69
4.3. Планирование управления научно-техническим проектом	70
4.3.1. Иерархическая структура работ проекта.....	70
4.3.2. Контрольные события проекта.....	71
4.3.3. План проекта	72
4.4. Бюджет научного исследования	74
4.4.1. Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты (за вычетом отходов).....	74
4.4.2. Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	75
4.4.3. Основная заработная плата исполнителей темы	76
4.4.4. Дополнительная заработная плата исполнителей темы	79
4.4.5. Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления).....	79
4.4.6. Контрагентные расходы	80
4.4.7. Накладные расходы	80
4.4.8. Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта	81
4.5. Организационная структура проекта	82
4.6. Матрица ответственности	83
4.7. План управления коммуникациями проекта.....	84
4.8. Реестр рисков проекта	84

4.9. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования ..	85
4.9.1. Оценка сравнительной эффективности исследования.....	85
5. Социальная ответственность	89
Введение.....	89
5.1. Профессиональная социальная безопасность.....	90
5.1.1. Анализ вредных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (производственная санитария)	92
5.1.2. Анализ опасных производственных факторов и обоснование мероприятий по их устранению (техника безопасности).....	95
5.2. Экологическая безопасность	96
5.3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях	97
5.3.1. Пожарная и взрывная безопасность.....	98
5.4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности ...	99
6. Заключение (выводы)	100
Список публикаций студента.....	101
Список использованных источников	103

Введение

На сегодняшний день перед практикующими врачами остро стоит проблема дифференциальной диагностики асептического и бактериального воспаления. Это обусловлено в первую очередь тем, что своевременное разграничение септического и асептического воспалений играет решающую роль для определения дальнейшей тактики лечения и позволяет избежать развития тяжелых осложнений. Эффективным решением проблемы дифференциальной диагностики инфекционного воспаления является использование сцинтиграфии с радиоактивно-мечеными антимикробными пептидами [1]. В настоящее время короткие пептиды широко используются в диагностических целях. Они обеспечивают высокоспецифичное связывание с клетками-мишенями, но имеют меньшие размеры по сравнению с белками и низкую иммуногенность [2]. Так, предложен высокоэффективный подход к дифференциальной диагностике микробного воспаления на основе антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅. Благодаря способности пептида встраиваться в мембрану микробной клетки, достигается высокоселективное накопление его в очаге гнойного воспаления, тогда как накопления в стерильных участках воспаления не происходит [3].

В настоящее время антимикробные пептиды преимущественно получают методом химического синтеза. Данный метод рационален на этапе выбора пептида с оптимальными характеристиками, поиска пептида с высокой специфичностью к определенной мишени (патологической клетке, инфекционному агенту, очагу развития патологического процесса), в процессе которого может потребоваться перебор различных аминокислотных последовательностей. Однако получение необходимого количества пептида, особенно гидрофобного и/или с длинной последовательности более 15 а.к.о., методом твердофазного синтеза имеет ряд недостатков [4], а именно: возникновение ошибочных последовательностей, пропуск аминокислот из-за неполноты протекания стадий деблокирования и аминокислотобразования;

самоассоциация пептидных цепей за счет формирования водородных связей, вызывающая экранирование N-концевой аминогруппы; а также высокая стоимость синтеза. Дополнительным негативным фактором химического синтеза является применение в работе токсичных растворителей и реагентов. Таким образом, получение пептида в достаточных количествах для клинического применения методом твердофазного синтеза является высокозатратным.

Выгодной альтернативой является получение пептидов с использованием технологии рекомбинантных ДНК методом микробного синтеза. Для реализации данного подхода необходимо получить рекомбинантный штамм-продуцент и оптимизировать условия выделения пептида. При этом необходимо исключить риски протеолитической деградации пептида внутри клетки, а также его потенциальный негативный эффект на клетку-хозяина. Наиболее эффективным подходом является интеграция целевого пептида с белком-партнером.

Объектом исследования является рекомбинантная технология получения антимикробных пептидов.

Цель работы: получить очищенный препарат антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅.

Задачи:

1. Подобрать условия эффективной экспрессии пептида в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой;
2. Оптимизировать методы выделения и хроматографической очистки химерного белка;
3. Отделить пептид от белка-слияния за счет обработки бромцианом
4. Получить препарат пептида высокой чистоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии ВЭЖХ;
5. Подтвердить структуру полученного пептида методом масс-спектрометрии.

Апробация работы:

«Дизайн экспрессионной конструкции для получения антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ в бактериальной системе» участие и публикация тезисов во Всероссийской 73 итоговой научной студенческой конференции им. Н.И. Пирогова, Томск, 1-3 Апреля 2014.

«E. Coli Strains for Recombinant UBI₁₈₋₃₅ and Phlip Peptides Production» участие и публикация тезисов в IV международной научно-практической конференции, Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине, Казань, 29 Октября-1 Ноября, 2014.

«Экспрессия рекомбинантного пептида UBI₁₈₋₃₅ в бактериальной системе», публикация тезисов в сборнике XXVII Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 9-12 февраля 2015.

«Получение антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ с использованием рекомбинантных технологий», участие и публикация тезисов в Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук», Томск, 21-24 апреля, 2015.

«Получение рекомбинантных пептидов UBI₁₈₋₃₅ и рHLIP для диагностики», участие и публикация тезисов во Второй Международной биотехнологической школе «Рекомбинантные антитела и вакцины», Барнаул, 14-19 сентября, 2015.

«Дизайн векторной конструкции для экспрессии антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ в бактериальной системе» участие в Конкурсе научно-исследовательских работ студентов и аспирантов ВУЗов и научно-академических институтов России по естественным, техническим и гуманитарным наукам «Шаг в науку», Томск, с 20 июня по 20 ноября 2015.

«Recombinant production of antimicrobial peptide UBI₁₈₋₃₅ for diagnostics of inflammations», Диплом II степени, публикация тезисов во Всероссийской итоговой 75 студенческой научной конференции им. Н.И. Пирогова, Томск, 25-27 апреля, 2016.

«Получение рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ для дифференциальной диагностики воспалений», Диплом II степени, публикация тезисов в XV Всероссийской научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке», Томск, 17-20 мая, 2016.

1. Обзор литературы

1.1. Актуальность своевременной диагностики гнойных инфекций

По экспертным оценкам, в России инфекции кожи и мягких тканей диагностируются у 480 до 700 тысяч пациентов в год. Ежегодно в России за помощью в медицинские учреждения обращаются до 1,5 миллионов больных с трофическими язвами, около 500 тысяч больных с синдромом диабетической стопы.

Хирургическая инфекция занимает одно из основных мест в хирургической клинике. Частота раневых инфекционных осложнений в разных областях хирургии достигает 14-20%. Около 40% летальных исходов после операции обусловлено именно гнойно-септическими осложнениями [5].

В последнее время в России значительно увеличилось количество операций эндопротезирования суставов. Пропорционально количеству операций растёт и количество инфекционных осложнений после них. С этой проблемой сталкиваются не только в России, но и в развитых странах, таких как США, Канада и страны Европейского Сообщества. Риск развития инфекционных осложнений после первичного эндопротезирования может достигать 4%. В случаях, когда выполняется повторная операция с переустановкой и заменой компонентов эндопротеза в связи с их износом или нестабильной фиксацией, риск осложнений может достигать 40%. То есть у сорока из ста пациентов следует опасаться развития глубокой инфекции в области хирургического вмешательства после эндопротезирования сустава [6].

Остеомиелит до настоящего времени остаётся одним из самых тяжёлых и распространённых заболеваний, которое выделяется среди прочих гнойно-воспалительных процессов тяжестью течения, трудностью ранней диагностики и высокой частотой неблагоприятных исходов лечения и осложнений.

При открытых переломах костей остеомиелит как осложнение развивается в 1,4-14,4% случаев, при закрытых – в 0,4-7,6%, при этом процесс переходит в хроническую стадию не менее чем у 15,9-30,4% больных. Остеомиелит развивается у 1,6-22,4% больных после операций на опорно-двигательной системе [7].

Диагностика инфекционных процессов в первую очередь зависит от прямого проявления патогенна, его антигенных свойств и наличия генетических маркеров. В свою очередь, реакции организма, такие как выработка антител, патологические изменения в тканях и клетках или отклонения биохимических параметров крови, являются непрямыми показателями инфекции и могут носить неспецифичный характер. Традиционная анатомическая визуализация (ультразвук, рентгенография и т.д.), при обнаружении инфекции, ограничена неспособностью разграничить ранние патологические изменения без значительных анатомических отклонений [8, 9].

Общими показаниями для диагностики инфекционного процесса являются лихорадка неясного происхождения, предполагаемая инфекция суставов после протезирования, послеоперационная инфекция, а также предполагаемая инфекция лёгких, костной или мышечной ткани [10].

Идентификация общей инфекции с использованием методов лучевой диагностики основывается на мониторинге морфологических изменений при помощи рентгенографии, ультразвука, компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ). Конечная стратегия диагностики определяется исходя из подозреваемой инфекции, иммунного статуса пациента, а также доступной технологии формирования изображения. Методы КТ и МРТ позволяют получить чрезвычайно важную информацию при детектировании инфекции в органе или костной ткани, однако, такая визуализация возможна только на поздних стадиях, когда прогрессирование болезни привело к значительным анатомическим изменениям, и усложнена морфологическими искажениями, вызванными послеоперационными

процессами, возникновением рубцов или присутствием инородных материалов. Большинство диагностических методов дополнительно ограничены неспособностью разграничить: а) стерильное и инфекционное воспаление; б) опухоль и абсцесс; и в) выявить возбудителя заболевания. [11, 12].

Функциональные методы визуализации, такие как ОФЭКТ и ПЭТ способны выявлять болезненное состояние на ранней стадии, ориентируясь на клеточные и молекулярные маркеры. Сцинтиграфия и ОФЭКТ являются основными методами визуализации инфекционных заболеваний при условии высокой специфичности контрастного агента. Совмещение методов ОФЭКТ / КТ или ПЭТ / КТ значительно улучшает количественный и качественный анализ [13] за счет одновременной локализации контраста в мишени и анатомической визуализации [14].

1.2. Механизм действия антимикробных пептидов при воспалении

Антимикробные пептиды (АМП) были обнаружены в различных организмах; существуют многочисленные примеры АМП, найденных в бактериях (низин, педиоцин РА-1 и писциколин 126), растениях (дефензин и снакин-1) и в животных (магаинин, дефензин и протегрин). АМП также обнаружены в одноклеточных организмах и грибах [15].

Эффективность антимикробной защиты организма у животных в первую очередь обусловлена способностью иммунной системы быстро и специфично распознавать и нейтрализовать микроорганизм-возбудитель. Врожденный иммунитет имеет основополагающее значение в распознавании вредоносных микроорганизмов. Наиболее эффективно распознавание происходит путем связывания молекулярных паттернов ассоциированных с патогеном с Toll-подобными рецепторами и другими паттерн-распознающими молекулами на поверхности клеток или в цитоплазме. После стадии распознавания, острый антимикробный ответ формируется путем привлечения активированных лейкоцитов или выработки антимикробных веществ пораженным эпителием. В обоих случаях, клеточный ответ

включает синтез и / или мобилизацию антимикробных пептидов, которые способны губительно воздействовать на различные патогены. Существуют две основные генетические группы антимикробных пептидов млекопитающих: кателицидины и дефензины [16]. Все они вырабатываются, как часть иммунной защиты организма. Пептиды имеют отрицательный катионный заряд и преимущественно связываются с отрицательно заряженной мембраной инфекционных бактерий и грибов в результате электростатического притяжения, а их последующая агрегация и интеграция в липидный бислой ведет к локальному истощению мембраны [17].

Радиоактивно-меченные пептиды притягиваются в очаг инфекции предположительно путем гиперемии и, как следствие, повышенной проницаемости сосудов, которая сопутствует процессу воспаления [10].

1.3. Дифференцирование воспаления и инфекции

Достаточно сложно разграничить общее воспаление и инфекцию, прежде всего из-за сходства в иммунном ответе, формирующемся при повреждении тканей. В результате, применяемые методы визуализации в большинстве своем основаны на детектировании воспаления ассоциированного с инфекцией. Тем не менее, неточность такого подхода ограничивает его эффективность и требует дополнительного подтверждения скрытой инфекции анализом крови или биопсией с учетом неспецифических симптомов у пациентов, таких как лихорадка и общее недомогание. Однако стоит отметить, что анализ соотношения иммунных клеток, их рецепторов и продуктов, с повышенной регуляцией или специфичностью при инфекционном процессе может быть использовано в качестве молекулярной мишени для мониторинга воспаления, ассоциированного с инфекцией. Реакция организма на инфекционные возбудители активирует перекрывание ответов, которые включают начальное высвобождение гистамина с одновременной выработкой воспалительных цитокинов, с последующим быстрым импульсным ответом нейтрофилов на эту активацию, миграцию моноцитов из селезенки и тканей к месту повреждения, дифференцировку

моноцитов в макрофаги, для захвата и лизиса чужеродных патогенов, затем следует наработка специфичных к патогену Т-киллерных клеток и В-клеток, продуцирующих высоко-аффинные антитела [12].

В ответ на острофазовое воспаление происходят значительные патофизиологические изменения, в том числе повышение или понижение выработки белков острой фазы, которые регулируются сложной системой сигнализации цитокинов. Наиболее часто, для диагностических целей используются такие маркеры, как С-реактивный белок (СРБ) и скорость оседания эритроцитов (СОЭ), хотя они не обладают специфичностью в отношении выявления причин воспаления, однако, они являются простым, экономически эффективным и ценным диагностическим инструментом для мониторинга ответа при лечении ряда заболеваний [18].

1.4. Контрастные агенты и методы ядерной медицины для визуализации бактериальных инфекций

В ядерной медицине существует несколько стандартных протоколов для визуализации бактериальных инфекций с использованием рутинно применяемых в клинической практике контрастных агентов, и ряда новых препаратов, находящихся на стадии клинических исследований (*табл. 1.1*).

Таблица 1.1 - Контрастные вещества, применяемые для визуализации бактериальных инфекций и стадии их разработки/применения

Контрастный агент	Метод визуализации	Стадия исследований	Предполагаемый механизм действия	Ограничения
Радиоактивно-меченные аутологичные лейкоциты	ОФЭКТ, ПЭТ	В клинической практике	Хемотаксис лейкоцитов в сайт инфекции	Трудоемкость; Неспособность разграничить инфекцию и воспаление
Цитрат ⁶⁷ Ga	Сцинтиграфия, ОФЭКТ	В клинической практике	Связывание и транспорт через трансферрины, а также связывание с лактоферрином или сидерофором в сайте инфекции	Профиль биораспределения исключает возможность визуализации во множестве анатомических локализаций; Неспособность

				разграничить инфекцию и воспаление
Радиоактивно-меченные антитела	ОФЭКТ, ПЭТ	Клиническая практика / клинические исследования	Связывание с лейкоцитами (<i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>); Локализация в сайте воспаления с гиперемией / нарушением сосудистой проницаемости.	Неспособность разграничить инфекцию и воспаление
Радиоактивно-меченные цитокины	ОФЭКТ, ПЭТ	Клинические исследования	Связывание с лейкоцитами; Локализация в сайте воспаления с гиперемией / нарушением сосудистой проницаемости.	Неспособность разграничить инфекцию и воспаление
¹⁸ F-фтордезоксиглюкоза	ПЭТ, ОФЭКТ	Клинические исследования	Связывание с активированным и лейкоцитами в ходе метаболизма глюкозы	Неспособность разграничить инфекцию и воспаление
Радиоактивно-меченные антибиотики	ОФЭКТ	^{99m} Tc ципрофлоксацин используется в клинической практике	Связывание с мишенью для конкретного антибиотика (например, инфекция / бактериальные ДНК-гиразы); Побочные продукты способны локализоваться в сайте воспаления с гиперемией / нарушением сосудистой проницаемости.	Неспособность разграничить инфекцию и воспаление (некоторые новые соединения проявляют более высокую специфичность на животных моделях)
Радиоактивно-меченные пептиды	Сцинтиграфия, ОФЭКТ	^{99m} Tc-UBI ₂₉₋₄₁ находится на стадии клинических исследований	Катионные пептиды связываются с отрицательно-заряженными бактериальными	Неспособность разграничить грибковую и бактериальную инфекции

			мембранами; Локализация в сайте воспаления с гиперемией / нарушением сосудистой проницаемости.	
--	--	--	---	--

1.5. Меченные противомикробные препараты для дифференциальной диагностики инфекций

Меченные антимикробные вещества представляются перспективными векторными молекулами, так как они способны специфически накапливаться в сайте инфекции, и в зависимости от мишени, на которую они направлены, идентифицировать причину – специфический микроорганизм [12].

Так, фторхинолоны, относящиеся к классу антимикробных веществ и известные своей способностью встраиваться в ДНК большинства видов бактерий, были помечены ^{99m}Tc и ^{18}F для визуализации бактериальной инфекции методом ПЭТ [19, 20]. Клинически доказано, что препарат Infecton© – ципрофлоксацин, меченный ^{99m}Tc проявляет эквивалентную и даже более высокую эффективность при диагностике бактериальных инфекций опорно-двигательного аппарата, по сравнению с такими клиническими диагностическими агентами, как например ^{18}F -фтордезоксиглюкоза и радиоактивно-меченные лейкоциты. Однако данный препарат был снят с производства, вследствие отсутствия воспроизводимости результатов диагностики в разные моменты времени [21]. Еще один диагностический агент, способный детектировать грамположительные бактериальные инфекции, основан на магнитных наночастицах, дериватизованных с ванкомицином – технология под названием «CLIO-vanco». Данная технология базируется на высокоспецифичном связывании патогена с сенсорами на основе оксида железа, что приводит к изменению сигнала t_1 -релаксивности в присутствии грамположительных бактерий, что было продемонстрировано на культуре *Staphylococcus aureus* [22].

Меченные ^{99m}Tc природные вещества, инициирующие механизмы антибактериальной защиты организма, такие как антимикробные пептиды: лактоферрины, дефензины, убиквицидин, человеческий нейтрофильный пептид-1 (α -дефензин) и M13 бактериофаг, также используют для визуализации бактериальной инфекции, вызванной *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [23].

В настоящее время возникает множество противоречий о достоинствах и недостатках мечения синтетических антибиотиков и эндогенных антимикробных пептидов. Так, фторхинолоновые антибиотики, на основе которых на сегодняшний день оптимизирована технология формирования изображений, проявляют неспецифическое накопление в очагах стерильного воспаления, в дополнение к возможности развития бактериальной резистентности к препарату, которая также ведет к ложным результатам диагностики. Тем не менее, данный метод демонстрирует более высокую специфичность, чем радиоактивно-меченные аутологичные лейкоциты, а фторхинолоновые антибиотики не накапливаются в костном мозге, что очень важно при диагностике костных инфекций, таких как остиомиелит, септический артрит, инфекции после протезирования.

Эндогенные АМП обладают близкой специфичностью в сравнении с фторхинолоновыми антибиотиками при выявлении бактериальных инфекций. Достоинством является то, что АМП не накапливаются в очагах стерильного воспаления. Однако вопрос о возможности развития резистентности у бактерий и, как следствие, потери природного механизма антибактериального действия таких пептидов остается открытым [24].

Меченные ^{99m}Tc эндогенные производные антимикробного пептида убиквицидина, относящиеся к классу дефензинов, в частности, UBI₂₉₋₄₁, на первой стадии клинических испытаний продемонстрировал 100% общей чувствительности, 80 % специфичности и 94,4% точности среди пациентов с инфекциями мягких тканей и остеомиелитом, при этом оптимальное время формирования изображения составило 30 мин после внутривенного введения

радиофармпрепарата [25]. Исследование специфичности дифференцировки стерильного воспаления и бактериальной инфекции ^{99m}Tc -меченных синтетических антимикробных производных убиквицидина (UBI 29–41, 18–35, 31–38), синтетического hLf 1–11, нейтрофильных пептидов человека (дефензинов) и ^{99m}Tc -ципрофлоксацина (Infecton©) показало специфичное аккумуляирование антимикробных пептидов в очаге инфекции, что указывает на преимущественное связывание этих пептидов не с активированными в организме лейкоцитами, а с живыми микроорганизмами. ^{99m}Tc -ципрофлоксацин, при этом аккумуляировался как в сайтах стерильного воспаления, так и бактериальной инфекции [3].

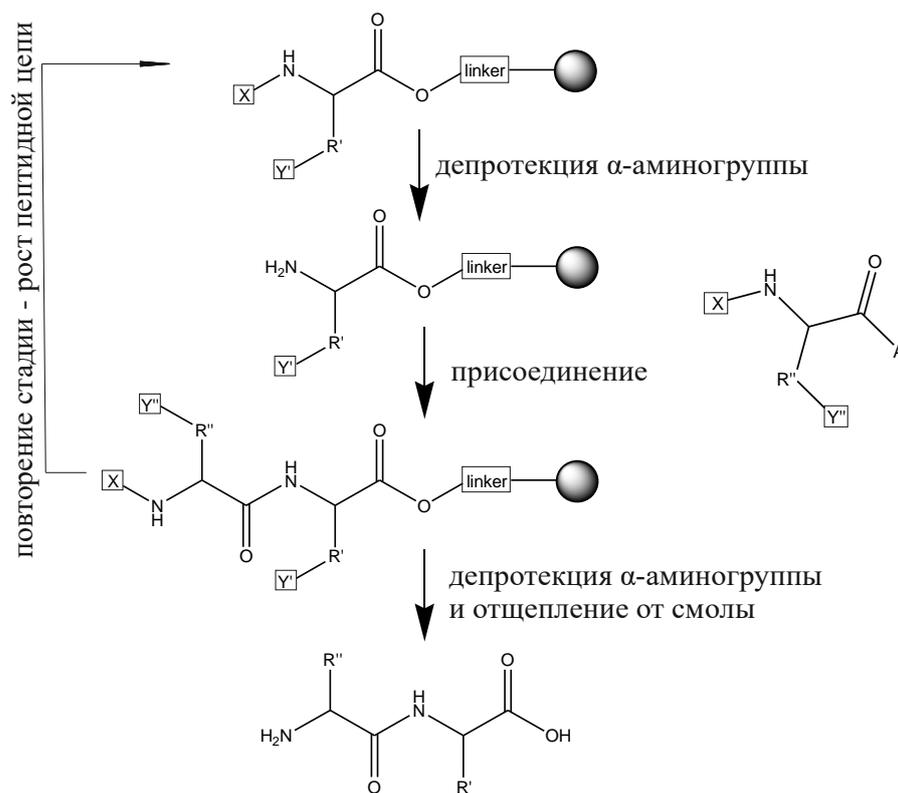
1.6. Твердофазный синтез антимикробных пептидов

Все АМП, применяемые для создания радиофармпрепаратов на их основе в настоящее время синтезируются исключительно путем химического синтеза. При этом существует два принципиально разных подхода: синтез в растворе и на твердой фазе (смоле).

Синтез пептидной цепи на твердом носителе имеет очевидные преимущества: побочные пептидные продукты, образующиеся при синтезе могут быть легко отделены фильтрацией или отмывкой, что значительно экономит время и трудозатраты, по сравнению с синтезом в растворе; многие операции могут быть выполнены в автоматическом режиме; избыток реагентов может быть использован для управления полнотой реакции; физические потери сведены к минимуму, так как пептид остается прикрепленным к подложке на протяжении всего синтеза. Этот подход, однако, имеет ограничения. Побочные продукты, возникающие в результате неполноты реакции или побочных реакций, а также примеси вносимые с реагентами накапливаются на смоле в ходе сборки пептидной цепи и загрязняют конечный продукт. Последующая очистка целевого продукта может быть затруднена в связи со схожестью природы целевого пептида и продуктов неполноты протекания реакции или пептидов с аминокислотной подменой цепи. Кроме того, стандартные аналитические методы,

применяемые для контроля протекания реакции в растворе не применимы в случае твердофазного синтеза и, как правило, необходимо прибегать к использованию качественных цветовой реакции на остаточные амины [26]. Ограничениями подхода к получению АМП химическим синтезом, в целом, является его высокая стоимость и использование в работе высокотоксичных реагентов. Несмотря на это, пептидный синтез служит надежным средством доказательства строения природных пептидно-белковых веществ, широко используются для структурно-функциональных исследований, для получения аналогов биологически активных пептидов, в том числе циклических производных с заданными свойствами (например, с пролонгированным, усиленным или избирательным действием), а также аналогов с остатками небелковых аминокислот, для изучения антигенных свойств фрагментов белков и получения специфичных к отдельным участкам полипептидных цепей антител, используемых в структурно-функциональном анализе и в создании диагностикумов и вакцин [27].

Механизм твердофазного синтеза представлен на *рис. 1.1*. С-концевой аминокислотный остаток синтезируемого пептида закреплен на нерастворимой подложке за карбоксильную группу через линкер. Любые функциональные группы боковых цепей аминокислот, которые не участвуют в формировании последующей цепи, должны быть защищены на всем протяжении синтеза (постоянные защитные группы). Временная защитная группа «маскирует» α -аминогруппу во время первоначальной загрузки смолы. Затем в реакцию вводят избыток второй аминокислоты с карбокси-активирующей группой для образования амидной связи путем формирования активированного сложного эфира или реакцией присоединения.



X - временная защитная группа
 Y - постоянная защитная группа радикала
 A - карбокси-активирующая группа

Рис. 1.1. Общая схема твердофазного синтеза пептидов

Наиболее распространенными α -амино защитными группами для твердофазного синтеза пептидов являются 9-флуоренилметоксикарбонильная (Fmoc) и трет-бутилоксикарбонил (Boc) группы, на основании выбора которых и определяется дальнейшая стратегия синтеза. Основным отличием двух стратегий синтеза является механизм снятия защитной группы, в случае Fmoc синтеза депротекция осуществляется в присутствии основания, а в случае Boc – в кислых условиях. Сравнение двух методов представлено в *табл.1.2*, следует отметить, что в последнее время наиболее часто применяется стратегия Fmoc, так как она считается более безопасной.

Таблица 1.2 – сравнение стратегий синтеза Boc или Fmoc

	Boc	Fmoc
Необходимость специального оборудования	Да	Нет
Стоимость реагентов	Ниже	Выше

Растворимость пептидов	Растворимость образующихся в ходе синтеза фторидов выше	Растворимость солей трифторуксусной кислоты ниже
Чистота гидрофобных пептидов	Высокая	Может быть ниже
Проблемы агрегации	Положительно заряженные α -аминогруппы, образующиеся в ходе депротекции в кислых условиях менее часто подвергаются агрегации	Нейтральные α -аминогруппы, образующиеся в щелочных условиях депротекции более часто подвергаются агрегации
Формирование вторичной структуры	Стерические положительно заряженные α -аминогруппы ограничивают образование вторичной структуры	Образование вторичной структуры возможно
Время синтеза	~ 20 минут/аминокислота	~ 20 - 60 минут/аминокислота
Реагент для финальной депротекции	Плавиковая кислота	Трифторуксусная кислота
Безопасность	Потенциально опасен	Относительно безопасен

1.7. Получение антимикробных пептидов с использованием рекомбинантных технологий

Для масштабирования процесса наработки пептида с целью создания диагностических систем выгодной альтернативой является микробный синтез с использованием технологии рекомбинантных ДНК. В отличие от экспрессии гетерологичных белков в бактериальной системе, которая в настоящее время представляется наиболее простым и недорогим способом получения больших количеств белка, при экспрессии антимикробных

пептидов возникают некоторые трудности, связанные с риском протеолитической деградации пептида и его токсичностью по отношению к клетке-хозяину [28]. Для преодоления этих проблем экспрессия АМП осуществляется в составе с фьюжн-белками. Таким образом, за последнее десятилетие рекомбинантным путем было получено множество АМП с различными фьюжн-партнерами, например, морицин (moricin), который был получен в составе белка-слияния с мальтозо-связывающим белком [29], цекропин X (secropin X), полученный в составе фактора некроза опухоли (TNF α) [30], человеческий β -дефензин 2 (human beta-defensin 2) в составе тиоредоксина (Trx) [31], дермцидин (dermcidin) в составе фьюза с кетостероидизомеразой (KSI) [32], лактоферрицин, для нейтрализации основных свойств которого применялось слияние с анионным пептидом [33] и пр.

Еще одним подходом к экспрессии антимикробных пептидов является их получение с интеин-фьюжн белками. Интеины способны направлять собственное вырезание из белков-слияния. Это означает, что отщепление антимикробного пептида, полученного в составе фьюжн-белка, может быть индуцировано при определенных условиях. Таким путем в *E.coli* был получен ряд антимикробных пептидов класса Па бактериоцинов с использованием специально сконструированного вектора, что позволило легко отщеплять слитые с интеином пептиды [34].

При экспрессии пептидов в составе фьюжн-белков известны случаи сохранения их антимикробных свойств, так, антимикробные пептиды энтероцин А и энтероцин Б были экспрессированы и направлены в периплазм *E. coli* в составе белка-слияния с целлюлозо-связывающим доменом, S-тагом и производным сигнальной последовательности *E. coli*. Система для экспрессии предполагала также отщепление целевого пептида при помощи Ха фактора, было установлено, что энтероцин А сохранял некоторую активность прямо во фьюжн-белке, в то время как энтероцин Б проявляет антимикробную активность только при отщеплении от белка-

слияния [35]. Вполне возможно, что проявляемая активность может быть обусловлена неспецифическими эффектами, возникающими при экспрессии белка в гетерологичной системе или из-за спонтанного аутокаталитического расщепления [36].

Несмотря на преимущества экспрессии пептидов в составе фьюжн-белков для последующей очистки, абсолютная производительность системы для такой экспрессии довольно низкая из-за того, что лишь малая часть производимого рекомбинантного белка фактически является целевым пептидом, так что даже когда экспрессия белка слияния очень высока, экспрессия антимикробного пептида может быть в лучшем случае только на среднем уровне [36].

С целью повышения выхода целевого антимикробного пептида может быть применен подход к мультимеризации кодирующей пептид последовательности на стадии создания генно-инженерной конструкции. Данный подход был применен при получении индолицина [37], который был экспрессирован в тримере и гексамере в составе фьюжн-белка с тиоредоксином и, после, мономеры были отделены с использованием CNBr. Выход пептида составил 150 мкг/л. Экспрессия в tandemных последовательностях была также применена при получении лактоферрина в слиянии с анионным пептидом с высоким выходом (60 мг/л) [38].

В результате проведенного обзора литературы были проанализированы приемы и методы получения антимикробных пептидов. На основе литературных данных был обоснован подход к нерастворимой экспрессии целевого пептида в составе белка-слияния. На этапе создания генно-инженерной конструкции, направляющей синтез антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ в системе *E.coli* в качестве системы для клонирования была выбрана коммерчески доступная плаزمиды pET31b(+) (Novagen). Рекомбинантные клоны, со встроенной плазмидной конструкцией способны продуцировать пептид в составе белка-слияния – кетостероидизомеразы (KSI). Аминокислотная последовательность фермента KSI была заимствована из

бактерии *Pseudomonas testosteroni* и в дальнейшем модифицирована таким образом, чтобы сделать белок более устойчивым к кислотному расщеплению. Пять остатков аспарагиновой кислоты были заменены остатками глутаминовой кислоты, что обеспечило устойчивость белка к кислотному гидролизу, при этом не лишая его способности эффективно индуцировать образование телец включения [39]. Благодаря этому свойству более двадцати различных пептидов уже были получены в составе белка слияния с KSI: противоопухолевые пептиды p53pAnt и PNC27 [40], антимикробные пептиды лактоферрицин [41] и дирмцидин [42], трансмембранный домен нейротрофин рецептора p75 [43], пептиды рецептора аденозина [44] и множество других.

2. Объект и методы исследования

2.1. Материалы

2.1.1. Приборы: лабораторная термостатируемая качалка (КТ 103), ламинарный бокс II класса, генератор чешуйчатого льда (PORKKA), термостат-инкубатор с естественной конвекцией (Memmert), сухожаровый шкаф (Binder), центрифуга с охлаждением (Sigma), низкотемпературный холодильник (Sanyo), настольная центрифуга (Eppendorf), автоматические дозаторы переменного объема (0,5-10 мкл, 10-50 мкл, 100-1000 мкл, 1-10 мл) (Ленпипет), вортекс (BioSan), мульти-ротатор (BioSan), термостат твердотельный настольный (BioSan), стеклянные колбы, стеклянные стерильные пробирки, спектрофотометр (Nanodrop 2000), спектрофотометр (UNICO 2800), вертикальная камера для электрофореза Mini-PROTEAN TetraCell (BioRad), источник тока (Biorad), система гель-документирования (G:BOX Chemi; XT4), аналитические весы (Adventure), электроблоттер (SD20 Semi Dry Maxi, Cleaver), лиофильная сушка (Labconco FreeZone), пептидный синтезатор ResPer SL (Intavis), MALDI-TOF масс-спектрометр Bruker MicroFlex, хроматографическая система (Knauer).

2.1.2. Расходные материалы: одноразовые пластиковые наконечники (200 мкл, 1000 мкл, 10 мл), одноразовые пластиковые чашки Петри, эппендорфы (1,5 мл, 2.5 мл), пластиковые пробирки (15 мл, 50 мл).

2.1.3. Рабочие материалы: штамм *Escherichia coli* Rossetta DE3 LysS, *Staphylococcus aureus* номер в коллекции B-7520, штамм ATCC 19258. Ампициллин – 50 мг/мл, рабочая концентрация 1:1000.

Антитела Anti-His6-Peroxidase (2) (Roche), ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (Novex), изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (Helicon), набор белковых маркеров M31 (СибЭнзим), набор низкомолекулярных белковых маркеров (Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder, Thermo Scientific), нитроцеллюлозная мембрана (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, GE Healthcare), сухое молоко (Blotting Grade Blocker, Biorad), NiNTA агароза (Qiagen), CNBr (Acros Organics), муравьиная

кислота (Fluka), Sephadex G-10, G-25 (GE Healthcare), обращенно-фазовая колонка C18 (Kromasil), 4-гидроксикоричная кислота (Sigma).

Использованные среды: LB Broth - Miller (Amresco); агар бактериологический (Helicon); ГРМ-бульон, ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Для пептидного синтеза: активатор HBTU: N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (Iris Biotech); основание NMM: 4-метил-морфолин (Fluka); NMP: метил-пирролидон, DCM: дихлорметан, TIS: триизопропилсилан, DMF: диметилформамид (Alfa Aesar), cap mixture: уксусный ангидрид (Acros Organic); пиперидин (Merck Millipore); Fmoc-защищенные аминокислоты (Intavis); смола: Fmoc-Rink Amide (Intavis); TFA: трифторуксусная кислота (Applichem); ацетонитрил (Sigma).

Растворы для электрофореза белков:

30 % АКА (37,5:1) – акриламид: N'N'-метилен-бисакриламид (30 % Т, 2,67 % С); 1,5 М трис-НСl, рН 8.8; 0,5 М трис-НСl, рН 6.8; 10 % (w/v) SDS; 10 % (w/v) персульфат аммония; 5х буфер для проб (62,5 мМ трис-НСl, рН 6.8, 20 % глицерин, 2 % SDS, 5 % β-меркаптэтанол); 1х рабочий буфер (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 0,1 % SDS, рН 8.3); фиксатор (10 % ТХУ); красящий раствор (25 % (v/v) изопропанол, 10 % (v/v) ледяная уксусная кислота, 0,25 % (w/v) Кумасси R-250); отмывочный раствор (7 % (v/v) ледяная уксусная кислота, 10 % (v/v) изопропанол).

Растворы для электрофореза низкомолекулярных белков и пептидов:

Анодный буфер (200 мМ трис-НСl, рН 8.9); катодный буфер (100 мМ Трис-НСl, 100 мМ трицин (рН должен быть в районе 8.25), SDS до 0.1 %); буфер для геля (3 М трис-НСl, рН 8.45); сток акриламида AA_{концентрирующий} (48 % акриламида, 1.5 % бис-акриламида); сток акриламида AA_{разделяющий} (46.5 % акриламида, 3.0 % бис-акриламида); 2х буфер для проб (200 мМ трис-НСl, рН 6.8, 40 % глицерин, 2 % SDS, 2 % β-меркаптоэтанол, 0.04 % Кумасси G-250); раствор для фиксации (40 % изопропанол, 10 % уксусная кислота);

раствор для окрашивания геля (10 % уксусная кислота, 0,025 % Кумасси G-250); раствор для отмывки (10 % уксусная кислота).

Для Вестерн-блоттинга: буфер для переноса 47,9 мМ трис, 38,6 мМ глицин, 0,0385 % SDS, 20 % этанол; раствор для забивки мембраны (3 % молоко в PBS); раствор антител (0,3 % сухое молоко, PBS); отмывочный буфер (0,1 % Tween в PBS).

Буферы для очистки пептида в составе белка-слияния методом металл-аффинной хроматографии: отмывочный буфер O1 (50 мМ трис HCl, 100 мМ NaCl, pH 8.0); раствор лизоцима (10 мг/мл); лизирующий Л1 и промывочный буфер П1 (40 мМ трис-HCl, 500 мМ NaCl, 15 мМ имидазол, 8 М мочевины, pH 8.0); элюирующий буфер Э1 (40 мМ трис-HCl, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазол, 8 М мочевины, pH 8.0). В качестве денатурирующего агента вместо 8 М мочевины может быть использован 6 М гуанидин хлорид (GuHCl).

Буферы для отмывки телец включения: отмывочный O2 (50 мМ трис, 1 % Triton-X100, 100 мМ NaCl, 10 мМ DTT, pH 8.0); раствор лизоцима (10 мг/мл); промывочный буфер П2 (50 мМ трис, 0,5 % (w/v) Triton-X100, 100 мМ NaCl, 1 мМ DDT, 1 мМ EDTA pH 8.0); 2 М NaCl; 1 М мочевины; 8 М мочевины).

В качестве денатурирующего агента вместо мочевины может быть использован GuHCl в соответствующей концентрации.

Реактив Брэдфорда (0,01 % (w/v) Кумасси R-250; 0,05 % (v/v) этиловый спирт; 0,1 % (v/v) ортофосфорная кислота).

2.2. Методы

2.2.1. Стерилизация посуды

В работе использовали стерильную посуду, наконечники, пробирки. Стерилизация стеклянной посуды: закрытую фольгой посуду стерилизовали в термостате-инкубаторе с естественной конвекцией при 150 °С, в течение 2 часов.

Стерилизация пластика: наконечники, пробирки помещались в стеклянную банку, закрытую фольгой и стерилизовались в термостате-инкубаторе с естественной конвекцией в течение двух часов при 110°C.

2.2.2. Приготовление сред

Агаризованная LB-среда или LB-агар: 15-18 г агар-агара бактериологического смешивали с 25 г LB-Broth - среды и растворяли в 1л дистиллированной воды.

Жидкая среда LB-Broth: 25 г среды разводили в 1 л дистиллированной воды. Для предотвращения контаминации и обеспечения селективности во все среды добавляли раствор ампициллина до конечной концентрации 20 мкг/мл. Для подавления базального уровня экспрессии T7 промотора при индукции экспрессии целевого белка, в жидкую LB среду добавляли глюкозу (1% от объема среды).

Стерилизация сред: в стеклянных колбах, закрытых фольгой, в течение двух часов при температуре 110 °С.

2.2.3. Индукция экспрессии пептида UBI₁₈₋₃₅ в составе белка-слияния с кетостероидизомеразой (KSI)

Выращивали ночную культуру клеток полученных из колоний, содержащих рекомбинантную плазмиду. 500 мкл ночной культуры переносили в 50 мл LB-среды, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и выращивали на качалке при 37 °С 180 rpm 3-4 часа (до достижения $OD_{600}=0,6$). Затем вносили 1М ИПТГ до конечной концентрации 0,1; 0,5 и 1 mM. Выращивали на качалке 3-4 часа при комнатной температуре, 28 °С и 37 °С. Переносили в центрифужные пробирки (50 мл) и центрифугировали 20 минут 5000 g при 4 °С. Осадки анализировали методом SDS-ПААГ-электрофореза.

2.2.4. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

SDS-ПААГ-электрофорез проб проводили по стандартной методике [45] в 16,5 % (w/v) геле, содержащем 0,1 % (w/v) SDS, при постоянной силе тока 50 мА, напряжении 100 В, в течение двух часов, при комнатной

температуре. Полосы белков выявляли при помощи окрашивания 0,25 % (w/v) Кумасси R-250, гель фотографировали при помощи геледокументирующей системы G-Vox и обрабатывали в программе GeneTools.

2.2.5. Вестерн-блот анализ

После электрофоретического разделения проб помещали гель на нитроцеллюлозную мембрану, предварительно смоченную в воде (5 минут) и буфере для переноса (5 минут). Перенос белков проводили в течение 40 минут в электроблоттере, при силе тока 60 мА, напряжении 120 В. Мембрану после переноса помещали в раствор 0,3 % сухого молока на 1-2 часа, затем инкубировали на шейкере в растворе с антителами 1 час. Промывали промывочным буфером 3 раза по 5 минут и окрашивали, используя ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit согласно инструкции фирмы производителя. Визуализацию осуществляли в системе геледокументирования G-Vox, обработку снимков - в программе GeneTools.

2.2.6. Определение концентрации белка методом Брэдфорда

Метод основан на смещении максимума поглощения оптической плотности красителя кислотного синего - Кумасси бриллиантовый синий R-250 от 470 нм до 595 нм, наблюдаемой вследствие связывания белка с красителем. Краситель наиболее активно связывается с остатками аргинина и лизина, что может приводить к погрешности при количественном определении различных видов белков [46].

В качестве стандартного образца использовали крысиный иммуноглобулин G (IgG). Строили зависимость оптических плотностей стандартных растворов при длине волны 595 нм от концентраций белка и использовали линейную регрессию для построения калибровочной кривой (Рис. 2.2.1.).

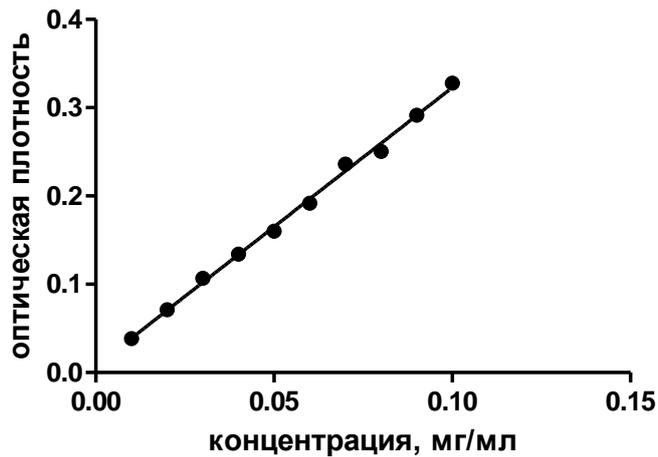


Рис. 2.2.1. Зависимость оптической плотности от концентрации раствора белка-стандарта.

На основании калибровочной кривой и измеренной оптической плотности испытуемого раствора определяли концентрацию белка в испытуемом растворе по формуле:

$$C \text{ (мг/мл)} = (OD - 0,00742) \times 0,3172$$

2.2.7. Аффинная хроматография

Выделение целевого белка проводили методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Белок элюировали с колонки двумя способами:

- неспецифической элюцией – за счет уменьшения силы связывания между белком и сорбентом в результате ступенчатого понижения рН в интервале от 6 до 4 согласно инструкции фирмы производителя QIAexpressionist™.

- специфической элюцией – за счет вытеснения с использованием имидазола обладающим большим сродством к хелатированным ионам металла – дискретным повышением концентрации имидазола (0–0.5 М) по следующей методике: осадок после индукции и заморозки на минус 80 °С растворяли в отмывочном буфере О1 (на 1 г осадка/ 5 мл буфера). Добавляли лизоцим (до конечной концентрации 1 мг/мл), пробы помещали в лед и обрабатывали ультразвуком пять импульсов по 30 секунд с перерывом 30 секунд, инкубировали во льду, 30 минут. Центрифугировали 20 минут, 10 тыс. об., 4 °С, отбирали 25 мкл супернатанта для анализа методом SDS-

ПААГ электрофореза. Осадок растворяли в лизирующем буфере Л1 (на 1 г осадка / 5 мл буфера), центрифугировали 20 минут, 10 тыс. об., 4 °С. Отбирали 25 мкл лизата для анализа методом SDS-ПААГ электрофореза.

Необходимый объем Ni-NTA определяли, исходя из ориентировочной оценки количества целевого белка в лизате по данным электрофореза и спектрофотометрии. Помещали Ni-NTA агарозу в колонку с закрытым колпачком. Открывали колпачок и промывали колонку 4х кратным избытком лизирующего буфера Л1 от объема NiNTA. Наносили осветленный лизат на колонку. Собирали фракцию белков, не связавшихся с сорбентом, отбирали 25 мкл для анализа методом SDS-ПААГ электрофореза.

Промывали колонку восьмью объемами промывочного буфера П1 от объема Ni-NTA. Отбирали 25 мкл для анализа методом SDS-ПААГ электрофореза. Элюировали белок 3 раза по половине от объема Ni-NTA элюирующим буфером Э1. Собирали элюат, отбирали 25 мкл для анализа методом SDS-ПААГ электрофореза. Препарат пептида в составе белка-слияния диализировали против воды.

Колонку с Ni-NTA промывали 8 мл 0,5 М NaOH, затем 10 мл натрий-фосфатного буфера, заливали 20 % этанолом и хранили при 4 °С; использовали до пяти раз, после сорбент регенерировали.

2.2.8. Отмывка телец включения

Осадок после индукции и заморозки на минус 80 °С растворяли в отмывочном буфере О2 (на 1 г осадка / 5 мл буфера). Добавляли лизоцим (до конечной концентрации 1 мг/мл), пробы помещали в лед и обрабатывали ультразвуком пять импульсов по 30 секунд с перерывом 30 секунд. Инкубировали во льду, 20 минут, центрифугировали 20 минут, 10 тыс. об, 4 °С. Промывали промывочным буфером П2, центрифугировали 20 минут, 10 тыс. об, 4 °С. Промывали 2 М NaCl, центрифугировали 20 минут, 10 тыс. об., 4 °С. Осадок растворяли в 1,5 М мочеvine, инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Промывали промывочным буфером П2. Центрифугировали 20 минут, 10 тыс. об при 4 °С. Осадок растворяли в 8 М

мочевине, инкубировали на шейкере в течение ночи при комнатной температуре. Центрифугировали 20 минут, 10 тыс. об при 4 °С. Собирали супернатант, содержащий растворенный белок-слияния UBI₁₈₋₃₅-KSI, и анализировали пробы методом SDS-ПААГ электрофореза.

2.2.9. Химическое отщепление UBI₁₈₋₃₅ от белка-партнера с использованием CNBr

Водный раствор белка-слияния UBI₁₈₋₃₅-KSI предварительно лиофилизировали. Сухой белок растворяли в минимальном количестве 75 %-го водного раствора муравьиной кислоты и добавляли 100 молярный (по отношению к остаткам метионина) избыток CNBr. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 24 часов в темноте. Реакцию прекращали добавлением воды в 10-кратном избытке (по объему). Затем пробу подвергали обессоливанию на гель-фильтрационной колонке PD10, согласно инструкции фирмы производителя, замораживали при минус 20 °С и лиофилизировали. Эффективность отщепления пептида от белка-слияния оценивали при помощи SDS-ПААГ-трицин электрофореза.

2.2.10. Электрофорез низкомолекулярных белков и пептидов

Электрофорез низкомолекулярных белков и пептидов (SDS-ПААГ-трицин электрофорез) проводили в течение 5 часов при стабилизации напряжения электрического поля 100 В и силе тока в пределах до 30 мА.

После окончания электрофореза гель фиксировали в растворе для фиксации геля в течение 30 минут. После фиксации гель окрашивали раствором для окрашивания геля в течение часа. Далее гель отмывали в растворе для отмывки в течение 2 часов, со сменой раствора на свежий, каждые 30 минут. После этого гель промывали в дистиллированной воде, фотографировали при помощи гель-документирующей системы G-Box и обрабатывали в программе GeneTools.

2.2.11. Выделение пептида из смеси после отщепления от белка-партнера

Лиофилизированную смесь после химического отщепления пептида от белка-партнера растворяли в 5 % водном растворе ацетонитрила с добавлением 0,02 % трифторуксусной кислоты (ТФУ) - стартовый буфер. Разделение проводили в хроматографической системе на обращено-фазовой колонке с размером пор 100 Å, параметрами 4.6×150mm, размером частиц 5.0 µm при комнатной температуре. Для успешного выделения пептида из смеси создавали линейный градиент буфера Б (80 % водный раствор ацетонитрила с добавлением 0,02 % ТФУ) в буфере А (вода с добавлением 0,02 % ТФУ) от 5 % до 100 % в течение 40 минут со скоростью потока 1 мл/мин. Поглощение измеряли при 214 нм, фракции разрешенных пиков собирали вручную, для избегания перекрестной контаминации, лиофилизировали и анализировали методом SDS-ПААГ-трицин электрофореза и МАЛДИ масс-спектрометрии.

2.2.12. Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация времяпролетная масс-спектрометрия

Для проведения масс-спектрометрического анализа образца пептида в качестве матрицы использовали 4-гидроксикоричную кислоту. Предварительно высушенную пробу растворяли в 0,1 % растворе трифторуксусной кислоты (ТФУ) в воде, смешивали с рабочим раствором матрицы, растворенной в 0,1 % растворе ТФУ в ацетонитриле, и наносили 2 мкл на подложку из нержавеющей стали и высушивали и на воздухе. Во время высушивания происходила кристаллизация матрицы с включением молекул анализируемого вещества в кристаллическую решетку.

После нанесения образца на пластину МАЛДИ, она вставлялась в масс-спектрометр и ионизировалась коротким световым импульсом лазера. Спектры после каждого лазерного импульса суммировались до получения качественной информации о молекулярной массе соединения. Каждый последующий импульс направлялся в новую точку образца.

2.2.13. Твердофазный синтез антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ с использованием Fmoc-защищенных аминокислот

Для обеспечения плавности синтеза и последующего успешного снятия защиты использовали набор производных аминокислот с соответствующими Fmoc-защитными группами боковых цепей, оптимизированными для работ по синтезу пептидов.

Для получения 10 мкмоль пептида (~2 мг) загружали Fmoc-защищенные аминокислоты в следующих количествах:

Обозначение	Наименование	с [М]	Радикалы для связывания	Навеска [мг]	Объем растворителя, мл	Используемый объем, мл
A	Fmoc-Ala-OH	0,5	8	324	1,89	2,08
R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	0,5	12	850	2,11	2,62
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH	0,5	4	471	1,26	1,54
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	0,5	4	328	1,34	1,54
G	Fmoc-Gly-OH	0,5	4	229	1,4	1,54
K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	0,5	32	1246	4,57	5,32
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	0,5	4	307	1,36	1,54
V	Fmoc-Val-OH	0,5	4	262	1,38	1,54

Реагенты для синтеза загружали в соответствии с таблицей:

Наименование	с [%]	Объем/навеска	Используемый объем, мл
Активатор		2,88 г	15,2
Основание	44	3,65 г	8,3

NMP			6,19
DCM			7,61
CapMixture (уксусный ангидрид)	5	0,69 мл	13,8
Пиперидин	20	4,41 мл	22,1

Программа синтеза (Рис.2.2.2.) включала подготовительную стадию – промывку колонки и иглы и, далее 18 циклов двойной депротекции и дублированных стадий сшивки аминокислот с последующим перекрыванием свободных боковых цепей с целью предотвращения образования побочных продуктов. Финальная стадия включала дополнительную депротекцию аминокислот и промывку иглы и колонки.

```

***** method *****
Prepare
1 Memo      ResPep SL version, 10 µmol peptide synthesis
2 RinseNeedle 1000 / 2000 ul
3 WashColumns 300 µl, Reservoir->Peptides, 4x
4 Extract    30 s
...
Cycle      1. -> 18. ( 18 = all remaining Cycles )
5 Deprotection 200 µl, Piperidine->Peptides
6 Deprotection 180 µl, Piperidine->Peptides
7 RinseNeedle 1000 / 2000 ul
8 WashColumns 300 µl, Reservoir->Peptides, 2x
9 WashColumns 250 µl, Reservoir->Peptides, 6x
10 Extract    30 s
11 Coupling   100+25+2+106, Peptides <-Cpl.Type
12 Coupling   100+25+2+106, Peptides <-Cpl.Type
13 Capping    200 µl, CapMixture->Peptides
14 RinseNeedle 1000 / 2000 ul
15 WashColumns 300 µl, Reservoir->Peptides, 2x
16 WashColumns 250 µl, Reservoir->Peptides, 5x
17 Extract    30 s
...
Final
18 Deprotection 200 µl, Piperidine->Peptides
19 Deprotection 180 µl, Piperidine->Peptides
20 Deprotection 180 µl, Piperidine->Peptides
21 RinseNeedle 1000 / 2000 ul
22 WashColumns 300 µl, Reservoir->Peptides, 2x
23 WashColumns 250 µl, Reservoir->Peptides, 6x
24 WashColumns 250 µl, DCM->Peptides, 3x
25 Extract    300 s
26 RinseNeedle 1000 / 3000 ul
...
***** end of method *** *****

```

Рис.2.2.2. Фрагмент программы для пептидного синтезатора Intavis ResPep SL, составленной для синтеза 10 мкмоль антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅.

Отщепление пептида от смолы проводили по следующей методике: промывали смолу DCM для удаления всего DMF, поскольку содержание его в смеси для отщепления может привести к ингибированию ацидолиза ТФУ. Смолу высушивали под вакуумом в течение ночи. Смесь для отщепления включала 92,5 % ТФУ; 2,5 % воды и 5 % TIS. Смесь добавляли к смоле с привитым на её поверхности пептидом, равными порциями по 200 мкл трижды с перерывами в 30 минут – общий объем смеси на указанный объем синтеза не более 1 мл. Смесь тщательно перемешивали в течение первых пяти минут и с перерывами 30 минут на всем протяжении реакции отщепления, для обеспечения полноты ее протекания. Инкубировали смесь ТФУ со смолой в течение трех часов, затем прерывали реакцию добавлением пяти объемов охлажденного на льду трет-бутилового эфира. Осадок отстаивали, удаляли избыток эфира и промывали дважды свежим эфиром. Осадок после промывки собирали центрифугированием (используя только взрывозащищенное оборудование) и растворяли в воде. Отфильтровывали нерастворенные частицы смолы на фильтрационной колонке, замораживали супернатант, содержащий растворенный пептид и лиофилизировали его. Для достижения более высокой степени чистоты, пептид подвергали препаративной очистке на обращено-фазовой колонке Extend C18 3x100 мм (размер частиц 1,8 мкм) при скорости потока 0,5 мл/мин, в системе градиента 0,01 % ТФУ в ацетонитриле от 5 % до 15 % в течение 10 мин. Полученную фракцию целевого пептида анализировали методом МАЛДИ масс-спектрометрии (п.2.2.12.).

3. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение

4.1. Предпроектный анализ

4.1.1. Потенциальные потребители результатов исследования

Российский фармацевтический рынок ежегодно демонстрирует двузначные темпы роста в денежном выражении. По данным аналитического агентства DSM Group, в 2013 году его объем увеличился на 14% и превысил 1 трлн. рублей (32,8 млрд. долларов). На долю биотехнологических препаратов приходится 8,5% или 2,8 млрд. долларов. При этом на мировом фармацевтическом рынке на долю биопрепаратов приходится свыше 20%. В следующие 5 лет ожидается опережающие темпы роста российского рынка биофармацевтики, и к 2018 году объем продаж увеличится на 80% и составит 5,1 млрд. долларов, что эквивалентно 2% от мирового рынка [50].



Рис. 4.1.1. Объем российского рынка биофармацевтики 2013 – 2018 гг.

На российском рынке преобладают импортные биотехнологические препараты. Тем не менее, в последние годы российские компании стали активно инвестировать в разработку аналогов зарубежных лекарственных средств, в том числе при финансовой поддержке государства. Так, Министерство промышленности и торговли за период 2011-2014 гг. выделило более 2 млрд. рублей на поддержку трансфера зарубежных

технологий в биофармацевтике. Что касается инновационных биофармацевтических препаратов, то российские компании менее охотно вкладывают средства в НИОКР по сравнению с иностранными. Высокие риски, длительные сроки окупаемости, отсутствие гарантированного сбыта и непрозрачные схемы государственных закупок, неразвитость исследовательской инфраструктуры – основные препятствия на пути появления отечественной инновационной продукции.

4.1.2. Сегментирование рынка

К наиболее развитым сегментам российской биофармацевтики относятся:

- Цитокины (интерфероны, эритропоэтины)
- Гормоны (инсулины, соматропин, группа половых гормонов (ФСГ, ХГЧ, ЛГ))
- Коагулянты (в т.ч. факторы свертывания крови)
- Ингибиторы протеинкиназ
- Моноклональные антитела
- Вакцины
- Антибиотики и бактериофаги

По оценкам BCC Research, объем мирового рынка антибиотиков в 2013 году составил 39,6 млрд долларов. Российский рынок антибиотиков показывает гораздо более высокую динамику, чем мировой. За период 2002-2012 гг. объемы продаж утроились – потребление росло как в количественном, так и в стоимостном выражении (в том числе, за счет роста цен - средняя цена 1 упаковки антибиотиков за этот период выросла на 74%).

По экспертным оценкам, в России инфекции кожи и мягких тканей составляют от 480 до 700 тысяч пациентов в год. Ежегодно в России за помощью в медицинские учреждения обращаются до 1,5 миллионов больных с трофическими язвами, около 500 тысяч больных с синдромом диабетической стопы.

Диагностика инфекционных болезней базируется на всестороннем и систематическом изучении больного, которое включает: сбор анамнеза, объективное динамическое обследование органов и систем, анализ лабораторного и инструментального исследования пациента.

Инструментальные методы исследования, такие как ОФЭКТ и ПЭТ способны выявлять болезненное состояние на ранней стадии, ориентируясь на клеточные и молекулярные маркеры. Сцинтиграфия и ОФЭКТ являются основными методами визуализации инфекционных заболеваний при условии высокой специфичности контрастного агента. В связи с этим разработка и внедрение в диагностическую практику наиболее специфичных контрастных агентов представляется актуальным.

В среднем распределение уровня использования технологий ядерной медицины по регионам и странам мира составляет 351 применение в год на 1000 человек [51].

С 1948 года и до настоящего времени ГНЦ – Институт биофизики является ведущим разработчиком технологий и методов контроля радиофармацевтических препаратов (РФП). Большинство РФП, используемых сегодня в России, были впервые разработаны в этом институте. Производство и разработка РФП в настоящее время выполняется также в нескольких организациях, перечень которых представлен в карте сегментирования (Табл.4.1.1).

Таблица 4.1.1 – Карта сегментирования направлений разработок в области создания РФП

	Организация	Назначение продукции					
		Опухолевая диагностика	РФП для ПЭТ исследований мозга	Остеосцинтиграфия	Дифференциальная диагностика воспалений	Диагностика состояний щитовидной железы	Диагностика состояний органов
	ФГУП ГНЦ - Институт				к р ы г ы й с ег м		

биофизики						
Завод «Медрадиопр епарат»						
Филиал ГНЦ РФ Физико- химического института им. Л.Я. Карпова						
НПО «Радиевый институт им. В.Г. Хлопина»						
Институт мозга человека						
РНЦ радиологии и хирургически х технологий						
НИИ ядерной физики при Томском политехничес ком университете						

Исходя из выбранных характеристик предоставляемых диагностических радиофармпрепаратов и основных организаций, осуществляющих деятельность по их производству, выявлен не занятый сегмент в области дифференциальной диагностики воспалений, которая позволила бы разграничить стерильные и инфекционные воспалительные процессы.

4.1.3. Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

Существует несколько рутинно применяемых в клинической практике контрастных агентов, которые можно классифицировать на группы радиоактивно-меченных аутологичных лейкоцитов и радиоактивно-меченных антител и множество новых препаратов, находящихся на стадии клинических исследований, принадлежащих к группам радиоактивно-

меченных цитокинов, радиоактивно-меченных антибиотиков и радиоактивно-меченных пептидов. Оценочная карта предлагаемой разработки по отношению к двум уже применяемым в диагностике, приведена в *таблице 4.1.2*.

Таблица 4.1.2 - Оценочная карта для сравнения конкурентных технических разработок

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б _ф	Б _{к1}	Б _{к2}	К _ф	К _{к1}	К _{к2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Способность разграничить инфекцию и воспаление	0,14	5	1	1	0,7	0,14	0,14
2. Возможность визуализации во множестве анатомических локализаций	0,11	4	3	3	0,44	0,33	0,33
3. Специфичность	0,11	5	3	4	0,55	0,33	0,44
4. Отсутствие побочных эффектов	0,1	4	3	3	0,4	0,3	0,3
5. Отсутствие иммунобиологической реакции	0,11	4	3	2	0,44	0,33	0,22
Экономические критерии оценки эффективности							
1. Трудоемкость производства	0,09	3	4	4	0,27	0,36	0,36
2. Уровень проникновения на рынок	0,07	3	4	5	0,21	0,28	0,35
3. Финансирование научной разработки	0,11	4	5	4	0,44	0,55	0,44
4. Срок выхода на рынок	0,1	3	4	4	0,3	0,4	0,4
5. Наличие сертификации разработки	0,06	4	5	4	0,4	0,5	0,4
Итого	1	39	35	34	4,15	3,52	3,38

К1 – цитрат ⁶⁷Ga

К2 – радиоактивно-меченные аутологичные лейкоциты

Оцениваемый контрастный агент является конкурентоспособным по многим параметрам, особенно по способности разграничить инфекцию и воспаление и специфичности. Однако по таким параметрам, как уровень проникновения, а также срок выхода на рынок данный продукт уступает уже существующим, так как является совершенно новым видом контрастного

агента и не имеет широкого распространения в диагностической практике, а находится лишь на стадии клинических исследований.

4.1.4. SWOT-анализ

Для проведения комплексной оценки научно-исследовательского проекта воспользуемся инструментом SWOT-анализа. **SWOT** позволяет оценить Strengths (сильные стороны), Weaknesses (слабые стороны), Opportunities (возможности) и Threats (угрозы). Результаты **SWOT** анализа представлены в *таблице 4.1.3*.

Таблица 4.1.3 - SWOT-анализ

	<p>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>С1. Получение нового типа контрастного агента</p> <p>С2. Экономическая эффективность по сравнению с существующим методом производства</p> <p>С3. Экологичность технологии</p> <p>С4. Наличие бюджетного финансирования.</p> <p>С5. Квалифицированный персонал.</p>	<p>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>Сл1. Отсутствие прототипа научной разработки</p> <p>Сл2. Отсутствие необходимого оборудования для проведения испытания опытного образца</p> <p>Сл4. Дороговизна научного исследования (в рамках лаборатории)</p> <p>Сл5. Длительность поставки реактивов используемых при проведении научного исследования</p>
<p>Возможности:</p> <p>В1. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ</p> <p>В2. Сотрудничество с СибГМУ ЦНИЛ</p> <p>В3. Использование оборудования и реактивов СибГМУ ЦНИЛ</p> <p>В4. Участие в грантах</p>	<p>СиВ</p> <p>Разработка технологии получения рекомбинантного антимикробного пептида в бактериальной системе для дальнейшего создания на его основе диагностической конструкции</p>	<p>СлиВ</p> <p>1. Приобретение необходимых реактивов и оборудования для проведения экспериментов</p> <p>2. Выполнение некоторых видов работ в сотрудничестве с другими учреждениями Томска</p> <p>3. Участие в грантах для получения дополнительного финансирования</p>

		СЛиУ
<p>Угрозы:</p> <p>У1. Отсутствие спроса на новые технологии у производства</p> <p>У2. Ограничения на экспорт технологии</p> <p>У3. Введение дополнительных государственных требований к сертификации продукции</p> <p>У4. Отсутствие предприятия в Томске, которое могло бы провести масштабирование и опробовать методику.</p>	<p>СиУ</p> <p>1. Создание спроса на новые технологии в производстве</p> <p>2. Продвижение методики по получению пептидов в бактериальной системе и внедрение технологии в России и, в частности, Томске</p> <p>3. Сертификация продукции</p> <p>4. Стимулирование инвесторов для создания совершенно новой технологической линии</p>	<p>1. Выполнение некоторых видов работ в сотрудничестве с другими НИИ и научными учреждениями Томска</p> <p>2. Участие в грантах как возможность дополнительного финансирования для приобретения приборов и материалов</p> <p>3. Создание спроса на новые технологии в производства, стимулирование инвесторов</p> <p>4. Доработка методики по ее конкурентным преимуществам</p> <p>5. Сертификация продукции</p>

4.1.5. Оценка готовности проекта к коммерциализации

Показатели о степени проработанности проекта с позиции коммерциализации и компетенциям разработчика научного проекта приведены в *таблице 4.1.4*.

Таблица 4.1.4 - Бланк оценки степени готовности научного проекта к коммерциализации

№ п/п	Наименование	Степень проработанности научного проекта	Уровень имеющихся знаний у разработчика
1.	Определен имеющийся научно-технический задел	5	4
2.	Определены перспективные направления коммерциализации научно-технического задела	4	4
3.	Определены отрасли и технологии (товары, услуги) для предложения на рынке	4	4
4.	Определена товарная форма научно-	3	3

	технического задела для представления на рынок		
5.	Определены авторы и осуществлена охрана их прав	4	3
6.	Проведена оценка стоимости интеллектуальной собственности	3	1
7.	Проведены маркетинговые исследования рынков сбыта	3	2
8.	Разработан бизнес-план коммерциализации научной разработки	2	3
9.	Определены пути продвижения научной разработки на рынок	3	2
10.	Разработана стратегия (форма) реализации научной разработки	3	2
11.	Проработаны вопросы международного сотрудничества и выхода на зарубежный рынок	1	1
12.	Проработаны вопросы использования услуг инфраструктуры поддержки, получения льгот	2	2
13.	Проработаны вопросы финансирования коммерциализации научной разработки	3	3
14.	Имеется команда для коммерциализации научной разработки	4	5
15.	Проработан механизм реализации научного проекта	3	4
	ИТОГО БАЛЛОВ	47	43

По результатам оценки степени готовности разработки к коммерциализации можно заключить, что её перспективность выше среднего. Для дальнейшего улучшения разработки необходимо уделить особое внимание проработке маркетинга, путей продвижения, а также международного сотрудничества. Для более успешной реализации этих работ необходимо привлечение в команду проекта маркетолога.

4.1.6. Методы коммерциализации результатов научно-технического исследования

Коммерциализацию разработки планируется осуществить путем продажи патентной лицензии или инжиниринга. Масштабирование процесса

получения препарата для диагностики – дорогостоящий и трудоемкий процесс, для обеспечения которого необходимо наличие собственных производственных линий и большие финансовые вложения. В связи с этим наиболее простым способом коммерциализации является продажа лицензии. Коммерциализация путем инжиниринга, в свою очередь, требует привлечения значительных инвестиций для заказа комплекса инженерно-технических услуг, связанных с проектированием, строительством и вводом технологической линии для производства препарата в эксплуатацию.

4.2. Инициация проекта

На стадии инициации необходимо определить внутренние и внешние заинтересованные стороны проекта, которые будут взаимодействовать и влиять на общий результат научного проекта и закрепить эту информацию в Уставе проекта.

3.2.1. Цели и результат проекта. В данном разделе определим информацию о заинтересованных сторонах проекта (Табл.4.2.1), иерархию целей проекта и критерии достижения целей (Табл.4.2.2).

Таблица 4.2.1 - Заинтересованные стороны проекта

Заинтересованные стороны проекта	Ожидания заинтересованных сторон
СибГМУ, Центральная научно-исследовательская лаборатория	Получение пептида, исследование его свойств, создание конструкции на его основе, публикации по проведенным исследованиям, патентная защита технологии получения пептида, получение грантов и прочих финансовых поддержек для дальнейших исследований
СибГМУ, кафедра лучевой диагностики	Написание совместных публикаций, заявок на получение финансовой поддержки, совместные исследования диагностической конструкции <i>in vivo</i>
НИИ ядерной физики при	Написание совместных публикаций, совместные исследования в области

ТПУ	создания конструкции пептид – радионуклид
ТПУ, Кафедра технологии органических веществ и полимерных материалов	Написание совместных публикаций, заявок на получение финансовой поддержки, совместные исследования в области конъюгации пептида с хелатором
Институт биоорганической химии НАН Беларуси	Совместные публикация

Таблица 4.2.2 - Цели и результат проекта

Цели проекта:	Создать и протестировать диагностическую конструкцию на основе антимикробного пептида, полученного при помощи экономически эффективной рекомбинантной технологии, и радионуклида ^{99m}Tc , конъюгированных через бифункциональных хелатор на базе ТПУ и СибГМУ в период с 2.09.2014 по 31.05.2019 года.
Ожидаемые результаты проекта:	Препарат на основе рекомбинантного пептида и радионуклида ^{99m}Tc создан и протестирован в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>
Критерии приемки результата проекта:	<ul style="list-style-type: none"> - препарат не оказывает выраженного цитотоксического действия <i>in vitro</i> - препарат специфично связывается с очагами бактериальных воспалений - препарат не накапливается в стерильных тканях - препарат не вызывает иммуногенных реакций - препарат полностью выводится из организма в течение двух суток после введения
Требования к результату проекта:	Требование:
	Эффективность конструкции протестирована на микроорганизмах
	Токсичность конструкции протестирована на эукариотических клетках
	Специфичность диагностики протестирована в исследованиях на животных

	Конструкция протестирована на выборке людей
--	---

3.2.2. Организационная структура проекта. Определим рабочую группу проекта, а также роль каждого участника в данном проекте, функции, выполняемые каждым из участников и их трудозатраты в проекте (табл.4.2.3).

Таблица 4.2.3 - Рабочая группа проекта

№ п/п	ФИО, основное место работы, должность	Роль в проекте	Функции	Трудо-затраты, час.
1	Першина Александра Геннадьевна	Руководитель	Курирование всех работ, выполняемые по проекту	700 часов
2	Ащеулова Дарья Олеговна	Исполнитель - магистрант	Выполнение всех работ по проекту	2920 часов
3	Лущик Александр	Внешний исполнитель – масс-спектрометрия	Подтверждение структуры полученного пептида	240 часов
4	Кривощевков Сергей Владимирович	Внешний специалист - хроматографист	Консультирование и проведение работ по отделению пептида из смеси	360 часов
ИТОГО:				4220 часов

3.2.3. Ограничения и допущения проекта

Таблица 4.2.4 - Ограничения проекта

Фактор	Ограничения/ допущения
3.1. Бюджет проекта	15 млн. руб.
3.1.1. Источник финансирования	Гос.задание, гранты
3.2. Сроки проекта:	с 2.09.2014 по 31.05.2019 г
3.2.1. Дата утверждения плана управления проектом	30.09.2014
3.2.2. Дата завершения проекта	31.05.2019

4.3. Планирование управления научно-техническим проектом

4.3.1. Иерархическая структура работ проекта

Иерархическая структура работ (ИСР) – детализация укрупненной структуры работ приведена на *рис.4.3.1.*

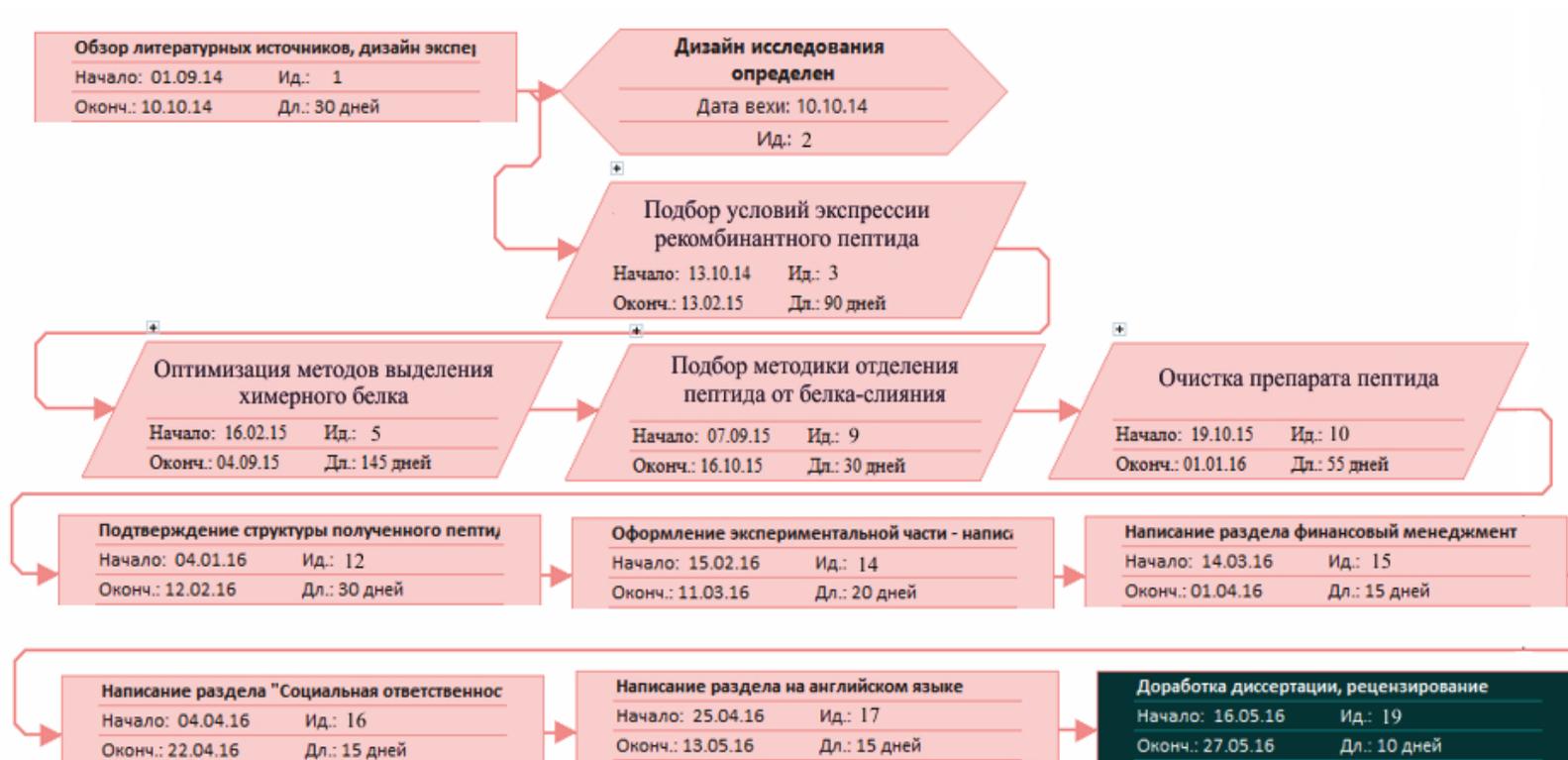


Рис. 4.3.1. Иерархическая структура работ (построена в программе MS Project)

4.3.2. Контрольные события проекта

Определим ключевые события для периода проекта, соответствующего периоду обучения основного исполнителя по магистерской программе (сентябрь 2014 – июнь 2016), даты и результаты, которые должны быть получены по состоянию на эти даты (Табл.4.3.1).

Таблица 4.3.1 - Контрольные события проекта

№ п/п	Контрольное событие	Дата	Результат (подтверждающий документ)
1	Дизайн исследования определен	Пт 10.10.14	Утвержденный руководителем дизайн исследования (ТЗ)
2	Определены оптимальные условия экспрессии целевого белка	Пт 19.12.14	Электрофореграммы подбора условий, данные денситометрии, спектрофотометрии
3	Определены оптимальные условия выделения белка	Пт 24.07.15	Электрофореграммы фракций очистки, данные денситометрии, спектрофотометрии
4	Подобрана методика отделения пептида от белка-слияния	Пт 16.10.15	Электрофореграммы
5	Подобраны условия хроматографической очистки пептида	Пт 01.01.16	Хроматограммы, электрофореграммы
6	Структура пептида подтверждена	Пт 12.02.16	Масс-спектр
7	Диссертация написана	Пт 13.05.16	Файл диссертации
8	Диссертация защищена	Ср 15.06.16	Протокол заседания ВАК

4.3.3. План проекта

Линейный график за период магистерской программы представлен в таблице (Табл.4.3.2).

Таблица 4.3.2 - Календарный план проекта

Ид.	Название задачи	Длительность	Начало	Окончание
	Магистерская диссертация	468 дней	Пн 01.09.14	Ср 15.06.16
1	Обзор литературных источников, дизайн экспериментальной части	30 дней	Пн 01.09.14	Пт 10.10.14
2	Дизайн исследования определен	0 дней	Пт 10.10.14	Пт 10.10.14
3	Подбор условий экспрессии рекомбинантного пептида	90 дней	Пн 13.10.14	Пт 13.02.15
3.1	Подбор температурных условий	30 дней	Пн 13.10.14	Пт 21.11.14
3.2	Подбор оптимальной концентрации ИПТГ для индукции	30 дней	Пн 13.10.14	Пт 21.11.14
3.3	Оценка количества экспрессируемого белка «кетостероидизомераза-пептид»	20 дней	Пн 24.11.14	Пт 19.12.14

3.4	Подбор оптимальных условий проведения SDS-ПААГ электрофореза	20 дней	Пн 22.12.14	Пт 16.01.15
3.5	Western blotтинг с антителами (antiHis6)	20 дней	Пн 19.01.15	Пт 13.02.15
4	Определены оптимальные условия экспрессии целевого белка	0 дней	Пт 19.12.14	Пт 19.12.14
5	Оптимизация методов выделения химерного белка «кетостероидизомераза-UBI₁₈₋₃₅»	145 дней	Пн 16.02.15	Пт 04.09.15
5.1	Варьирование условий лизиса клеток и выделения телец включения	50 дней	Пн 16.02.15	Пт 24.04.15
6	Хроматографическая очистка химерного белка	95 дней	Пн 27.04.15	Пт 04.09.15
6.1	Подбор буферов для промывки и элюции белка	95 дней	Пн 27.04.15	Пт 04.09.15
6.1.1	Элюция изменением pH-буферов	45 дней	Пн 27.04.15	Пт 26.06.15
6.1.2	Элюция имидазолом	45 дней	Пн 25.05.15	Пт 24.07.15
7	Отпуск исполнителей проекта	30 дней	Пн 27.07.15	Пт 04.09.15
8	Определены оптимальные условия выделения белка	0 дней	Пт 24.07.15	Пт 24.07.15
9	Подбор методики отделения пептида от белка-слияния	30 дней	Пн 07.09.15	Пт 16.10.15
9.1	Отщепление при помощи бромциана	30 дней	Пн 07.09.15	Пт 16.10.15
9.1.1	Подбор буфера	30 дней	Пн 07.09.15	Пт 16.10.15
9.1.2	Подбор рабочих концентраций реагента	30 дней	Пн 07.09.15	Пт 16.10.15
9.1.3	Подобрана методика отделения пептида от белка-слияния	0 дней	Пт 16.10.15	Пт 16.10.15
10	Очистка препарата пептида	55 дней	Пн 19.10.15	Пт 01.01.16
10.1	Подбор условий хроматографической очистки пептида из смеси после отщепления от белка-слияния	55 дней	Пн 19.10.15	Пт 01.01.16
10.1.1	Подбор сорбента	45 дней	Пн 19.10.15	Пт 18.12.15
10.1.2	Подбор буферной системы	45 дней	Пн 02.11.15	Пт 01.01.16
11	Подобраны условия хроматографической очистки пептида	0 дней	Пт 01.01.16	Пт 01.01.16
12	Подтверждение структуры полученного пептида	30 дней	Пн 04.01.16	Пт 12.02.16
13	Структура пептида подтверждена	0 дней	Пт 12.02.16	Пт 12.02.16
14	Оформление экспериментальной части - написание раздела материалы и методы	20 дней	Пн 15.02.16	Пт 11.03.16
15	Написание раздела финансовый менеджмент	15 дней	Пн 14.03.16	Пт 01.04.16
16	Написание раздела "Социальная ответственность"	15 дней	Пн 04.04.16	Пт 22.04.16
17	Написание раздела на английском языке	15 дней	Пн 25.04.16	Пт 13.05.16
18	Диссертация написана	0 дней	Пт 13.05.16	Пт 13.05.16
19	Доработка диссертации, рецензирование	10 дней	Пн 16.05.16	Пт 27.05.16
20	Диссертация защищена	0 дней	Ср 15.06.16	Ср 15.06.16

Диаграмма Гантта для иллюстрации календарного плана периода проекта, соответствующего периоду обучения по магистерской программе, представлена на *рис.4.3.2.*

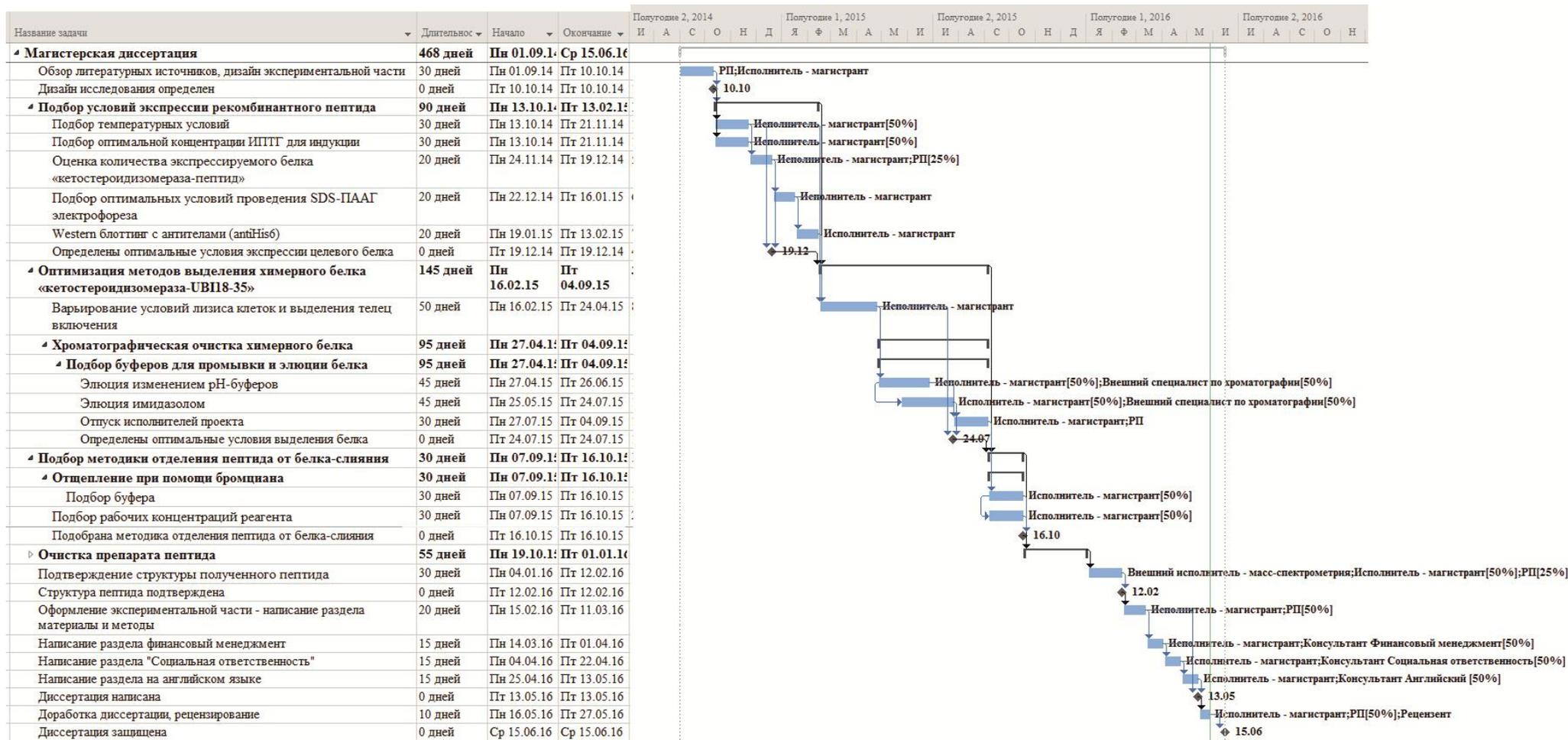


Рис. 4.3.2. Диаграмма Гантта (построена в программе MS Project)

4.4. Бюджет научного исследования

4.4.1. Сырье, материалы, покупные изделия и полуфабрикаты

(за вычетом отходов)

Затраты на приобретение всех видов материалов, необходимых для выполнения работ по данной теме сведены в *табл. 4.4.1.*

Таблица 4.4.1 - Сырье, материалы, комплектующие изделия и покупные полуфабрикаты

Реактив	Производитель	Фасовка (г)	Стоимость фасовки	Количество, необходимое на выделение из 10 л культуральной жидкости (г)	Стоимость на 10 л
LB Broth Miller	Amresco	2000	14028	250	1753,5
Tris	Sigma	500	6884,15	300	4130,49
Triton-X100	Sigma	100	4868,75	100	4868,75
NaCl	Amresco	500	2163	200	865,2
NaOH	Sigma	500	5388,45	40	431,076
имидазол	Sigma	100	59728,63	220	131402,986
мочевина	Amresco	2500	9324	8500	31701,6
HCl	Sigma	230	58639,06	80	3243,13043
DTT	Sigma	5	4501	15,43	13890,086
лизоцим	Sigma	10	24069,75	10	24069,75
NiNTA	ThermoFisher	100	40473,42	200	80946,84
GuHCl	Amresco	500	8729	344	60055,52
CNBr	Sigma	500	39904,92	50	3990,92
Транспортные расходы					18067,49242
Всего					379417,34

4.4.2. Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ

Затраты, связанные с приобретением специального оборудования (приборов, устройств и механизмов), необходимого для проведения работ по теме представлено в табл. 4.4.2.

Таблица 4.4.2 - Расчет затрат по статье «Спецоборудование для научных работ»

№ п/п	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, тыс.руб.	Общая стоимость оборудования, тыс.руб.
1.	Хроматографическая система	1	2500	2500
2.	Вакуумный испаритель	1	760	760
3.	Насос для лиофильной сушки	1	120	120
Доставка и монтаж				507
Всего				3887

Расчет амортизационных отчислений:

Затраты определяются в виде амортизации по формуле:

$$E_{ам} = \frac{\sum K_{обі} \cdot H_{обі} \cdot T_{обі}}{365 \cdot 100}$$

где $K_{обі}$ – стоимость ед. прибора или оборудования, руб.;

$H_{амі}$ – норма амортизации прибора или оборудования, %;

$T_{обі}$ – время использования оборудования, дни.

Таблица 4.4.3 - Расчет амортизационных отчислений на спецоборудование для научных работ

№	Наименование оборудования	Цена единицы оборудования, $K_{обі}$, тыс.руб	Время использования, $T_{обі}$, дни	Норма амортизации, $H_{амі}$, %	Сумма амортизационных отчислений, $E_{ам}$, тыс.руб.
---	---------------------------	--	--------------------------------------	----------------------------------	---

1	Хроматографическая система	2500	150	6	61,6
2	Вакуумный испаритель	760	125	9	23,4
3	Насос для лиофильной сушки	120	200	8	5,26
Итого					90,26

4.4.3. Основная заработная плата исполнителей темы

Основная заработная плата научных работников и непосредственно участвующих в выполнении работ по данной теме определена в табл. В состав основной заработной платы включалась премия, выплачиваемая ежемесячно из фонда заработной платы в размере 20 –30 % от тарифа или оклада.

Статья включает основную заработную плату работников, непосредственно занятых выполнением НИИ, (включая премии, доплаты) и дополнительную заработную плату:

Таблица 4.4.4 - Основная заработная плата исполнителей темы

Исполнители	Исполнители по категориям	Трудоемкость, чел.-дн., Тр	Зарботная плата, приходящаяся на один чел.-дн., тыс. руб., Здн	Всего заработная плата по тарифу (окладам), руб., Зосн
Дипломник		365	-	0
Руководитель	к.б.н., доцент	87,5	1950	170625
По экономике	доцент, к.н.	7,5	1821	13657,5
По охране труда	доцент, к.т.н.	7,5	1821	13657,5
По ин.яз	Ст.пр.	7,5	1821	13657,5

Итого	211597,5
--------------	-----------------

Основная заработная плата ($Z_{\text{осн}}$) руководителя от ТПУ рассчитывается по следующей формуле:

$$Z_{\text{осн}} = Z_{\text{дн}} \cdot T_p$$

где $Z_{\text{осн}}$ – основная заработная плата одного работника;

T_p – продолжительность работ, выполняемых научно-техническим работником, раб. дн. (рис.3.);

$Z_{\text{дн}}$ – среднедневная заработная плата работника, руб.

Среднедневная заработная плата рассчитывается по формуле:

$$Z_{\text{дн}} = \frac{Z_m \cdot M}{F_d}$$

где Z_m – месячный должностной оклад работника, руб.;

M – количество месяцев работы без отпуска в течение года:

при отпуске в 48 раб. дней $M=10,4$ месяца, 6-дневная неделя;

F_d – действительный годовой фонд рабочего времени научно-технического персонала, раб. дн. (Табл.4.4.5).

Таблица 4.4.5 - Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Консультанты
Календарное число дней	365	365
Количество нерабочих дней		
- выходные дни	46	46
- праздничные дни	12	12
Потери рабочего времени		
- отпуск	48	48
- невыходы по болезни	0	0

Действительный годовой фонд рабочего времени	259	259
--	-----	-----

Месячный должностной оклад работника:

$$Z_m = Z_{тс} \cdot (1 + k_{пр} + k_d) \cdot k_p$$

где $Z_{тс}$ – заработная плата по тарифной ставке, руб.;

$k_{пр}$ – премиальный коэффициент, равный 0,3 (т.е. 30% от $Z_{тс}$);

k_d – коэффициент доплат и надбавок составляет примерно 0,2;

k_p – районный коэффициент, равный 1,3 (для Томска).

Произведем расчет фонда заработной платы производственных рабочих и занесем результаты в *таблицу 4.4.6.*

Таблица 4.4.6 – Расчет фонда заработной платы

Исполнители	Категория	$Z_{тс}$, руб.				Z_m , руб	$Z_{дн}$, руб.	T_p , раб. дн.	$Z_{осн}$, руб.
			$k_{пр}$	k_d	k_p				
Руководитель	к.б.н, с.н.с.	24903,8	0,3	0,2	1,3	48562,5	1950	87,5	170625
Консультант по экономике	Доцент, к.э.н.	23256,4	0,3	0,2	1,3	45350	1821	7,5	13657,5
Консультант по охране труда	Доцент, к.т.н.	23256,4	0,3	0,2	1,3	45350	1821	7,5	13657,5
Консультант по английскому языку	Ст.пр-ль.	23256,4	0,3	0,2	1,3	45350	1821	7,5	13657,5
Итого									211597,5

4.4.4. Дополнительная заработная плата исполнителей темы

Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы учитывают величину предусмотренных Трудовым кодексом РФ доплат за отклонение от нормальных условий труда, а также выплат, связанных с обеспечением гарантий и компенсаций.

Расчет дополнительной заработной платы ведется по следующей формуле:

$$Z_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \cdot Z_{\text{осн}}$$

$$Z_{\text{доп.руководителя}} = 0,12 \cdot 170625 = 20475 \text{ руб}$$

$$Z_{\text{доп.консультанта}} = 0,12 \cdot 13657,5 = 1638,9 \text{ руб}$$

где $k_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной заработной платы (на стадии проектирования принимается равным 0,12).

4.4.5. Отчисления во внебюджетные фонды (страховые отчисления)

В данной статье расходов отражены обязательные отчисления по установленным законодательством Российской Федерации нормам органам государственного социального страхования (ФСС), пенсионного фонда (ПФ) и медицинского страхования (ФФОМС) от затрат на оплату труда работников.

Величина отчислений во внебюджетные фонды определяется исходя из следующей формулы:

$$Z_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}})$$

где $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

В соответствии с Федеральным законом от 24.07.2009 №212-ФЗ (Федеральный закон от 24.07.2009 №212-ФЗ «О страховых взносах в Пенсионный фонд Российской Федерации, Фонд социального страхования Российской Федерации, Федеральный фонд обязательного медицинского страхования») установлен размер страховых взносов равный 30%. Отчисления во внебюджетные фонды представлены в таблице 4.4.7.

Таблица 4.4.7 - Отчисления во внебюджетные фонды

Исполнитель	З_{осн}, руб	З_{доп}, руб	З_{внеб}, руб
Руководитель	170625	20475	57330
Консультант по экономике	13657,5	1638,9	4588,9
Консультант по охране труда	13657,5	1638,9	4588,9
Консультант по английскому	13657,5	1638,9	4588,9
Сумма			71096,7

4.4.6. Контрагентные расходы

Контрагентные расходы включают затраты, связанные с выполнением каких-либо работ по теме сторонними организациями (контрагентами, субподрядчиками).

Данный научно-исследовательский проект включал контрагентные расходы на оказание услуг по химическому синтезу пептида в размере 93500 руб.

4.4.7. Накладные расходы

Накладные расходы учитывают прочие затраты организации, не попавшие в предыдущие статьи расходов: печать и ксерокопирование материалов исследования, оплата услуг связи, электроэнергии,

почтовые и телеграфные расходы, размножение материалов и т.д. Их величина определяется по следующей формуле:

$$Z_{\text{накл}} = (\text{сумма статей } 1 \div 7) \cdot k_{\text{нр}}$$

где $k_{\text{нр}}$ – коэффициент, учитывающий накладные расходы.

Величину коэффициента накладных расходов можно взять в размере 16%.

4.4.8. Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта

Рассчитанная величина затрат научно-исследовательской работы является основой для формирования бюджета затрат проекта, который при формировании договора с заказчиком защищается научной организацией в качестве нижнего предела затрат на разработку научно-технической продукции.

Определение бюджета затрат на научно-исследовательский проект приведен в *таблице 4.4.8*.

Таблица 4.4.8 - Группировка затрат по статьям

Наименование статьи	Сумма, руб.	Примечание
1. Материальные затраты НТИ	379417,34	<i>Табл. 4.4.1</i>
2. Затраты на специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	3887000	<i>Табл. 4.4.2</i>
4. Амортизация специального оборудования	90260	<i>Табл. 4.4.3</i>
4. Затраты по основной заработной плате исполнителей темы	211597,5	<i>Табл. 4.4.4</i>

5. Затраты по дополнительной заработной плате исполнителей темы	25391,7	п.4.4.4.
6. Отчисления во внебюджетные фонды	71096,7	Табл. 4.4.7
7. Затраты на научные и производственные командировки	23698,9	10% от $Z_{осн}$ и $Z_{доп}$ всего персонала
8. Контрагентские расходы	93500	п.4.4.6.
9. Накладные расходы	750672,3	16 % от суммы ст. 1-7
Бюджет затрат НИИ	5532634,5	Сумма ст. 1-9

4.5. Организационная структура проекта

В практике используется несколько базовых вариантов организационных структур: функциональная, проектная, матричная. В связи с высокой степенью неопределенности условий реализации проекта и новизной предлагаемой технологии для данного проекта наиболее подходящим вариантом организационной структуры является проектная (Рис.4.5.1).



Рис. 4.5.1. Проектная структура проекта «Получение рекомбинантного антимикробного пептида»

4.6. Матрица ответственности

Для распределения ответственности между участниками проекта сформируем матрицу ответственности (Табл. 4.6.1).

Таблица 4.6.1 - Матрица ответственности

Этапы проекта	Руководитель	Исполнитель - магистрант	Внешний исполнитель - масс-спектрометрия	Внешний специалист по хроматографии	Консультант Финансовый менеджмент	Консультант Социальная ответственность	Консультант Английский
Обзор литературных источников, дизайн экспериментальной части	У, С	И					
Дизайн исследования определен	У	И					
Подбор условий экспрессии рекомбинантного пептида	У	И					
Оптимизация методов выделения химерного белка «кетостероидизомераза-UBI₁₈₋₃₅»	У	И					
Подбор методики отделения пептида от белка-слияния	У	И					
Очистка препарата пептида	У	И, С		И			
Подтверждение структуры полученного пептида	У	С	И				
Структура пептида подтверждена	У	С					
Оформление экспериментальной части - написание раздела материалы и методы	У	И					
Написание раздела финансовый менеджмент		И			У		
Написание раздела "Социальная ответственность"		И				У	
Написание раздела на английском языке		И					У

Исполнитель (И) – лицо (лица), выполняющие работы в рамках этапа проекта.

Утверждающее лицо (У) – лицо, осуществляющее утверждение результатов этапа проекта (если этап предусматривает утверждение).

Согласующее лицо (С) – лицо, осуществляющее анализ результатов проекта и участвующее в принятии решения о соответствии результатов этапа требованиям.

4.7. План управления коммуникациями проекта

Фрагмент плана управления коммуникациями отражающий требования к коммуникациям со стороны участников проекта приведен в *табл. 4.7.1.*

Таблица 4.7.1 – Фрагмент плана управления коммуникациями

№ п/п	Какая информация передается	Кто передает информацию	Кому передается информация	Когда передает информацию
1.	Дизайн исследования	Исполнитель-магистрант	Руководителю	В течение месяца после начала проекта
2.	Обмен информацией о текущем состоянии проекта	Исполнитель-магистрант	Руководителю	Еженедельно (пятница)
3.	Данные по анализу структуры полученного продукта	Внешний исполнитель - масс-спектрометрия	Руководителю, исполнителю-магистранту	В течение 3-х дней после выполнения задачи
4.	Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение по проекту	Исполнитель-магистрант	Консультант Финансовый менеджмент	Не позже двух недель до завершающей вехи по проекту

4.8. Реестр рисков проекта

Идентифицированные риски проекта включающие в себя возможные неопределенные события сведены в таблицу (*Табл. 3.8.1.*)

Таблица 4.8.1 - Реестр рисков

№	Риск	Потенциальное воздействие	Вероятность наступления (1-5)	Влияние риска (1-5)	Уровень риска	Способы смягчения риска	Условия наступления
1	Несоблюдение сроков по выполнению отдельных задач проекта	Смещение сроков завершения проекта	3	4	средний	Контроль выполнения задач, контроль по вехам	Непредвиденные факторы, несоблюдение обязанностей командой проекта
2	Отсутствие финансовой поддержки следующего этапа работ	Невозможность выполнения отдельных работ	3	5	средний	Более детальная проработка отчетов о выполнении и проекта	Отчет не предоставлен в срок
3	Выход одного из участников команды из проекта	Невыполнение работ	2	4	средний	Заключение контракта на весь проект	Несоблюдение договоренностей и обязательств между участниками

4.9. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования

4.9.1. Оценка сравнительной эффективности исследования

Определение эффективности происходит на основе расчета интегрального показателя эффективности научного исследования. Его нахождение связано с определением двух средневзвешенных величин: финансовой эффективности и ресурсоэффективности.

Интегральный финансовый показатель разработки определяется как:

$$I_{\phi}^p = \frac{\Phi_{pi}}{\Phi_{\max}}$$

где I_{Φ}^p - интегральный финансовый показатель разработки;

Φ_{pi} – стоимость i -го варианта исполнения;

Φ_{max} – максимальная стоимость исполнения научно-исследовательского проекта (в т.ч. аналоги).

Вариант выполнения	Бюджет затрат НИИ
1 – предлагаемая технология	5442374,5
2 – химический синтез	10884749
3 – выделение из природного сырья	14694411 (max)

$$I_{\Phi}^p = \frac{5442374,5}{14694411} = 0,37$$

$$I_{\Phi}^a = \frac{10884749}{14694411} = 0,74$$

Полученная величина интегрального финансового показателя разработки отражает соответствующее численное увеличение бюджета затрат разработки в размах (значение больше единицы), либо соответствующее численное удешевление стоимости разработки в размах (значение меньше единицы, но больше нуля).

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности приведен в табл. 4.9.1.

Таблица 4.9.1 - Сравнительная оценка характеристик вариантов исполнения проекта

Критерии	ПО			
	Весовой коэффициент параметра	Текущий проект – рекомбинантные технологии	Химический синтез	Выделение из природных источников
1. Стоимость	0,25	5	3	1

2. Экологичность	0,15	4	2	3
3. Возможность масштабирования технологии	0,15	5	2	3
4. Трудоемкость	0,20	4	3	1
5. Надежность	0,1	5	3	3
ИТОГО	1	23	13	11

$$I_{\text{тп}} = 0,25 \cdot 5 + 0,15 \cdot 4 + 0,15 \cdot 5 + 0,2 \cdot 4 + 0,1 \cdot 5 = 3,9;$$

$$I_{\text{хим.синтез}} = 0,25 \cdot 3 + 0,15 \cdot 2 + 0,15 \cdot 2 + 0,2 \cdot 3 + 0,1 \cdot 3 = 2,25;$$

$$I_{\text{природн.ист}} = 0,25 \cdot 1 + 0,15 \cdot 3 + 0,15 \cdot 3 + 0,2 \cdot 1 + 0,1 \cdot 3 = 1,65.$$

Интегральный показатель эффективности разработки

$(I_{\text{финр}}^p)$ и аналога $(I_{\text{финр}}^a)$ определяется на основании интегрального показателя ресурсоэффективности и интегрального финансового показателя по формуле:

$$I_{\text{финр}}^p = \frac{I_m^p}{I_{\phi}^p}, \quad I_{\text{финр}}^a = \frac{I_m^a}{I_{\phi}^a}$$

$$I_{\text{финр}}^p = \frac{3,9}{0,37} = 10,54$$

$$I_{\text{финр}}^a = \frac{2,25}{0,74} = 3,04$$

Сравнение интегрального показателя эффективности текущего проекта и аналогов позволит определить сравнительную эффективность проекта. Сравнительная эффективность проекта:

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{I_{\text{финр}}^p}{I_{\text{финр}}^a}$$

$$\mathcal{E}_{\text{ср}} = \frac{10,54}{3,04} = 3,47$$

Таблица 4.9.2 - Сравнительная эффективность разработки

№ п/п	Показатели	Аналог	Разработка
1	Интегральный финансовый показатель разработки	0,74	0,37
2	Интегральный показатель ресурсоэффективности разработки	2,25	3,9
3	Интегральный показатель эффективности	3,04	10,54
4	Сравнительная эффективность вариантов исполнения	3,47	

Сравнение значений интегральных показателей эффективности позволяет установить, что предлагаемая в проекте разработка является более эффективным вариантом решения поставленной технической задачи с позиции финансовой и ресурсной эффективности.

Список публикаций студента

1. Бурлакова (Ащеулова) Д. О. Дизайн экспрессионной конструкции для получения антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ в бактериальной системе // Сборник материалов конкурса научных работ: материалы Всероссийской 73 итоговой научной студенческой конференции им. Н.И. Пирогова, Томск, 1-3 Апреля 2014. - Томск: Изд-во СибГМУ, 2014 - С. 309-310.
2. Burlakova (Ashcheulova) D. O. , Pershina A. G. , Sazonov A. V. E. Coli Strains for Recombinant UBI₁₈₋₃₅ and Phlip Peptides Production // Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: сборник трудов IV международной научно-практической конференции, Казань, 29 Октября-1 Ноября 2014. - Казань: Изд-во КФУ, 2014 - С. 159.
3. Бурлакова Д.О., Першина А.Г., Сазонов А.Э. Экспрессия рекомбинантного пептида UBI₁₈₋₃₅ в бактериальной системе // Сборник тезисов XXVII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 9-12 февраля 2015. – Москва: Изд-во ИБХ РАН, 2016 – С. 121.
4. Ащеулова (Бурлакова) Д. О. Получение антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ с использованием рекомбинантных технологий [Электронный ресурс] // Перспективы развития фундаментальных наук: сборник трудов XII Международной конференции студентов и молодых ученых, Томск, 21-24 Апреля 2015. - Томск: ТПУ, 2015 - С. 751-753. - Режим доступа: http://science-persp.tpu.ru/Previous%20Materials/Konf_2015.pdf
5. Burlakova (Ashcheulova) D. O. pH-dependent peptide (pHLIP) recombinant production // Всероссийская итоговая 74-я студенческая научная конференция им. Н.И. Пирогова: сборник материалов, Томск, 27-29 Апреля 2015. - Томск: СибГМУ, 2015 - С. 109

6. Ащеулова (Бурлакова) Д. О. Получение рекомбинантного векторного рН-зависимого пептида для диагностики // Функциональные материалы: разработка, исследование, применение: сборник тезисов докладов III Всероссийского конкурса научных докладов студентов, Томск, 26-27 Мая 2015. - Томск: ТПУ, 2015 - С. 85
7. Ащеулова (Бурлакова) Д. О. , Першина А. Г. Получение рН-зависимого пептида рНLIР в бактериальной системе // Белки и пептиды: материалы VII Российского симпозиума, Новосибирск, 12-17 Июля 2015. - Новосибирск: "Офсет", 2015 - С. 256
8. Ащеулова (Бурлакова) Д. О. Recombinant production of antimicrobial peptide UBI₁₈₋₃₅ for diagnostics of inflammations // Сборник материалов конкурса научных работ: материалы Всероссийской 75 итоговой научной студенческой конференции им. Н.И. Пирогова, Томск, 25-27 апреля, 2016. - Томск: Изд-во СибГМУ, 2016 - С. 522-523.
9. Ащеулова (Бурлакова) Д. О. , Першина А. Г. Получение рекомбинантного антимикробного пептида UBI₁₈₋₃₅ для дифференциальной диагностики воспалений // Сборник материалов XV Всероссийской научно-практической конференции «Химия и химическая технология в XXI веке», Томск, 17-20 мая, 2016. – Томск: Изд-во ТПУ, 2016.